Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Contribuição da fração volátil no valor nutricional de silagens

João Luiz Pratti Daniel

Tese apresentada para obtenção do título
de Doutor em Ciências. Área de
concentração: Ciência Animal e
Pastagens

Piracicaba

2011

João Luiz Pratti Daniel

Médico Veterinário

Contribuição da fração volátil no valor nutricional de silagens

Orientador:

Prof. Dr. **Luiz Gustavo Nussio**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba

2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Daniel, João Luiz Pratti
Contribuição da fração volátil no valor nutricional de silagens / João Luiz Pratti
Daniel. - - Piracicaba, 2011.
160 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Compostos voláteis 2. Energia 3. Etanol 4. Silagem 5. Vacas leiteiras
6. Valor nutritivo I. Título

CDD 636.08552
D184c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico à minha família, em especial à minha esposa Janaína e aos meus pais, Valcyr e Sueli.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade de renascer a cada dia;

Ao professor Luiz Gustavo Nussio, pela amizade e grande exemplo de profissionalismo;

À todos os amigos do grupo Qualidade e Conservação de Forragens USP/ESALQ:

.....
.....
.....

Ao Dr. Adesogan (Gbola) e ao amigo Oscar Queiroz, pela acolhida e oportunidade de treinamento na University of Florida;

Aos colegas Pichard, Kathy e Juan e aos funcionários da Dairy Research Unit/UF pelo convívio;

Ao professor Flávio Santos pelas valiosas sugestões;

Ao professor Alexandre Pires pela implantação cirúrgica das cânulas ruminais;

À professora Marta Spoto pela condução da análise sensorial;

Ao Dr. Weiss, da Ohio State University, e ao Dr. Broderick, do USDA, pela ajuda no entendimento dos resultados;

Aos funcionários do Laboratório de Bromatologia – USP/ESALQ César, Ana Paula e Alan;

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia Wagner, Néco, Emerson, Jucelino, Benedito e Laureano;

Ao Pingin e à Bete da VidroPin pela confecção da vidraria necessária para coleta de fluido ruminal;

Ao Laboratório de Nutrição Animal – USP/CENA pelas análises de derivados de purinas;

Ao Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Lavras pela confecção das lâminas histológicas;

Ao Laboratório Plimorlabor pelas análises de metabólitos sanguíneos;

À CAPES pela concessão de bolsa;

À FAPESP pela concessão de bolsa e auxílio à pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Determinação do teor de matéria seca em silagens	21
2.2 Perdas de compostos voláteis de silagens	26
2.3 Determinação do conteúdo energético de silagens	30
2.4 Utilização de ácidos orgânicos e etanol pelo animal	32
2.5 Efeitos dos produtos de fermentação de silagens no consumo e no desempenho de animais	39
2.6 Desempenho de animais e a predição por modelos matemáticos	42
Referências	43
3 A CONTRIBUIÇÃO ENERGÉTICA DE ETANOL OU ÁCIDO LÁTICO EM RAÇÕES CONTENDO SILAGEM DE MILHO	53
Resumo	53
Abstract	54
3.1 Introdução	55
3.2 Material e métodos	55
3.3 Resultados e discussão	63
3.4 Conclusões	79
Referências	79
4 CONTRIBUIÇÃO DA FRAÇÃO VOLÁTIL NO VALOR NUTRICIONAL DA SILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR	85
Resumo	85
Abstract	86
4.1 Introdução	87
4.2 Material e métodos	87
4.3 Resultados e discussão	96
4.4 Conclusões	118

Referências.....	118
5 EFEITOS DO ETANOL NA DEGRADAÇÃO RUMINAL E NA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE GÁS IN VITRO.....	125
Resumo.....	125
Abstract.....	126
5.1 Introdução.....	127
5.2 Material e métodos.....	127
5.3 Resultados e discussão.....	128
5.4 Conclusões.....	130
Referências.....	130
6 DESEMPENHO DE VACAS LEITEIRAS SUPLEMENTADAS COM ETANOL OU ÁCIDO ACÉTICO.....	133
Resumo.....	133
Abstract.....	134
6.1 Introdução.....	135
6.2 Material e métodos.....	135
6.3 Resultados e discussão.....	141
6.4 Conclusões.....	157
Referências.....	158

RESUMO

Contribuição da fração volátil no valor nutricional de silagens

Silagens são fontes abundantes de compostos orgânicos voláteis. Durante o processo de secagem de amostras em estufas de ventilação forçada, grande parte destes compostos é perdida. Não se conhece, entretanto, a magnitude de participação destes produtos de fermentação no conteúdo energético de silagens e seus efeitos no desempenho de animais. O objetivo deste trabalho foi dimensionar a contribuição da fração volátil no valor nutricional de silagens. No primeiro experimento, avaliaram-se os efeitos do etanol e do ácido láctico no consumo de matéria seca e no processo de digestão de novilhos canulados alimentados com rações contendo silagem de milho. A maior concentração ruminal de amônia foi a única alteração noticiada para o tratamento etanol. O enriquecimento da ração com ácido láctico elevou o pH ruminal e diminuiu a razão acetato/propionato. Quando o teor de matéria seca foi determinado em estufa, os valores de NDT foram, em média, 1,5 a 1,6 unidades percentuais inferiores àqueles obtidos pelos cálculos utilizando a matéria seca determinada por destilação com tolueno. O segundo experimento determinou os efeitos da fração volátil da silagem de cana-de-açúcar e da proporção de forragem no consumo de matéria seca e no processo de digestão de novilhos canulados. Cerca de 21% da matéria seca da silagem de cana constituiu-se de compostos voláteis. A presença destes compostos na ração não alterou o consumo de matéria seca, mas aumentou as taxas fracionais de absorção de valerato e etanol com o ruminorretículo evacuado. O menor teor de forragem alterou a maior parte das variáveis tradicionalmente associadas aos acréscimos de concentrados na dieta. A fração volátil representou contribuição equivalente a 10% do valor energético da silagem de cana-de-açúcar determinado por digestibilidade. O terceiro ensaio foi delineado para verificar os efeitos do etanol na cinética de degradação ruminal *in vitro*. A inclusão de etanol nas doses 0, 5, 10, 15 ou 20% da MS diminuiu linearmente a degradação da cana-de-açúcar. No quarto experimento, avaliaram-se os efeitos do etanol e do ácido acético no desempenho de vacas leiteiras de alta produção. As vacas suplementadas com etanol produziram mais leite que àquelas alimentadas com as rações controle e ácido acético, por causa do maior consumo de MS. A razão ELI leite/CMS (Mcal/kg) foi similar entre os tratamentos. A composição química e a qualidade sensorial do leite não foram alteradas pelos compostos.

Palavras-chave: Compostos orgânicos voláteis; Etanol; Ácido acético; Ácido láctico; Energia

ABSTRACT

Contribution of volatile fraction on the nutritive value of silages

Silages are abundant sources of volatile organic compounds. At drying of samples by using forced ventilated oven, most of those compounds disappear. There is no agreement on the contribution of these fermentation end-products on energy content of silage and its effects on animal performance. The objective of this work was to rescale the contribution of the volatile fraction to the nutritional value of silages. In the first trial, the effects of ethanol and lactic acid on dry matter intake and digestion were studied in cannulated steers fed corn silage based diets. The highest concentration of rumen ammonia was the only change reported for the ethanol treatment. Diet enrichment with lactic acid increased the rumen pH and decreased acetate/propionate ratio. When the dry matter content was determined by oven, the TDN value averaged 1.5 to 1.6 units lower than those obtained by toluene distillation. In the second trial, the effects of the volatile fraction from sugarcane silage and forage proportion were determined. About 21% of dry matter of sugarcane silage consisted of volatile compounds. The fate of these compounds did not alter the DM intake but increased the fractional absorption rate of valerate and ethanol within empty reticulorumen. The lower content of forage changed most of variables traditionally associated with high concentrate diets. The contribution of volatile fraction represented 10% of the energy value of sugarcane silage determined by digestibility. The third trial was designed to determine the effects of ethanol on the rumen degradation kinetics in vitro. The addition of 0, 5, 10, 15 or 20% of ethanol (DM bases) linearly decreased the sugarcane degradation. In the fourth experiment, we evaluated the effects of ethanol and acetic acid on performance of high producing dairy cows. Cows supplemented with ethanol yielded more milk per day than that fed acetic acid and control diets, due to the higher DM intake. The NEI milk/DMI (Mcal/kg) was similar across treatments. The chemical composition and sensory quality of milk were not altered by the compounds.

Keywords: Volatile organic compounds; Ethanol; Acetic acid; Lactic acid; Energy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Equipamento para destilação com tolueno.	22
Figura 2 - Modelo hipotético de utilização e perdas de produtos de fermentação de silagens	27
Figura 3 - Ingestão de matéria seca e ganho de peso médio diário estimado pelo NRC (1996) e observado em tourinhos Nelore e Canchim alimentados com rações contendo silagens de cana-de-açúcar.	43
Figura 4 - Taxas fracionais de desaparecimento de etanol nas silagens de milho e rações totais.	63
Figura 5 - Taxas fracionais de desaparecimento de ácido acético nas silagens de milho e rações totais.....	64
Figura 6 - Temperatura das silagens, das rações totais e do ambiente.	65
Figura 7 - pH das silagens de milho e das rações completas.....	65
Figura 8 - Padrão de ingestão de alimentos ao longo do dia.	67
Figura 9 - Índice de seleção de partículas.	68
Figura 10 - pH ruminal	70
Figura 11 - Potencial redox ruminal	70
Figura 12 - Relação entre pH e redox ruminal	71
Figura 13 - Pressão parcial de hidrogênio no fluido ruminal	72
Figura 14 - Concentração ruminal de amônia.	73
Figura 15 - Concentração ruminal de ácidos graxos voláteis.....	75
Figura 16 - Razão acetato/propionato no fluido ruminal.....	76
Figura 17 - Perdas de matéria seca e de gases dos silos experimentais de cana-de-açúcar.....	97
Figura 18 - Taxas fracionais de desaparecimento de etanol nas silagens de cana e rações totais.	98
Figura 19 - Taxas fracionais de desaparecimento de ácido acético nas silagens de cana e rações totais.....	99
Figura 20 - pH das silagens e das rações completas.....	99
Figura 21 - Temperaturas das silagens, das rações completas e do ambiente.	100
Figura 22 - Consumo acumulado de MStol ao longo do dia 12 de cada período.....	102
Figura 23 - Padrão de ingestão de ração ao longo do dia.....	103
Figura 24 - Índice de seleção de partículas.....	104
Figura 25 - Degradação ruminal da cana-de-açúcar in natura ou ensilada.....	105

Figura 26 - pH ruminal.....	107
Figura 27 - Potencial redox do fluido ruminal.....	108
Figura 28 - Temperatura do fluido ruminal..	108
Figura 29 - Pressão parcial de hidrogênio no fluido ruminal.....	109
Figura 30 - Concentração ruminal de amônia.....	110
Figura 31 - Concentração ruminal de ácidos graxos voláteis.	113
Figura 32 - Razão acetato/propionato no fluido ruminal	113
Figura 33 - Efeito do etanol na degradação in vitro da cana-de-açúcar.....	129
Figura 34 - Temperatura interna do estábulo durante o período experimental.....	141
Figura 35 - Taxas fracionais de desaparecimento de etanol e ácido acético adicionados nas rações totais	142
Figura 36 - pH das rações totais suplementadas com etanol ou ácido acético.....	143
Figura 37 - Temperatura ambiente e das rações totais contendo etanol ou ácido acético	144
Figura 38 - Consumo de MS e de MS105 ao longo do período experimental.....	145
Figura 39 - Tempo de ingestão durante as primeiras 4 h após a alimentação da manhã	146
Figura 40 - Tempo de ingestão em cada hora do dia de vacas leiteiras suplementadas com etanol ou ácido acético	146
Figura 41 - Consumo de etanol e ácido acético ao longo do dia	148
Figura 42 - Índice de seleção de partículas	149
Figura 43 - Produção de leite ao longo do período experimental.	149
Figura 44 - Eficiência energética de vacas suplementadas com etanol ou ácido acético.	150
Figura 45 - Eficiência energética ao longo do período experimental.	151

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Recuperações de matéria seca e energia pelas rotas de fermentação predominantes em silagens	17
Tabela 2 - Concentrações de produtos de fermentação em silagens de milho	18
Tabela 3 - Aldeídos encontrados em silos de larga escala	19
Tabela 4 - Produtos de fermentação de silagens de cana-de-açúcar.....	20
Tabela 5 - Porcentagem de matéria seca perdida por vários métodos de determinação de matéria seca, em relação à destilação com tolueno	24
Tabela 6 - Porcentagem de matéria seca de silagens determinada por vários métodos	25
Tabela 7 - Incidência, concentração e volatilidade de produtos de fermentação de silagens.....	26
Tabela 8 - Valores de calor de combustão dos principais produtos de fermentação de silagens ..	32
Tabela 9 - Alterações causadas pela adição de ácido láctico na ração	34
Tabela 10 - Efeito do etanol nas produções de AGV e metano (in vitro)	36
Tabela 11 - Metabolismo ruminal e esplâncnico de etanol em vacas leiteiras	37
Tabela 12 - Conteúdo energético teórico de misturas de etanol e ácido acético absorvidas por ruminantes.....	38
Tabela 13 - Efeito do etanol no desempenho de cordeiros.....	42
Tabela 14 - Efeito do etanol no desempenho de vacas leiteiras	42
Tabela 15 - Composição dos ingredientes adotados nas rações experimentais.....	56
Tabela 16 - Composição das rações experimentais	57
Tabela 17 - Produtos de fermentação e pH das silagens de milho	58
Tabela 18 - Comportamento ingestivo de novilhos suplementados com etanol ou ácido láctico...	66
Tabela 19 - Conteúdo ruminal, degradabilidade in situ das silagens, digestibilidade aparente e NDT das rações.....	69
Tabela 20 - Excreção urinária de derivados de purinas.....	74
Tabela 21 - Concentrações ruminais de ácidos graxos voláteis	75
Tabela 22 - Taxas fracionais de remoção, absorção e passagem de valerato no ruminorretículo .	77
Tabela 23 - Estimativa do fluxo ruminal de ácidos graxos voláteis.....	78
Tabela 24 - Produtos de fermentação, pH e N-NH ₃ das silagens de cana	88
Tabela 25 - Composição dos ingredientes das rações experimentais.....	89

Tabela 26 - Composição das rações experimentais	90
Tabela 27 - Respostas de novilhos alimentados com rações contendo silagens de cana	102
Tabela 28 - Conteúdo ruminal de novilhos alimentados com rações contendo silagens de cana	103
Tabela 29 - Digestibilidade aparente no trato total, NDT das rações e NDT das silagens	106
Tabela 30 - Coeficientes de correlação de Pearson e probabilidades entre parâmetros físico-químicos do fluido ruminal	110
Tabela 31 - Excreção urinária de derivados de purinas	111
Tabela 32 - Concentração ruminal de ácidos graxos voláteis	112
Tabela 33 - Taxas fracionais de remoção, absorção, degradação e passagem de ácidos graxos voláteis e etanol no ruminorretículo	115
Tabela 34 - Taxas fracionais de absorção de valerato e etanol pelo ruminorretículo evacuado ..	116
Tabela 35 - Morfologia ruminal	116
Tabela 36 - Estimativa do fluxo ruminal de ácidos graxos voláteis	117
Tabela 37 - Efeito do etanol na cinética de fermentação in vitro da cana-de-açúcar	129
Tabela 38 - Efeito do etanol no pH, no potencial redox e na pressão parcial de hidrogênio do fluido ruminal	130
Tabela 39 - Composição dos ingredientes das rações experimentais	136
Tabela 40 - Composição das rações experimentais	137
Tabela 41 - Comportamento ingestivo de vacas leiteiras suplementadas com etanol ou ácido acético	147
Tabela 42 - Digestibilidade das rações totais suplementadas com etanol ou ácido acético	151
Tabela 43 - Valores energéticos das rações totais suplementadas com etanol ou ácido acético ..	152
Tabela 44 - Partição energética de vacas leiteiras suplementadas com etanol ou ácido acético ..	153
Tabela 45 - Parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras suplementadas com etanol ou ácido acético	155
Tabela 46 - Composição e produção de sólidos do leite de vacas suplementadas com etanol ou ácido acético	156
Tabela 47 - Análise sensorial do leite produzido por vacas suplementadas com etanol ou ácido acético	157

1 INTRODUÇÃO

As silagens são produzidas por fermentação de ingredientes com umidade suficiente para ocorrência de atividade bacteriana. A anaerobiose, uma das condições mais importantes para a ocorrência do processo, permite o desenvolvimento de populações microbianas e a produção de ácidos orgânicos, resultantes do metabolismo de carboidratos solúveis. Este é o caminho mais comum para a inibição de microrganismos indesejáveis e a preservação da massa ensilada (McDonald et al., 1991; Pahlow et al., 2003). Em condições normais, o ácido láctico, gerado por bactérias homofermentativas e heterofermentativas, é o produto final mais abundante em silagens. Na fermentação homolática, o ácido láctico é o único produto e as bactérias extraem 2 ATP por hexose, além da geração de calor. Sendo assim, toda matéria e quase toda energia é preservada (Tabela 1). Por outro lado, microrganismos produtores de ácidos graxos voláteis (AGV) extraem 4 ATP por mol de hexose e, no caso de cadeias com número par de carbono (ácido acético, ácido butírico), parte da matéria é emitida para a atmosfera, principalmente na forma de CO₂ (McDonald et al., 1991; Van Soest, 1994; Pahlow et al., 2003), o que normalmente representa perda energética.

Tabela 1 - Recuperações de matéria seca e energia pelas rotas de fermentação predominantes em silagens

Rota metabólica	Produtos finais	Recuperação calculada de MS (%)	Recuperação calculada de energia (%)
Homolática (glicose)	Ácido láctico	100	99
Heterolática (glicose)	Ácido láctico, etanol, CO ₂	76	98
Heterolática (frutose)	Ácido láctico, ácido acético, manitol, CO ₂	95	99
Leveduras (glicose)	Etanol, CO ₂	51	99
Clostrídio (glicose e lactato)	Ácido butírico, CO ₂	49	82

Fonte: Adaptado de McDonald et al. (1991).

Do ponto de vista microbiano, mais moles de glicose deveriam ser quebrados para obtenção equivalente de ATP pela rota homolática, comparativamente à rota geradora de AGV.

Como o ácido láctico é mais forte ($pK_a \sim 3,8$) do que os AGV ($pK_a \sim 4,8$), o abaixamento de pH é mais rápido pela rota homolática, o que leva à diminuição da atividade microbiana e antecipa o estágio de preservação onde as perdas passam a ser menores (McDonald et al., 1991).

Tabela 2 - Concentrações de produtos de fermentação em silagens de milho

Composto	Concentração mínima	Concentração máxima
Ácido láctico, g/kg MS	6,9	78,9
Ácido acético, g/kg MS	5,8	79,4
Ácido propiônico, g/kg MS	<0,1	11,2
Etanol, g/kg MS	0,9	64,0
Metanol, mg/kg MS	114	1030
Propanol, mg/kg MS	14	19096
Butanol, mg/kg MS	<3	9
Isobutanol, mg/kg MS	<3	23
2-Butanol, mg/kg MS	12	1314
Álcool alil, mg/kg MS	<4	28
2-Metilbutanol, mg/kg MS	<3	10
3-Metilbutanol, mg/kg MS	<3	73
Hexanol, mg/kg MS	<3	21
2-Feniletanol, mg/kg MS	<4	44
1,2-Propanodiol, mg/kg MS	<5	13630
Acetato de metila, mg/kg MS	<3	154
Acetato de etila, mg/kg MS	12	789
Acetato de propila, mg/kg MS	<5	379
Lactato de etila, mg/kg MS	16	1263
Lactato de propila, mg/kg MS	9	77

Pentanol e Fenilmetanol menor do que o limite de detecção (5 mg/kg MS);

Fonte: Adaptado de Weiß et al. (2009).

Além dos ácidos carboxílicos, outros produtos como alcoóis, aldeídos, ésteres e cetonas têm sido identificados em quantidades significativas em silagens (Morgan e Pereira, 1962; Weiß et al., 2009; Chmelová, 2010) (Tabelas 2 e 3). No caso da silagem de cana-de-açúcar, os alcoóis são os principais produtos de fermentação (Zopollatto et al., 2009) (Tabela 4). Esta rota se caracteriza por perda elevada de matéria seca, enquanto a energia é preservada, devido ao alto valor calórico do produto final, o etanol (Tabela 1). De forma geral, fermentações levam às perdas, mas os produtos são essenciais para o processo de conservação e possuem alto conteúdo energético por unidade de massa.

Tabela 3 - Aldeídos encontrados em silos de larga escala

Aldeído (mg/kg MN)	Silagem de milho (n = 8)			Silagem de gramínea (n = 13)		
	Média	Desvio	Variação	Média	Desvio	Variação
Etanal	25,8	16,1	9,4-48,2	29,8	14,2	9,9-49,4
Propanal	70,2	17,8	51,3-99,1	76,6	12,0	54,4-97,6
Butanal	77,9	16,9	52,2-100,0	71,9	17,2	46,1-98,7
2-Metilpropanal	28,9	15,1	10,4-49,0	25,7	15,8	9,2-50,4
Pentanal	150,0	37,8	97,8-200,0	147,0	30,3	105,0-189,0
3-Metilbutanal	78,3	17,4	50,6-97,3	76,0	18,5	46,7-100,0
Hexanal	153,0	38,9	97,1-196,0	150,0	30,3	104,0-190,0
Heptanal	24,4	17,6	7,9-50,3	23,1	11,8	10,3-46,5

Fonte: Adaptado de Chmelová (2010).

Durante o processo de secagem de amostras de silagens em estufas de ventilação forçada, grande parte dos produtos de fermentação é perdida. Não se conhece, entretanto, qual a magnitude da participação destes compostos no conteúdo energético de silagens e, conseqüentemente, seus efeitos no desempenho de animais. Assim, o objetivo deste trabalho foi dimensionar os efeitos diretos e indiretos da fração volátil de silagens no desempenho de animais.

Tabela 4 - Produtos de fermentação de silagens de cana-de-açúcar

Composto (% MS)	N	Média	Mínimo	Máximo
Ácido láctico	12	3,3	0,8	6,3
Ácido acético	14	4,0	1,6	9,3
Lático/acético	-	0,83	-	-
Ácido propiônico	9	0,7	0,2	1,9
Ácido butírico	6	0,1	0,0	0,1
Etanol	19	7,8	0,3	21,8†
Total		15,9		

†Silagem aditivada com *L. plantarum* no experimento de Freitas et al. (2006);

Fonte: Adaptado de Zopollatto et al. (2009).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Determinação do teor de matéria seca em silagens

Na análise bromatológica convencional, o primeiro passo é a secagem dos alimentos em estufa de ventilação forçada (Campos et al., 2004), sendo a perda de peso considerada água e o resíduo considerado matéria seca. Este método gravimétrico, entretanto, não é acurado para determinar o teor de matéria seca de amostras que contém substâncias voláteis além da própria água. Em silagens, por exemplo, grande parte dos produtos de fermentação é perdida por volatilização (Colovos et al., 1957; McDonald e Dewar, 1960; Fox e Fenderson, 1978), gerando desvios nos cálculos dos teores de nutrientes, valor energético, consumo de matéria seca, digestibilidade e na eficiência energética (Stone et al., 1960). Segundo McDonald et al. (1991), a própria determinação do teor de matéria seca em estufas de ventilação forçada induz à erros em estudos de perdas de matéria seca durante o processo de conservação de silagens.

Há muitos anos já se sabia que silagens apresentavam substâncias voláteis, que poderiam ser perdidas durante o processo de secagem, mas até o início da década de 1940, a maioria dos estudos desconsiderou este fato. Diante disso, Perkins (1943) realizou experimento para comparar o método tradicional (secagem em estufa a 100°C) com um método novo, naquela época, de determinação volumétrica do conteúdo de água em amostras de plantas e silagens. O método alternativo era estabelecido com base na destilação da amostra com excesso de solvente volátil, o tolueno (ponto de ebulição 110°C). A água da amostra era vaporizada e o vapor carregado para um condensador de refluxo em mistura com o vapor de tolueno. Na condensação, as fases líquidas se separavam completa e imediatamente e eram coletadas em um *Dean-Stark* (Figura 1). Com a maior densidade da água, o tolueno retornava automaticamente para o frasco de destilação. Ao final da destilação, a água poderia ser transferida para um tubo graduado de menor calibre e a leitura realizada no menisco com maior precisão. Desde então, já se sabia que métodos deste tipo eram menos precisos que os métodos gravimétricos, porém, os resultados não eram confundidos por não se considerar como água outras substâncias voláteis.

Os resultados obtidos por Perkins (1943) mostraram que nas plantas frescas o teor de água obtido por ambos os métodos foi exatamente o mesmo. Por outro lado, nas amostras de silagens, o teor de água foi sempre maior quando determinado por secagem a 100°C. Os autores sugeriram,

então, que a aplicação simultânea dos dois métodos permitiria quantificar os produtos voláteis contidos na silagem.

Como naquela época sugeria-se que parte das substâncias voláteis poderiam ser encontradas na fração água do destilado e aumentar seu volume, Perkins (1943) investigou este fato por meio de titulação com hidróxido de sódio, utilizando fenolfitaleína como indicador. Apesar de detectável, a quantidade de ácido foi menor que a menor divisão da escala de leitura do equipamento, podendo assim, ser considerada negligível.

Figura 1 - Equipamento para destilação com tolueno. 1: Aquecedor; 2: Balão; 3: Dean-Stark; 4: Condensador. Fonte: Adaptado de Dewar e McDonald (1961)

Na década de 1960, dois trabalhos sobre determinação do teor de matéria seca de silagens por destilação com tolueno se destacaram. No primeiro, McDonald e Dewar (1960) estudaram a natureza da fração volatilizada durante a destilação. A volatilidade média do ácido acético foi 87,9% e do ácido butírico 89,4%. Em todas as amostras, o ácido lático também foi detectado no evaporado, com a volatilidade variando de 1,4 a 16,4%. Perdas de nitrogênio ocorreram principalmente nas silagens com pH mais alto. Fatores de adição para correção do conteúdo de matéria seca foram sugeridos pelos autores e variaram de 1,98 a 8,80. No trabalho de Wilson et

al. (1964), o que chamou a atenção foi a diferença de até 22% entre os teores de matéria seca determinados em estufa e destilação com tolueno.

Como parte dos compostos voláteis poderiam ser encontradas no destilado, Dewar e McDonald (1961) verificaram a possibilidade de corrigir o volume de água por meio de titulação de Foreman, por considerar a natureza ácida da maior parte dos compostos. Como resultado observou-se que o verdadeiro teor de matéria seca poderia ser obtido pela seguinte equação: $MS (\%) = 100 - 99,8 * (\text{Volume de água destilada} - 0,0055 * \text{Volume de álcali } 0,1 \text{ N utilizado na titulação}) / \text{Peso da amostra}$. O fator 99,8 converte volume de água em peso, a 20°C, e o fator 0,0055 foi o valor médio para o volume dos ácidos encontrados na água destilada de várias silagens (Dewar e McDonald, 1961). Os autores concluíram que as substâncias voláteis presentes no destilado aquoso (1,24 a 4,04% da MS) podem afetar o valor de matéria seca e que a titulação pode ser utilizada como um método simples para esta correção. Entretanto, o volume de componentes voláteis encontrados na fase aquosa do destilado pode ser tratado como compensador matemático da pequena quantidade de água não removida da amostra (Undersander et al., 1993). Assim, o teor de matéria seca determinado por destilação com tolueno sem a correção de voláteis no destilado também pode ser considerado como adequado.

Haigh e Hopkins (1977) determinaram o teor de matéria seca de 205 amostras de silagens por destilação com tolueno ou secagem em estufa a 100°C (MS_{100}). A relação obtida entre os métodos foi descrita pela equação: $\% MS \text{ tolueno} = 0,96 * MS_{100} + 2,2$ ($r^2 = 0,98$; $P < 0,01$). Em média, o teor de matéria seca determinado por destilação com tolueno foi 11% maior que o teor de matéria seca obtido por secagem a 100°C. Fox e Fenderson (1978) também compararam vários métodos para determinação do teor de matéria seca da silagem de milho. Na ocasião, o método referência foi a saponificação¹ (Hood et al., 1971). Secagens a 60°C ou a 100°C subestimaram o teor de matéria seca em 8,4% e 11,5%, respectivamente, independente da duração (24 ou 48 h). Com dados de literatura associados aos do experimento, foram gerados fatores de correção para o teor de matéria seca da silagem de milho de 1,056, para secagem a 60°C, e 1,093, para secagem a 100°C.

No experimento de Porter e Murray (2001) a relação entre o teor de matéria seca determinado em estufa e aquele corrigido para perda de voláteis foi dada pela equação: $MS_{\text{corrigida}}$

¹ Neste método, o metóxido de sódio reage com água para formar hidróxido de sódio. A saponificação irreversível do NaOH por acetato de etila é completada até que toda água seja consumida. A diminuição da concentração do metóxido de sódio é uma medida direta da água originalmente presente na amostra (Glass, 1970).

= $1,011 \cdot MS_{105} + 1,24$. Miranda (2006), estudando perdas de matéria seca em silagens de cana-de-açúcar, observou que o teor de matéria seca determinado em estufa a 100°C foi, em média, 80% do valor obtido por destilação com tolueno. Logo, aproximadamente 20% da matéria seca das silagens de cana-de-açúcar era composta de substâncias voláteis.

A liofilização é uma alternativa para secagem de amostras. Aerts et al. (1974) compararam vários métodos de determinação de matéria seca em relação à destilação com tolueno e observaram que durante a liofilização houve perda de matéria seca de 7,58% (1,14-28,38%) (Tabela 5). Alomar et al. (1999) determinaram a composição química e o conteúdo de energia bruta de amostras de silagens liofilizadas ou secas em estufa a 65°C. Não houve efeito do método de secagem sobre o teor de matéria seca e o conteúdo de energia, ou seja, em ambos os métodos ocorreram perdas. Isto não surpreendeu os autores, já que puderam sentir o aroma de substâncias voláteis durante a liofilização. Outras publicações também relataram a remoção de compostos orgânicos voláteis de amostras liofilizadas (CAB, 1961). Tal fenômeno ocorre porque durante a liofilização a diminuição da pressão abaixa o ponto de ebulição dos compostos (Atkins, 1994), permitindo sua volatilização assim como a água.

Tabela 5 - Porcentagem de matéria seca perdida por vários métodos de determinação de matéria seca, em relação à destilação com tolueno

Amostra	Liofilização	Microondas	Estufa 70°C	Estufa 100°C
Silagem de milho	6,71	-	6,21	7,47
Silagem de capim	9,73	6,84	8,58	10,72
Silagem de grãos úmidos de milho	3,59	3,56	3,42	4,35
Beterraba	12,71	-	11,39	13,79
<i>Média geral</i>	7,58	5,37	6,89	8,42
<i>(variação)</i>	<i>(1,14 – 28,38)</i>	<i>(1,14 – 20,30)</i>	<i>(1,41 – 22,77)</i>	<i>(0,65 – 23,70)</i>

Fonte: Adaptado de Aerts et al. (1974).

Outros métodos capazes de determinar a proporção de água em amostras de silagem têm sido empregados em laboratórios de pesquisa. Dentre eles se destacam a cromatografia gasosa e a titulação de Karl Fisher. Em ambos, a água da amostra é extraída com solvente orgânico, geralmente os alcoóis. Na cromatografia, o extrato é injetado em cromatógrafo acoplado à

detector de condutividade térmica (Fenton et al., 1981). No método de Karl Fisher, a água do extrato é titulada com iodo na presença de piridina e metanol (Galletti e Piccaglia, 1988). Estes métodos apresentam resultados similares à destilação com tolueno (Tabela 6). A cromatografia, embora seja um método rápido e acurado, requer acesso ao cromatógrafo equipado com detector de condutividade térmica, de custo elevado. Por outro lado, os reagentes utilizados na titulação de Karl Fisher são potencialmente danosos à saúde, assim como o tolueno.

Tabela 6 - Porcentagem de matéria seca de silagens determinada por vários métodos (n = 90)

Método	Média	Mínimo	Máximo
Tolueno	31,3	18,9	63,5
Cromatografia	31,8	18,0	63,5
Titulação de Karl Fisher	33,6	19,5	65,9

Fonte: Adaptado de Petit et al. (1997).

Uma forma alternativa e promissora de corrigir o teor de matéria seca obtido em estufa (MS_{105}) é determinar as concentrações dos produtos de fermentação na silagem fresca e substituir os valores em equação contendo os respectivos coeficientes de volatilidade. No experimento realizado por Weissbach (2009), a volatilidade dos AGV foi pH-dependente. Em silagens de milho, cujo pH normalmente é baixo, o coeficiente de volatilidade dos AGV pôde ser assumido como 95%. Entretanto, em silagens de capins, este coeficiente foi definido como: $105 - 5,9 * pH$. A volatilidade do ácido láctico foi em média 8%. Os alcoóis com uma hidroxila evaporaram completamente durante a secagem. Para os alcoóis 1,2-propanodiol e 2,3-butanodiol os coeficientes de volatilidade foram 77% e 87%, respectivamente (Tabela 7). As seguintes equações foram propostas para correção do teor de matéria seca:

Silagem de milho

$$MS = MS_{105} + 0,95*AGV + 0,08*\text{ác. láctico} + 0,77*1,2\text{-propanodiol} + 1*\text{outros alcoóis (g/kg MN)}$$

Silagem de capim

$$MS = MS_{105} + (1,05 - 0,059*pH)*AGV + 0,08*\text{ác. láctico} + 0,77*1,2\text{-propanodiol} + 0,87*2,3\text{-butanodiol} + 1*\text{outros alcoóis (g/kg MN)}$$

Tabela 7 - Incidência, concentração e volatilidade de produtos de fermentação de silagens

	Silagem de milho			Silagem de capim		
	Incidência	Conc.	Volatilidade	Incidência	Conc.	Volatilidade
	(%)	(g/g MN)	(%)	(%)	(g/g MN)	(%)
Ác. acético	100	9,98	95	100	8,27	78
Ác. propiônico	100	0,28	97	100	0,45	78
Ác. isobutírico	16	0,01	100	63	0,19	84
Ác. butírico	62	0,09	100	91	2,06	88
Ác. isovalérico	78	0,06	100	98	0,36	71
Ác. valérico	9	0,01	100	55	0,10	93
Ác. capróico	21	0,01	100	68	0,19	92
Ác. láctico	100	15,20	8	100	14,63	10
Etanol	100	5,80	100	100	2,50	99
Propanol	50	0,25	100	49	0,20	100
Butanol	1	0	100	14	0,01	100
1,2-propanodiol	92	0,70	77	70	0,60	77
2,3-butanodiol	52	0,08	100	80	0,26	87

Fonte: Adaptado de Weissbach (2009).

2.2 Perdas de compostos voláteis de silagens

Durante a estocagem e principalmente após a abertura do silo, parte dos produtos de fermentação pode ser emitida para a atmosfera (Mitloehner et al., 2009) ou oxidada por microrganismos aeróbios (Spoelstra et al., 1988; Driehuis et al., 1999). No entanto, quando consumidos pelos animais, estes compostos químicos podem ter importância nutricional significativa (Figura 2).

As perdas de produtos de fermentação por volatilização ocorrem porque todos os líquidos e alguns compostos sólidos evaporam continuamente. A taxa de evaporação ou volatilização é

definida pela pressão de vapor², que depende da temperatura do meio e do tipo de substância. Materiais com maior pressão de vapor liberam mais moléculas para a fase vapor e volatilizam mais rápido do que materiais com menor pressão de vapor (Atkins, 1994).

A variação de temperatura altera a energia cinética das moléculas e, conseqüentemente, a pressão de vapor. Quanto maior a temperatura, mais partículas podem evaporar. Por outro lado, diferentes substâncias, com diferentes polaridades, apresentam forças intermoleculares distintas. Moléculas polares são fortemente atraídas por suas vizinhas, por causa das terminações positivas e negativas, o que aumenta a resistência à perda para a fase vapor, o contrário é válido para moléculas apolares (Atkins, 1994). Um bom exemplo para ilustrar este caso é comparar os ácidos láctico e propiônico, que diferem apenas pela presença de uma hidroxila no carbono alfa. O hidroxiácido é mais polar e, portanto, menos volátil, mesmo em maiores temperaturas.

Figura 2 - Modelo hipotético de utilização e perdas de produtos de fermentação de silagens 'V'.

Os compartimentos são definidos pelas caixas; o nome de cada compartimento aparece em *itálico*; os pools são identificados pela letra 'P'; os fluxos são identificados pela letra 'F'; as nuvens representam perdas de massa para o meio externo; '0' representa o meio externo

No experimento conduzido por Weissbach (2009), a volatilidade do ácido láctico foi apenas de 8% contra 95% do ácido propiônico, em silagens de milho expostas à 105°C. Ainda

² O termo pressão de vapor indica a pressão (atm ou mmHg ou torr) na qual a taxa de perda de moléculas (líquido → vapor) é igual a taxa de reincorporação de moléculas na substância (vapor → líquido).

naquele experimento, o autor verificou a influência do pH das silagem no índice de volatilidade dos compostos. O pH do meio e o pka dos compostos definem a proporção entre moléculas dissociadas e não dissociadas. Para que uma substância volatilize, esta deve estar na forma não dissociada. Portanto, quanto menor o pH do meio, maior a taxa de volatilização de ácidos e menor a volatilização de bases (Atkins, 1994).

Outro fator determinante da volatilização de compostos é a proporção de água no meio. Porter e Murray (2001) observaram maiores taxas de evaporação de alcoóis em silagens mais secas. Provavelmente isto ocorra pela concentração dos compostos e aumento no gradiente de concentração entre a amostra e o ambiente. Na prática, a mistura de silagens com alimentos concentrados resultam em aumento no teor de matéria seca, isto poderia favorecer a volatilização de produtos de fermentação de silagens, embora não existam dados publicados sobre este tópico.

Quando os compostos orgânicos voláteis de silagens são volatilizados, estas moléculas desempenham papel central na química atmosférica, pois podem: 1) reagir com radicais $\text{OH}^\cdot$; 2) formar ozônio pela interação com óxidos de nitrogênio na presença de luz solar e/ou 3) formar aerossóis orgânicos secundários (Andreae e Crutzen, 1997). Enquanto a camada de ozônio na porção superior da atmosfera é benéfica, o ozônio troposférico é extremamente poluente e com comprovado risco à saúde humana. Problemas respiratórios, danos ao sistema nervoso, ao fígado e aos rins, alergias e câncer são alguns dos possíveis efeitos deletérios de poluentes relacionados à emissão de compostos orgânicos voláteis (Mendell, 2007; Bernstein et al., 2008).

A dificuldade de associar problemas de saúde a estes poluentes se dá porque os sinais clínicos aparecem lentamente e somente após exposição crônica (NRC, 2008). Atualmente, altos níveis de ozônio são encontrados não somente em áreas com alta densidade demográfica, mas também em locais com atividade agropecuária intensa (U.S. Climate Change Science Program, 2008). O controle deste poluente tem sido difícil já que este não é emitido diretamente para a atmosfera, mas formado por processo fotoquímico. Neste cenário, os compostos orgânicos voláteis desempenham papel central e seu controle tem sido preconizado como meio efetivo para minimizar os níveis de ozônio na troposfera (EPA³).

No hemisfério norte já existem trabalhos publicados sobre as emissões de compostos orgânicos voláteis (COV) de silagens. Mitloehner et al. (2009) identificaram 24 COV de silagens e rações totais, sendo 6 alcoóis, 5 ácidos graxos voláteis (AGV) e 13 ésteres. A emissão de

³ Environmental Protection Agency – United States of America, www.epa.gov

alcoóis predominou em todas as silagens e rações totais, sendo etanol o principal composto emitido. As maiores concentrações de etanol e propanol foram detectadas nos vapores das silagens de milho. O segundo grupo de COV mais abundantes foram os AGV, sendo o ácido acético o principal composto dentre os AGV. Isto pode ser relacionado à alta concentração de ácido acético nas silagens. (Mitloehner et al., 2009).

Montes et al. (2009) mensuraram a emissão dos COV mais importantes de silagens sob condições controladas. As taxas de emissões foram altas no início dos testes (exposição aeróbia), declinaram rapidamente dentro de 2 horas e, então, diminuíram lentamente dentro do período de 24 horas (cinética de primeira ordem). Embora o padrão de emissão tenha se mantido, a magnitude das emissões diferiu entre os COV. As silagens de milho apresentaram as maiores emissões de etanol, enquanto as silagens de alfafa apresentaram as maiores emissões de metanol. As concentrações dos COV nas silagens explicaram as diferenças entre as taxas de emissões em diferentes forragens, mas não entre compostos. Apesar das maiores concentrações nas silagens de milho, o ácido acético apresentou menores taxas de emissão do que o etanol, em razão da menor volatilidade característica do referido ácido.

Krauter e Blake (2009) realizaram levantamento das emissões de COV em fazendas leiteiras situadas no Vale San Joaquin, estado da Califórnia - USA. As rações totais constituídas de silagens representaram a principal fonte de COV (60% do total). Naquele estudo os autores demonstraram que a taxa de emissão de COV foi 4,5 vezes maior em silagens descompactadas em relação às mesmas silagens intactas no painel dos silos, devido à maior porosidade da massa. As silagens armazenadas representaram 7% da emissão total de COV.

Apesar da busca abrangente, nenhuma publicação foi encontrada abordando silagens em zonas tropicais. Todavia, a dedicação de esforços de pesquisa na caracterização das emissões de compostos orgânicos voláteis em operações agrícolas têm sido úteis na proposição de estratégias de mitigação para redução de poluição ambiental e perdas de nutrientes.

2.3 Determinação do conteúdo energético de silagens

Desde a década de 1950, alguns pesquisadores já se preocupavam com os métodos de determinação do conteúdo energético de silagens. Colovos et al. (1957) conduziram um trabalho para determinar a magnitude de perdas de proteína e energia, resultante da secagem de amostras de silagens e fezes destinadas à análises químicas. Segundo os autores, o interesse pela pesquisa se deu quando observaram que novilhas leiteiras alimentadas com silagens retiveram consideravelmente mais proteína e energia do que aquelas alimentadas com feno, apesar da proteína e da energia de silagens apresentarem-se menos digestíveis do que de fenos produzidos ao mesmo tempo, da mesma cultura.

Para realização do estudo foram utilizadas amostras de silagens de diversas origens, com ou sem aditivos, e fezes de animais alimentados com diferentes rações. Os conteúdos de proteína (Kjeldahl) e energia (bomba calorimétrica) foram determinados em amostras frescas e em amostras secas a 65°C. A energia bruta das amostras frescas foi determinada pela adição de etanol como *primer*. No caso da silagem de milho, a perda de proteína bruta variou de 2,2 a 10,6%, com média de 5,2%, e a perda de energia bruta de 10,6 a 19,4%, com média de 14,0%. Em silagens de capins, as variações de perdas foram mais amplas, de -5,9 a 37,1% para proteína e de 8,0 a 19,3% para energia. Nas amostras de fezes também houve perdas significativas de proteína e energia durante o processo de secagem (Colovos et al., 1957).

Owens et al. (1969) conduziram um estudo para examinar a influência da fonte (ácido benzóico, sacarose, dimetilformamida e butilcelosolve) e da quantidade de *primer* e do conteúdo de umidade da amostra sobre a determinação da energia bruta de silagens. A quantidade de energia perdida durante o processo de secagem de amostras de silagem de milho também foi avaliada. A fonte e a quantidade dos *primers* não afetaram os resultados. No entanto, nas amostras com mais de 65% de umidade, para que ocorresse combustão completa, o requerimento de calor proveniente do *primer* foi igual àquele fornecido pela amostra. Não foi necessária a adição de *primer* nas amostras com menos de 45% de umidade. As perdas de energia bruta das silagens de milho durante a secagem foram significativas e variáveis entre amostras (2,5 a 8,5%), o que inviabilizou a obtenção de uma constante de correção confiável.

Assim como para a matéria seca, uma forma de corrigir as perdas de energia durante a secagem de amostra de silagens é determinar as concentrações das substâncias voláteis antes e

após este processo, onde os ácidos orgânicos e os alcoóis são os principais compostos voláteis com significado energético, além de aldeídos, ésteres e cetonas (Morgan e Pereira, 1962; Weiß et al., 2009; Chmelová, 2010). Assim, a energia perdida pode ser quantificada multiplicando-se a quantidade perdida de cada composto pelo seu respectivo calor de combustão.

O método utilizado para estimar o valor energético de alimentos adotado pela última versão do NRC Gado de Leite (2001) considerou a composição química dos alimentos. As justificativas para adoção deste método foram: (1) alguns dos valores de NDT determinados experimentalmente, disponíveis em tabelas de composição de alimentos, provêm de experimentos conduzidos há muitos anos; (2) os valores de NDT tabelados podem não corresponder à composição de nutrientes do alimento correlacionado; (3) o valor de NDT publicado foi somente aproximado quando a composição de nutrientes do alimento foi essencialmente a mesma do alimento utilizado no experimento de digestibilidade. As equações utilizadas para estimar os valores de NDT_{1x} (nutrientes digestíveis totais em nível de manutenção) foram adaptadas de Weiss et al. (1992). Diferentemente das edições anteriores, o teor de NDT_{1x} dos alimentos foi estimado pela soma das frações verdadeiramente digestíveis de carboidratos não fibrosos, proteína bruta, ácidos graxos ($\times 2,25$) e fibra em detergente neutro, subtraída das perdas metabólicas fecais (7%). No entanto, não houve correção para compostos energéticos voláteis perdidos na secagem convencional dos alimentos (estufa a 60°C). Teoricamente, quando o teor de matéria seca dos alimentos é determinado por destilação com tolueno, os compostos voláteis (ácidos orgânicos, álcoois, etc.) são incorporados à fração carboidratos não fibrosos (CNF) e assim tratados matematicamente para determinação dos valores de NDT_{1x} , energia digestível, energia metabolizável e energia líquida. No caso de alimentos ricos em compostos voláteis com calores de combustão diferentes daquele dos carboidratos, como por exemplo, o etanol, provavelmente estes cálculos resultariam em valores distorcidos. Outra falha seria a aplicação do coeficiente de digestibilidade dos CNF para a fração volátil. Normalmente os produtos de fermentação são completamente absorvidos antes de atingirem o duodeno (Rupp et al., 1994).

Em ensaios de digestibilidade in vivo também é possível estimar o NDT dos alimentos. Neste caso é possível contabilizar a fração volátil de várias formas na equação de NDT. A maneira mais simples seria incluí-los na fração CNF, assim como no modelo do NRC (2001). Outra opção consiste em adicionar mais um termo (“*voláteis*”) na fórmula do NDT e assim considerá-los totalmente digestíveis. Por fim, é possível subdividir a fração volátil em seus

respectivos compostos (ex. etanol, ácido acético, etc) e multiplicar cada termo adicional pela razão entre o calor de combustão do composto e o calor de combustão dos carboidratos.

2.4 Utilização de ácidos orgânicos e etanol pelo animal

Quando a silagem é retirada do silo e, conseqüentemente, exposta ao ar, parte destes compostos é perdida por volatilização ou oxidada por microrganismos aeróbios. No entanto, quando consumidos, os produtos de fermentação de silagens podem ter importância nutricional significativa, já que possuem alto equivalente energético por unidade de massa (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores de calor de combustão dos principais produtos de fermentação de silagens

Composto	Calor de combustão (kcal/g)	Composto	Calor de combustão (kcal/g)
Ácido láctico	3,7	Lactato de etila	6,5
Ácido acético	3,7	2,3-Butanodiol	6,6
Ácido propiônico	5,1	Etanol	7,1
Metanol	5,4	Propanol	8,1
Acetato de etila	5,6	Pentanal	8,5
1,2-Propanodiol	5,8	2-Butanol	8,7
Ácido butírico	6,1	Hexanal	8,9

Fonte: Adaptado de Clymer (2004).

No ruminorretículo, os AGV da silagem são incorporados ao pool ruminal de AGV, removidos por absorção e passagem (Peters et al., 1990; Resende Júnior et al., 2006) e utilizados pelos tecidos como energia metabolizável (MacLeod e Orskov, 1984; Bergman, 1990; Orskov, 1995). Dentre os principais AGV, apenas o butirato é significativamente metabolizado pelo epitélio ruminal, antes de atingir a circulação portal (Kristensen et al., 2000; Kristensen e Harmon, 2004). Como silagens de alta qualidade possuem baixo teor de ácido butírico, os AGV oriundos de silagens contribuem para o pool de nutrientes no sangue portal.

Além dos AGV, silagens são ricas em ácido láctico. No rúmen, o lactato pode ser absorvido ou convertido à AGV (Waldo e Schultz, 1956; Hueter et al., 1956). Quando absorvido, o lactato é utilizado como substrato para gliconeogênese hepática (Reynolds et al., 1988).

Entretanto, cerca de 80% do lactato é convertido à propionato pela via do acrilato, majoritariamente por *Megasphaera elsdenii* (Counotte et al., 1983; Stewart e Bryant, 1988). Nesta via, o lactato é esterificado pela coenzima-A, desidratado e, subsequentemente, reduzido por uma flavoproteína. Após o desligamento da coenzima-A, obtém-se o propionato. Esta rota não inclui passos de carboxilação ou descarboxilação e a síntese de ATP não foi demonstrada (Russell e Wallace, 1988), o que pode diminuir a síntese microbiana e o fluxo duodenal de nitrogênio não-amoniacal (NNA) quando carboidratos fermentescíveis são substituídos por ácido láctico (Jaakkola et al., 2006; Jaakkola e Huhtanen, 1989) (Tabela 9). Por outro lado, o ambiente ruminal utiliza dois elétrons por mol de lactato convertido à propionato, resultando em produto mais energético (378 kcal/mol propionato) do que seu substrato (336 kcal/mol de lactato) e contribuindo para o tamponamento do pH ruminal (Tabela 9). A menor concentração de lactato no fluido ruminal de animais recebendo infusão de ácido láctico (Jaakkola e Huhtanen, 1989) se deve a adaptação da microbiota e consequente aumento no metabolismo deste intermediário da fermentação ruminal (Huntington e Britton, 1979).

Ainda em relação à síntese de proteína microbiana, Rinne et al. (2009) realizaram meta-análise para avaliar a necessidade de adoção de fatores de correção, relativos ao suprimento de energia para os microrganismos ruminais, via produtos de fermentação de silagens. A aplicação de desconto relativo ao conteúdo de ácidos orgânicos das silagens inflacionou o erro de predição da produção de proteína do leite. Os possíveis prejuízos em síntese microbiana poderiam ser parcialmente compensados pela economia de aminoácidos para gliconeogênese, devido o maior aporte esplênico de propionato, causado pelo consumo de silagens ricas em ácido láctico. As menores concentrações de glicose plasmática em vacas leiteiras alimentadas com silagens de capim restritamente fermentadas (alto teor de açúcares, precursores de acetato no rúmen) em relação àquelas recebendo silagens devidamente fermentadas (alto teor de ácido láctico) (Miettinen e Huhtanen, 1997), suportam a hipótese que o suprimento de glicose pode ser mais limitante do que o suprimento de aminoácidos para animais alimentados com silagens pouco fermentadas. Com a meta-análise, Rinne et al. (2009) concluíram que a inclusão de elementos novos e teoricamente corretos em sistemas de avaliação protéica, como por exemplo, o fator de desconto para produtos de fermentação, não melhoraria os modelos de predição.

Tabela 9 - Alterações causadas pela adição de ácido láctico na ração

	Dieta			<i>P</i>
	Sacarose	Sac.+Ác. láctico	Ác. láctico	Linear
<i>Rúmen</i>				
pH	5,93	6,15	6,44	<0,05
NH ₃ , mM	9,64	11,21	9,29	NS
Ác. láctico, mM	6,05	1,37	0,55	<0,05
AGV, mM	111,1	118,3	108,5	NS
Ác. acético, mmol/mol	593	599	609	NS
Ác. propiônico, mmol/mol	179	225	226	<0,05
Ác. butírico, mmol/mol	189	144	134	<0,05
Protozoários, 10 ⁵ /mL	6,8	5,8	4,1	<0,10
<i>Duodeno</i>				
Fluxo de NNA, g/d	97,9	96,0	90,9	<0,05
Fluxo N mic, g/d	67,4	69,4	66,8	NS
N mic/MOFR, g/kg	29,5	30,1	28,9	NS
NNA/Consumo N	0,84	0,83	0,79	<0,05

Fonte: Adaptado de Jaakkola e Huhtanen (1989).

Ekern e Reid (1963) utilizaram novilhos da raça holandesa para comparar a eficiência de utilização da energia proveniente de silagem ou feno, produzidos ao mesmo tempo da mesma cultura. Os tratamentos utilizados foram (1) feno, (2) silagem e (3) feno suplementado com infusões ruminais de ácido láctico (10% da MS consumida). O tratamento feno induziu maior proporção de acetato e menores proporções de propionato e butirato comparativamente aos tratamentos silagem e feno suplementado com ácido láctico. Embora as porcentagens de energia retidas fossem ligeiramente superiores para os novilhos consumindo silagem e feno suplementado com ácido láctico, as digestibilidades da energia bruta foram similares entre os tratamentos.

O etanol, também encontrado em silagens (Morgan e Pereira, 1962; Zopollatto et al., 2009), é um composto com alto conteúdo energético (Tabela 8). Quando consumido pelos animais, o etanol pode ser absorvido ou metabolizado pelos microrganismos ruminais (Jean-Blain et al., 1992; Moomaw e Hungate, 1963).

Durix et al. (1991) infundiram etanol marcado com ^{14}C em simulador ruminal de fluxo semi-contínuo (Rusitec). A digestibilidade dos substratos sólidos não foi alterada pela suplementação de etanol. Porém, a produção de AGV foi aumentada em até 40%, sendo que o acetato representou 80% dos AGV formados a partir do etanol. A maior parte dos equivalentes redutores (elétrons) desta oxidação foi utilizada pelos microrganismos metanogênicos para reduzir CO_2 à CH_4 . Os autores especularam que este processo é influenciado pela pressão parcial de H_2 (P_{H_2}) do ambiente ruminal, pois com o aumento da P_{H_2} , muitas cepas de bactérias não podem transformar acetil-coA em acetato, levando a formação de etanol (elétron *sink*). A síntese de proteína microbiana foi diminuída com a suplementação de etanol, apesar da digestibilidade dos substratos sólidos permanecer inalterada. Como não foi verificada a presença de ^{14}C na fase gasosa, a maior parte do etanol foi absorvida (Durix et al., 1991).

Embora algumas espécies de microrganismos ruminais sejam afetadas negativamente por etanol (Caldwell e Murray, 1986), este álcool poderia desencadear efeitos favoráveis ao ambiente ruminal. No experimento conduzido por Chalupa et al. (1964), a digestibilidade *in vitro* da celulose foi aumentada em 6% pela adição de etanol na dose de 2% da matéria seca. Para justificar este ganho, os autores se apoiaram na idéia que o etanol é fonte de energia prontamente disponível para os microrganismos. Além disso, o fornecimento de elétrons pela oxidação do etanol à acetato poderia, supostamente, diminuir o potencial redox (E_h) do fluido ruminal, encurtar a fase lag de crescimento e acelerar a atividade dos microrganismos. Todavia, em experimento adjacente com vacas canuladas, a concentração ruminal de amônia atingiu pico significativamente superior e os autores especularam que o etanol diminuiu a atividade microbiana e, conseqüentemente, a utilização de amônia para síntese protéica.

Em experimento realizado por pesquisadores japoneses, quatro novilhos canulados alimentados com rações ricas em concentrado foram utilizados para investigar os efeitos do etanol (5,65% da MS) no metabolismo ruminal. Não foram observados efeitos no pH e no E_h , enquanto as concentrações de acetato e amônia foram superiores para o tratamento etanol. As populações de protozoários ruminais foram marcadamente reduzidas pelo consumo de álcool (Otsuki et al., 1991).

Além do aumento no fluxo de ácido acético promovido pela suplementação de etanol, outro fator de destaque, pode estar relacionado ao teor de gordura do leite de ruminantes. Gould (2000) realizaram experimento com ovinos canulados, no rúmen, no duodeno e no íleo,

suplementados com 2% de etanol em dieta rica em forragens. Além de estimular a degradação ruminal da matéria orgânica e da proteína, o etanol diminuiu a proporção de intermediários da biohidrogenação no fluxo duodenal de ácidos graxos. O suprimento adicional de elétrons pela oxidação de etanol à acetato pode ter estimulado a biohidrogenação ruminal. No trabalho de Randby et al. (1999) a suplementação de etanol diminuiu a proporção dos ácidos graxos C18:1 e C18:2 e aumentou o teor de gordura do leite. Plascencia et al. (1999) sugeriu que a biohidrogenação ruminal foi diretamente proporcional à produção de metano, o que também é frequentemente observado nos experimentos com a suplementação de etanol (Tabela 10).

Tabela 10 - Efeito do etanol nas produções de AGV e metano (in vitro)

	<u>Etanol suplementado (mmol)</u>	
	0	34
Etanol metabolizado em 24 h (mmol)	-	13,4
% Etanol metabolizado	-	39,4
Metano (mmol)	14,4	21,3*
Acetato (mmol)	32,2	45,2*
Diferença acetato (mmol)	-	13,0
Propionato (mmol)	13,6	13,2
Butirato (mmol)	3,8	4,1
AGV (mmol)	49,6	62,5*

Fonte: Adaptado de Yoshii et al. (2005).

Kristensen et al. (2007) avaliaram o metabolismo de alcoóis oriundos de silagens em vacas leiteiras. Parte dos alcoóis foi metabolizada pelos microrganismos ruminais e/ou pelo epitélio ruminal e parte foi absorvida. Da fração absorvida, a maior parte foi metabolizada pelo fígado (Tabela 11). Em outro estudo da mesma equipe (Raun e Kristensen, 2009), o metabolismo de etanol foi avaliado em vacas leiteiras recém paridas. Com o avançar da lactação, o consumo de matéria seca e de etanol aumentou, mas a recuperação portal de etanol diminuiu, provavelmente pela adaptação ruminal (microrganismos e epitélio).

Tabela 11 - Metabolismo ruminal e esplâncnico de etanol em vacas leiteiras

Referência	Kristensen et al. (2007)	Raun e Kristensen (2009)		
Dias em lactação	257	4	15	29
Consumo de MS (kg/d)	15,8	14,7	16,5	19,7
Etanol na dieta (% MS)	1,42	1,9	1,9	1,9
Etanol no rúmen (mM)	2,86	3,2	3,3	2,8
Recuperação portal (%)	-	39%	28%	24%
Fluxo portal líquido (mmol/h)	113	71	97	114
Fluxo hepático líquido (mmol/h)	-131	-	-	-
Fluxo esplâncnico líquido (mmol/h)	-18	-	-	-
Concentração arterial (mM)	0,165	0,046	0,073	0,074

Pradham e Hemken (1970) também encontraram maiores taxas de metabolização de etanol pelo fluido ruminal de vacas adaptadas à este álcool. No mesmo trabalho, as rações com maiores teores de concentrados também induziram maiores taxas de oxidação do etanol. O fenômeno da adaptação pode ocorrer por aumento da população microbiana e/ou da atividade enzimática nas unidades consumidoras de etanol (células microbianas ou células do epitélio ruminal).

Nos trabalhos dinamarqueses, o metabolismo de etanol pelos microrganismos ruminais, pelo epitélio ruminal e pelo fígado resultaram em baixas concentrações arteriais (Tabela 11). Nos dois experimentos não houve indícios de saturação do metabolismo hepático de etanol, visto as baixas concentrações arteriais deste composto. Considerando os parâmetros da cinética de Michaelis-Menten ($V_{\max}$ e K_m) obtidos em ovinos, e a dose de etanol potencialmente consumível por ruminantes via silagem, Jean-Blain et al. (1992) concluíram que, em condições normais, os sistemas enzimáticos relacionados ao metabolismo de etanol (microrganismos, epitélio ruminal e fígado) não seriam saturados e a concentração plasmática de etanol sempre seria baixa.

Tendo em vista a conversão de etanol à acetato, a tabela 12 apresenta valores teóricos de energia metabolizável (EM) e energia líquida de lactação (ELI) de misturas contendo etanol e acetato absorvidas por ruminantes. Nesta simulação, o ácido acético foi considerado o único produto da oxidação parcial do etanol. Considerando a recuperação portal de 1/4 para o etanol, em vacas bem adaptadas (Raun e Kristensen, 2009), é de se esperar que a ELI deste composto se

apresente próxima à 2,9 Mcal/kg. Do ponto de vista da conservação de energia líquida, 1 kg de etanol é gerado no silo as custas de aproximadamente 2 kg de sacarose (McDonald et al., 1991), que contém 4,5 Mcal de ELI (2 x 2,26 Mcal/kg; NRC, 2001). Assim, a fermentação alcoólica gera perda de ELI da ordem de 35% $[(4,5 - 2,9) / 4,5]$. Esta proporção pode ser ainda maior se o fato da volatilização for considerado.

Tabela 12 - Conteúdo energético teórico de misturas de etanol e ácido acético absorvidas por ruminantes

Etanol, %	100	75	50	25	0
Ác. acético, %	0	25	50	75	100
EM, Mcal/kg	7,10	6,25	5,40	4,55	3,70
ELI ¹ , Mcal/kg	4,54	4,00	3,46	2,91	2,37
ELI da mistura/Calor de combustão do etanol, %	64%	56%	49%	41%	33%

¹Assumiu-se eficiência de conversão de EM para ELI de 0,64 (Moe et al., 1972; NRC, 2001).

Embora etanol seja metabolizado pelos microrganismos e pelo epitélio ruminal, parte considerável atinge o fígado. Nos hepatócitos operam três rotas de metabolismo do etanol. No citoplasma o etanol é oxidado à acetaldeído pela enzima álcool desidrogenase, e requer a coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo em sua forma oxidada (NAD⁺) para carrear os elétrons. Nos peroxissomas o etanol é oxidado pela catalase e o peróxido de hidrogênio é o aceptor de elétrons. O citocromo P450 2E1 (CYP2E1) presente nos microsossomas, assume papel importante no metabolismo quando o etanol se apresenta em concentrações elevadas. Nas mitocôndrias, o acetaldeído gerado pelas três rotas é metabolizado à acetato pela acetaldeído desidrogenase. Nesta oxidação, a coenzima NAD⁺ também é o aceptor de elétrons (Lieber e Abittan, 1999).

Como resultado, a oxidação hepática do etanol gera excesso de equivalentes redutores. A grande quantidade de NADH, a formação de acetaldeído e o aumento na atividade de enzimas microsossomais, capazes de gerar espécies reativas de oxigênio, estão envolvidos na hepatotoxicidade do etanol (Lieber e Abittan, 1999). A atividade plasmática da enzima gama-glutamil transferase têm sido utilizada como marcador de lesão hepática ocasionada por etanol e outras substâncias (Souza et al., 2004; Tennant e Center, 2008).

A grande quantidade de equivalentes redutores poderia exceder a capacidade hepática de manter a homeostase do potencial redox intracelular, culminando em desordens metabólicas. Grande parte destes equivalentes redutores é transferida para as mitocôndrias levando à diminuição da atividade do Ciclo de Krebs e da oxidação de lipídios, estimulando a síntese de ácidos graxos. Como o suprimento de etanol também favorece a mobilização de ácidos graxos armazenados nos adipócitos, o consumo de álcool pode levar à acúmulo hepático de gordura (Lieber e Abittan, 1999). As menores concentrações plasmáticas de glicose observadas por Pradham e Hemken (1970) após a infusão ruminal de etanol, pode ter ocorrido pelo efeito inibitório do etanol na conversão de propionato à glicose, com concomitante acúmulo intracelular de malato e depleção de fosfoenolpiruvato (Demigné et al., 1991). O efeito inibitório do etanol na gliconeogênese pode ter sido mediado por aumento da razão NADH:NAD^+ intracelular, visto a recuperação da utilização de propionato frente a adição de piruvato, em hepatócitos incubados in vitro (Demigné et al., 1991). Deste modo, o consumo de doses elevadas de etanol seria extremamente indesejável em vacas leiteiras recém paridas, que naturalmente são propensas à cetose e esteatose hepática. Nos Estados Unidos, por exemplo, a adoção comercial de suplementos energéticos líquidos a base de etanol, para vacas recém paridas, tem sido descontinuada por nutricionistas de campo devido à falta de informações científicas.

2.5 Efeitos dos produtos de fermentação de silagens no consumo e no desempenho de animais

O valor nutritivo de silagens difere das mesmas forragens frescas ou desidratadas. As características físicas e químicas particulares das silagens influenciam o consumo de matéria seca, o metabolismo microbiano e visceral e, conseqüentemente, o desempenho animal (Weiss et al., 2003). As principais diferenças nutricionais entre silagens bem produzidas e suas respectivas culturas são os menores teores de carboidratos solúveis e as altas concentrações de ácidos orgânicos, alcoóis e outros compostos orgânicos voláteis. No processo de ensilagem, a proteína verdadeira é parcialmente convertida à nitrogênio não protéico (McDonald et al., 1991), entretanto, as frações nitrogenadas não serão objeto de abordagem no presente estudo.

O desempenho de ruminantes alimentados com rações contendo silagens depende, principalmente, do consumo de matéria seca e do valor nutricional da forragem, normalmente

indicado pela digestibilidade. Da variação total na ingestão de energia digestível, entre animais e alimentos, 60% a 90% está relacionada ao consumo de matéria seca e apenas 10% a 40% à digestibilidade (Mertens, 1994). Ao contrário das forragens frescas ou desidratadas, a correlação entre digestibilidade e o consumo de silagens é fraca, provavelmente pela formação de produtos de fermentação no silo (Huhtanen, 2002).

Diversos estudos contendo meta-análises foram publicados por pesquisadores escandinavos na tentativa de entendimento entre a composição de silagens, o consumo de matéria seca e o desempenho de animais. Nos estudos de Huhtanen et al. (2002, 2003 e 2007) e de Krizsan e Randby (2007), o consumo de silagem e o desempenho de animais foram correlacionados negativamente com a extensão da fermentação no silo (amônia, ácido lático, AGV e ácidos totais). No estudo de Hetta et al. (2007), entretanto, o consumo de silagem foi negativamente correlacionado à concentração de ácido acético, mas positivamente correlacionado à concentração de etanol. Os autores discutiram o possível efeito associativo entre as concentrações de etanol e amônia ($r = -0,67$), já que silagens ricas em açúcar frequentemente apresentam maiores concentrações de etanol e menores teores de amônia (Driehuis e Van Wakselaar, 2000).

Vale ressaltar que correlações obtidas por meta-análise podem, involuntariamente, gerar conclusões errôneas pelo efeito de colinearidade entre variáveis. Um bom exemplo de confundimento é a relação entre pH e ingestão de silagens. Embora vários trabalhos não apresentassem correlação forte entre estas variáveis (Offer et al., 1998; Steen et al., 1998; Huhtanen et al., 2002), o pH tende a ser negativamente correlacionado com o consumo de silagem, pois silagens com pH elevado apresentam maiores concentrações de amônia e maior razão AGV/ácido lático. Além disso, concentrações elevadas de amônia parecem não ser fator causativo per se, mas um marcador de compostos gerados no processo de proteólise (Rook et al., 1990). Por isto, diversos estudos foram conduzidos para demonstrar os efeitos isolados de produtos de fermentação no consumo de alimentos.

Um dos experimentos mais citados sobre o efeito do ácido acético no consumo de silagens foi conduzido por Hutchinson e Wilkins (1971). Partidas de uma mesma silagem de azevém foram tratadas com doses crescentes de ácido acético (2%, 5% e 8,8% da MS) antes do fornecimento para ovinos adultos. O pH e o teor de umidade das silagens foram mantidos constantes pela adição de NaOH e água. O consumo de matéria seca diário efetuado pelos

animais não foi alterado pelos tratamentos, mas, o ácido acético alterou o padrão de consumo ao longo do dia. O tempo de ingestão foi diminuído nas primeiras 4 horas após a alimentação e o inverso ocorreu no período entre 16 e 20 horas após o oferecimento da ração.

Wilkinson et al. (1976) compararam o desempenho de novilhos alimentados com plantas de milho frescas conservadas em freezer ou ensiladas, adicionadas ou não de uma mistura de ácidos acético e lático. A sacarose foi adicionada às forragens não acidificadas para balancear o teor calórico. O processo de ensilagem não afetou o consumo de matéria seca, mas diminuiu o ganho de peso diário. Por outro lado, a mistura de ácidos reduziu o consumo de matéria seca, mas sem afetar o ganho de peso diário. A diminuição de consumo pode ter sido causada pelo método de determinação de matéria seca adotado no experimento (estufa a 70°C).

Krizsan et al. (2006) também suplementaram novilhos com ácido acético, ácido capróico, triptamina ou uma mistura das substâncias. O ácido acético, isolado ou em mistura, reduziu o consumo de matéria seca de silagem. Entretanto, quando o consumo dos compostos foi levado em conta, o consumo de matéria seca diário foi o mesmo para todos os tratamentos. Com este trabalho, pode-se inferir que o método de determinação de matéria seca é o principal determinante do menor consumo de matéria seca de silagens comparativamente à forragens não fermentadas.

Na década de 1990, o interesse pela utilização de resíduos agroindustriais como alimentos para ruminantes se deu de forma crescente. Dentre os subprodutos, encontrava-se o resíduo úmido de grãos de destilaria. Naquela época, o processo de destilação era menos eficiente e este ingrediente continha em média 10% de etanol (Larson et al., 1993). Tal fato despertou interesse de pesquisadores da Universidade de Nebraska (Ham et al., 1994), que compararam o valor nutricional do etanol ao do milho. A substituição de 5% ou 10% do milho por etanol não afetou o consumo de matéria seca e o ganho de peso dos animais (Tabela 12). Com isto, o maior valor energético teórico do etanol frente aos carboidratos não foi demonstrado. A conversão ruminal do etanol à acetato com aumento concomitante na produção de metano seria uma justificativa razoável para esta observação.

Tabela 13 - Efeito do etanol no desempenho de cordeiros

Nível de etanol (% MS)	0	5	10	EPM
Consumo de MS (kg/d)	1,92	2,03	2,03	0,14
Ganho de peso (kg/d)	0,34	0,34	0,34	0,04

Fonte: Adaptado de Ham et al. (1994).

Randby et al. (1999) suplementaram 24 vacas leiteiras da raça Norueguesa Vermelha com 600 g/d de etanol, num experimento de reversão simples e períodos de 9 dias. Quando o etanol foi considerado nos cálculos, o consumo de matéria seca e a produção de leite corrigido para energia foram superiores ao controle, pelas maiores concentrações de gordura e proteína no leite (Tabela 13). A qualidade organoléptica do leite foi reduzida pela incorporação de etanol e outros compostos de aromas e sabores indesejáveis. É possível que o tamanho do período experimental não tenha permitido adaptação completa dos sistemas capazes de metabolizar o etanol, resultando na secreção de leite com menor qualidade sensorial.

Tabela 14 - Efeito do etanol no desempenho de vacas leiteiras

Etanol (g/d)	0	600	EPM	<i>P</i>
CMS (kg/d)	18,5	18,9	0,09	<0,01
Leite (kg/d)	26,9	26,5	0,14	0,08
LeiteCE ¹ (kg/d)	26,5	27,4	0,12	<0,01
Gordura (%)	3,88	4,19	0,26	<0,01
Proteína (%)	3,37	3,47	0,13	<0,01

¹Produção de leite corrigido para energia;
Fonte: Adaptado de Randby et al. (1999).

2.6 Desempenho de animais e a predição por modelos matemáticos

Em diversos experimentos com animais que consumiram forragens conservadas, o desempenho observado foi maior que o desempenho predito por modelos matemáticos. Pedroso (2003) alimentou novilhas holandesas com silagens de cana-de-açúcar, aditivadas ou não, e observou que o ganho de peso médio diário foi 20% superior ao estimado pelo NRC Gado de Leite (2001). Schmidt (2006), avaliando o desempenho de tourinhos Nelore e Canchim

alimentados com silagens de cana-de-açúcar, aditivadas ou não, obteve desempenho animal 12,7% superior ao predito pelo NRC Gado de Corte (1996) (Figura 3). Ribeiro (2007) comparou o desempenho de novilhas de corte alimentadas com silagens de capins tropicais (Marandu e Tanzânia) e notou que o ganho médio diário foi 4,1% superior ao predito pelo NRC Gado de Corte (1996). Mari (2008) também observou ganho de peso 14% superior ao predito pelo NRC Gado de Corte (1996) em bovinos de corte consumindo silagens de cana-de-açúcar.

Apesar da influência de fatores não contemplados nas simulações, estes dados sugerem que as silagens utilizadas nos experimentos citados anteriormente deveriam conter valor nutritivo superior àquele considerado nos cálculos, que desconsideraram os produtos de fermentação volatilizados na secagem das amostras. Os maiores desvios ocorreram nos estudos com silagens de cana-de-açúcar, provavelmente pela maior proporção de compostos voláteis. Tal observação corrobora com os valores preditos de consumo de matéria seca maiores do que os observados, que possivelmente foram subestimados pelo método de determinação de matéria seca usado nos referidos experimentos.

Figura 3 - Ingestão de matéria seca e ganho de peso médio diário estimado pelo NRC (1996) (Valor Predito) e observado (Valor Observado) em tourinhos Nelore e Canchim alimentados com rações contendo silagens de cana-de-açúcar. Fonte: Schmidt (2006)

Referências

AERTS, J.V.; De BRADANDER, D.L.; COTTYN, B.G.; BUYSSE, F.X.; MOERMANS, R.J. Comparison of methods for dry matter determination of high moisture roughages and faeces. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v. 25, p. 619-627, 1974.

ALOMAR, D.; FUCHSLOCHER, R.; STOCKEBRAND, S. Effects of oven- or freeze-drying on chemical composition and NIR spectra of pasture silage. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 80, p. 309-319, 1999.

ANDREAE, M.O.; CRUTZEN, P.J. Atmospheric aerosols: biogeochemical sources and role in atmospheric chemistry. **Science**, Washington, v. 276, p. 1052-1058, 1997.

ATKINS, P.W. **Physical Chemistry**. 5th ed. Oxford University Press: Oxford, 1994. 1031p.

BERGMAN, E.N. Energy contribution of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 70, p. 567-590, 1990.

BERNSTEIN, J.A.; ALEXIS, N.; BACCHUS, H.; BERNSTEIN, I L.; FRITZ, P.; HORNER, E.; LI, N; MASON, S.; NEL, A.; OULLETTE, J.; REIJULA, K.; REPONEN, T.; SELTZER, J.; SMITH, A.; TARLO, S.M. The health effects of nonindustrial indoor air pollution. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Philadelphia, v. 121, p. 585–591, 2008.

CAB (Commonwealth Agricultural Bureaux) **Research Techniques in use at The Grassland Research Institute Hurley**, Bull. 45. Reading: Farnham Royal, , 1961. p. 167. (Research Institute Hurley, Bull. 45)

CALDWELL, D.R.; MURRAY, K. Some effects of ethyl alcohol on the growth of rumen bacteria. **Current Microbiology**, New York, v. 14, p. 193-197, 1986.

CAMPOS, F.P.; NUSSIO, C.M.B.; NUSSIO, L.G. **Métodos de análise de alimentos**. Piracicaba: FEALQ, 2004. 135 p.

CHALUPA, W. ;EVANS, J.L.; STILLIONS, M.C. Influence of ethanol on rumen fermentation and nitrogen metabolism. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 23, p. 802-807, 1964.

CHMELOVÁ, Š. Aldehydes in maize and grass silages. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE CONSERVATION, 14., 2010. Brno, Czech Republic. **Proceedings...** Brno, Czech Republic, 2010. p. 189-191.

CLYMER, J. **Heat of combustion & respiratory quotient calculation**. 2004 Disponível em: <<http://home.fuse.net/clymer/rq/>> Acesso em: 24 set.2008.

COLOVOS, N.F.; KEENER, H. A.; DAVIS, H. A. Errors in drying silage and feces for protein and energy determinations. Improved procedures. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 40, p. 173-179, 1957.

COUNOTTE, G.H.M.; LANKHORST, A.; PRINS, R.A. Role of DL-lactic acid as an intermediate in rumen metabolism of dairy cows. **Journal of Animal Science**, Champaign v. 56, p. 1222-1235, 1983.

DEMIGNÉ, C.; YACOU, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C. Interactions between propionate and amino acid metabolism in isolated sheep hepatocytes. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 65, p. 301-317, 1991.

DEWAR, W.A.; McDONALD, P. Determination of dry matter in silage by distillation with toluene. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 12, p. 790-795, 1961.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; SPOELSTRA, S. F. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 87, p. 583-594, 1999.

DRIEHUIS, F.; van WIKSELAAR, P. G. The occurrence and prevention of ethanol fermentation in high-dry-matter grass silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, p. 711-718, 2000.

DURIX, A.; JEAN-BLAIN, C.; SALLMANN, H.P.; JOUANY, J.P. Use of a semicontinuous culture system (RUSITEC) to study the metabolism of ethanol in the rumen and its effects on ruminal digestion. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 71, p. 115-123, 1991.

EKERN, A.; REID, J.T. Efficiency of energy utilization by young cattle ingesting diets of hay, silage, and hay supplemented with lactic acid. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 46, p.522-529, 1963.

FENTON, T.W.; FENTON, M.; MATHISON, G.W. Determination of water in fermented feeds by gas chromatography. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 61, p. 827-831, 1981.

FOX, D.G.; FENDERSON, C.L. Influence of NPN treatment, oven temperature and drying time on error in determination true corn silage dry matter. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 47, p. 1152-1156, 1978.

FREITAS, A.W.P.; PEREIRA, J.C.; ROCHA, F.C.; COSTA, M.G; LEONEL, F.P.; RIBEIRO, M.D. Avaliação da qualidade nutricional da silagem de cana-de-açúcar com aditivos microbianos e enriquecida com resíduo da colheita de soja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.35, p.38-47, 2006.

GALLETI, G.C.; PICCAGLIA, R. Water determination in silages by Karl Fisher titration. **Journal of the Science and Food Agriculture**, London, v. 43, p. 1, 1988.

GLASS, R. Saponification reaction and determination of water. **Analytical Biochemistry**, v. 37, p. 219-224, 1970.

GOULD, J. **Supplemental ethanol for ruminants consuming forage-based diets**. 2000. 83 p. Thesis (Magister Science) - University of Wyoming, Wyoming, 2000.

HAIGH, P.M.; HOPKINS, J.R. Relationship between oven and toluene dry matter in grass silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 28, p. 477-480, 1977.

HAM, G.A.; STOCK, R.A.; KLOPFENSTEIN, T.J.; LARSON, E.M.; SHAIN, D.H.; HUFFMAN, R.P. Wet corn distillers byproducts compared with dried corn distillers grains with solubles as a source of protein and energy for ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, p. 3246-3257, 1994.

HETTA, M.; CONE, J.W.; BERNES, G.; GUSTAVSSON, A.M.; MARTINSSON, K. Voluntary intake of silages in dairy cows depending on chemical composition and in vitro gas production characteristics. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 106, p. 47-56, 2007.

HOOD, R.L.; ALLEN, C.E.; GOODRICH, R.D.; MEISKE, J.C. A rapid method for the direct chemical determination of water in fermented feeds. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 33, p. 1310-1314, 1971.

HUETER, F.G.; SHAW, J.C.; DOETSCH, R.N. Absorption and dissimilation of lactates added to the bovine rumen and the resulting effects on blood glucose. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 39, p. 1430-1437, 1956.

HUHTANEN, P. New developments in the prediction of intake of silage based diets. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 13., 2002. Scotland **Proceedings...** Scotland, 2002. p. 236-251.

HUHTANEN, P.; KHALILI, H.; NOUSIAINEN, J.I.; RINNE, M.; JAAKKOLA, S.; HEIKKILÄ, T.; NOUSIAINEN, J. Prediction of the relative intake potential of grass silage by dairy cows. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 73, p. 111-130, 2002.

HUHTANEN, P.; NOUSIAINEN, J.I.; KHALILI, H.; JAAKKOLA, S.; HEIKKILÄ, T. Relationships between silage fermentation characteristics and milk production parameters: analysis of literature data. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 81, p. 57-73, 2003.

HUHTANEN, P.; RINNE, M.; NOUSIAINEN, J. Evaluation of the factors affecting silage intake of dairy cows: a revision of the relative silage dry-matter intake index. **Animal, Cambridge**, v. 1, p. 758-770, 2007.

HUNTINGTON, G.B.; BRITTON, R.A. Effect of dietary lactic acid on rumen lactate metabolism and blood acid-base status of lambs switched from low to high concentrate diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 49, p. 1569-1576, 1979.

HUTCHINSON, K.J.; WILKINS, R.J. The voluntary intake of silage by sheep II. The effects of acetate on silage intake. **The Journal of Agriculture Science**, London, v. 77, 539-543, 1971.

JAAKKOLA, S.; HUHTANEN, P. The effect of lactic acid on the microbial protein synthesis in the rumen of cattle. **American Journal of Applied Sciences**, Vails Gate, v. 2, p. 398-399, 1989.

JAAKKOLA, S.; KAUNISTO, V.; HUHTANEN, P. Volatile fatty acid proportions and microbial protein synthesis in the rumen of cattle receiving grass silage ensiled with different rates of formic acid. **Grass and Forage Science, Oxford**, v. 61, p. 282-292, 2006.

JEAN-BLAIN, C.; DURIX, A.; TRANCHANT, B. Kinetics of ethanol metabolism in sheep. **Reproduction, Nutrition, Development**, Paris, v. 32, p. 83-90, 1992.

KRAUTER, C.; BLAKE, D. **Dairy Operations: An Evaluation and Comparison of Baseline and Potential Mitigation Practices for Emissions Reductions in the San Joaquin Valley.**(Final Report) 2009. 87 p.

KRISTENSEN, N.B.; GÄBEL, G.; PIERZYNOWSKI, S.G.; DANFAER, A. Portal recovery of short-chain fatty acids infused into the temporarily-isolated and washed reticulo-rumen of sheep. **The British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 84, p. 477-482, 2000.

KRISTENSEN, N.B.; HARMON, D.L. Splanchnic metabolism of volatile fatty acids absorbed from the washed reticulorumen of steers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 82, p. 2033-2042, 2004.

KRISTENSEN, N.B.; STORM, A.; RAUN, B.M.L.; ROJEN, B.A.; HARMON, D.L. Metabolism of silage alcohols in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 90, p. 1364-1377, 2007.

KRIZSAN, S.J.; RANDBY, A.T. The effect of fermentation quality on the voluntary intake of grass silage by growing cattle fed silage as sole feed. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 85, p. 984-996, 2007.

KRIZSAN, S.J.; RANDBY, A.T.; WESTAD, F. The effect of acetic acid, caproic acid and tryptamine on voluntary intake of grass silage by growing cattle. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM FORAGE CONSERVATION, 12., 2006. Brno, Czech Republic **Proceedings...** Brno, Czech Republic, 2006. p. 143-145.

LARSON, E.M.; STOCK, R.A.; KLOPFENSTEIN, T.J.; SINDT, M.H.; HUFFMAN, R.P. Feeding value of wet distillers byproducts for finishing ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 71, Champaign, p. 2228-2236, 1993.

LIEBER, C.S.; ABITTAN, C.S. Pharmacology and metabolism of alcohol, including its metabolic effects and interactions with other drugs. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 17, p. 365-379, 1999.

MacLEOD, N.A.; ORSKOV, E.R. Absorption and utilization of volatile fatty acids in ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 64 (Suppl.), p. 354-355, 1984.

MARI, L.J. **Desempenho de bovinos de corte alimentados com rações contendo cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) fresca ou ensilada e o padrão de fermentação e a estabilidade aeróbia das silagens aditivadas.** 2008. 315 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

McDONALD, P.; DEWAR, W.A. Determination of dry matter and volatiles in silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 11, p. 566-570, 1960.

McDONALD, P.; HENDERSON, N.; HERON, S. **The biochemistry of silage**. 2nd ed. Marlow:Chalcombe Publications, 1991. 340 p.

MENDELL, M.J. Indoor residential chemical emissions as risk factors for respiratory and allergic effects in children: A review. **Indoor Air**, Copenhagen, v. 17, p. 259-277, 2007.

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

MIETTINEN, H.O.; HUHTANEN, P. Effects of silage fermentation and post-ruminal casein supplementation in lactating dairy cows. 2. Energy metabolites and amino acids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 74, p. 459–468, 1997.

MIRANDA, D.C.L. **Perdas de matéria seca em silagem de cana-de-açúcar tratada com aditivos químicos e microbiológicos**. 2006. 74 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

MITLOEHNER, F.M.; MALKINA, I.L.; KUMAR, A.; GREEN, P.G. Volatile organic compounds emitted from dairy silages and other feeds. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE PROCEEDINGS,15., 2009. Madison. **Proceedings...** Madison, 2009. p. 15-26.

MOE, P.W.; FLATT, W.P.; TYRRELL, H.F. The net energy value of feeds for lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 55, p. 945– 958, 1972.

MONTES, F.; HAFNER, S.; ROTZ, C.A. Characterization and measurement of VOC emissions from silage. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE PROCEEDINGS,15., 2009. Madison. **Proceedings...** Madison, 2009.p. 273-274,

MOOMAW, C.; HUNGATE, R.E. Ethanol conversion in the bovine rumen. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 85, p. 721-7222, 1963.

MORGAN, M.E.; PEREIRA, R.L. Volatile constituents of grass and corn silage. I. Steam distillates. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 45, p. 457-466, 1962.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Estimating mortality risk reduction and economic benefits from controlling ozone air pollution**. Washington, D.C:National Academies Press, 2008. 226p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients Requirements of Beef Cattle**. 7th ed. Washington, DC: National Academy Press, 1996. 242 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients Requirements of Dairy Cattle**. 7th rev. ed. Washington, DC: National Academy Press, 2001. 381 p.

OFFER, N.W.; PERCIVAL, D.S.; DEWHURST, R.J.; THOMAS, C. Prediction of the voluntary intake potential of grass silage by sheep and dairy cows from laboratory silage measurements. **Animal Science**, Cambridge, v. 66, p. 357-367, 1998.

ORSKOV, E. R. Utilization of short-chain fatty acids in ruminants. In: CUMMINGS, J. H.; ROMBEAU, L.; SAKATA, T. **Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids**. Cambridge: Cambridge University, 1995. p. 243-256.

OTSUKI, K.; KOBAYASHY, T.; MATSUMOTO, M.; ITABASHI, H. Effects of ethanol on rumen fermentation pattern in steers fed a diet high in concentrate. **Bulletin of National Institute of Animal Industry**, Tokyo, v. 51, p. 9-15 1991.

OWENS, F.; COOPER, D.P.; GOODRICH, R.D.; MEISKE, J.C. Bomb calorimetry of high-moisture materials. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 52, p. 1273-1277, 1969.

PAHLOW, G.; MUCK, R. E.; DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; SPOELSTRA, S. F. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Ed.) **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America, 2003. p. 31-94.

PEDROSO, A.F. **Aditivos químicos e microbianos no controle de perdas e na qualidade de silagem de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2003. 120 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

PERKINS, A.E. Dry matter determination in green plant material and in silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 26, p. 545-551, 1943.

PETERS, J.P.; SHEN, R.Y.W.; CHESTER, S.T. Propionic acid disappearance from the foregut and small intestine of the beef steer. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, p. 3905-3913, 1990.

PETIT, H.V.; LAFRANIERE, C.; VEIRA, D.M. A comparison of methods to determine dry matter in silages. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 558-562, 1997.

PLASCENCIA, A.; ESTRADA, M.; ZINN, R.A. Influence of free fatty acids content on feeding value of yellow grease in finishing diets for feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 77, p. 2603-2609, 1999.

PORTER, M.G.; MURRAY, R.S. The volatility of components of grass silage on oven drying and the inter-relationship between dry-matter content estimated by different analytical methods. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 56, p. 405-411, 2001.

PRADHAM, K.; HEMKEN, R.W. Utilization of ethanol and its effect on fatty acid patterns in ruminants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 53, p. 1739-1746, 1970.

RANDBY, Å.T.; SELMER-OLSEN, I.; BAEVRE, L. Effect of ethanol in feed on milk flavor and chemical composition. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 82, p. 420-428, 1999.

RAUN, B.M.L.; KRISTENSEN, N.B. Portal absorption of ethanol and propanol in early lactating dairy cows. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RUMINANT PHYSIOLOGY, 11., 2009. Clermont-Ferrand, , **Proceedings**.... Clermont-Ferrand, 2009. p. 338-339.

RESENDE JÚNIOR, J.C.; PEREIRA, M.N.; BÔER, H.; TAMMINGA, S. Comparison of techniques to determine the clearance of ruminal volatile fatty acids. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 89, p. 3096-3106, 2006.

REYNOLDS, C.K.; HUNTINGTON, G.B.; TYRRELL, H.F.; REYNOLDS, P.J. Net Portal-Drained Visceral and Hepatic Metabolism of Glucose, L-Lactate, and Nitrogenous Compounds in Lactating Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, p.1803-1812, 1988.

RIBEIRO, J.L. **Silagens de capins Marandu e Tanzânia avaliadas quanto às perdas de conservação, perfil fermentativo, valor nutritivo e desempenho de animais, na presença de aditivos químicos, microbianos e fontes absorventes de umidade**. 2007. p. 261. Tese (Doutor em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

RINNE, M.; NOUSIAINEN, J.; HUHTANEN, P. Effects of silage protein degradability and fermentation acids on metabolizable protein concentration: A meta-analysis of dairy cow production experiments. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 92, p. 1633–1642, 2009.

ROOK, A. J.; DHANOA, M. S.; GILL, M. Prediction of the voluntary intake of grass silages by beef cattle. 2. Principle component and ridge regression analysis. **Animal Production**, Collingwood, v. 50, p. 439-454, 1990.

RUPP, G.P.; KREIKEMEIER, K.K.; PERINO, L.J.; ROSS, G.S. Measurement of volatile fatty acid disappearance and fluid flux across the abomasum of cattle, using an improved omasal cannulation technique. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 55, p. 522-529, 1994.

RUSSELL, J.B., WALLACE, R.J. Energy yielding and consuming reactions. In: HOBSON, P.N. **The rumen microbial ecosystem**. London:Elsevier Science Publishers,1988. p. 185-215.

SCHMIDT, P. **Perdas fermentativas na ensilagem, parâmetros digestivos e desempenho de bovinos de corte alimentados com rações contendo silagens de cana-de-açúcar**. 2006. 228 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

SOUZA, R.G.; BIRGEL JUNIOR, E.H.; AYRES, M.C.C.; BIRGEL, E.H. Influência dos fatores raciais na função hepática de bovinos das raças Holandesa e Jersey. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 41, p. 306-312, 2004.

SPOELSTRA, S.F.; COURTIN, M.G.; van BEERS, J.A.C. Acetic acid bacteria can initiate aerobic deterioration of whole crop maize silage. **Journal of Agriculture Science**, London, v. 111, p. 127-132, 1988.

STEEN, R.W.J.; GORDON, F.J.; DAWSON, L.E.R.; PARK, R.S.; MAYNE, C.S.; AGNEW, R. E.; KILPATRICK, D.J.; PORTER, M.G. Factors affecting the intake of grass silage by cattle and prediction of silage intake. **Animal Science**, Cambridge, v. 66, p. 115-127, 1998.

STEWART, C.S.; BRYANT, M.P. The rumen bacteria. In: HOBSON, P. N. **The rumen microbial ecosystem**. London: Elsevier Science Publishers, 1988. p. 21-73.

STONE, J.B.; TRIMBERGER, G.W.; HENDERSON, C.R.; REID, J.T.; TURK, K.L.; LOOSLI, J.K. Forage intake and efficiency of feed utilization in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 43, p. 1275-1281, 1960.

TENNANT, B.C.; CENTER, S.A. Hepatic function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6th ed. San Diego:Elsevier, 2008. p. 379-412.

U.S. CLIMATE CHANGE SCIENCE PROGRAM. 2008. **The effects of climate change on agriculture, land resources, water resources, and biodiversity in the United States**. Synthesis and Assessment Product 4.3. 2008. p. 43.

UNDERSANDER, D.; MERTENS, D.R.; THIEX, N. Method 2.3.1 Toluene determination of moisture.. In: **Forage Analysis Procedures**. Omaha: National Forage Testing Association, 1993. p. 49-51

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. Ithaca: Cornell University, 1994. 476 p.

WALDO, D.R.; SCHULTZ, L.H. Lactic acid production in the rumen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 39, p. 1453-1460, 1956.

WEIß, K.; KALZENDORF, C.; ZITTLAU, J.; AUERBACH, H. Novel results on the occurrence of volatile compounds in maize silages. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE PROCEEDINGS,15., 2009. Madison. , **Proceedings...** Madison, 2009. p. 33-34.

WEISS, W.P.; CHAMBERLAIN, D.G.; HUNT, C.W. Feeding Silage. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America, 2003. p. 469-504.

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

WEISSBACH, F. Correction of dry matter content of silages used as substrate for biogas production. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE PROCEEDINGS, 15., 2009. Madison. **Proceedings....** Madison, 2009. p. 483-484.

WILKINSON, J.M.; HUBER, J.T.; HENDERSON, H.E. Acidity and proteolysis as factors affecting the nutritive value of corn silage. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 42, p. 208-218, 1976.

WILSON, R.F.; TILLEY, J.M.A.; STEEMERS, M.A.T. Comparison of oven drying and toluene distillation in the determination of the dry-matter content of silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 15, p. 197-200, 1964.

YOSHII, T.; ASANUMA, N.; HINO, T. Effect of ethanol on nitrate and nitrite reduction and methanogenesis in the ruminal microbiota. **Animal Science Journal**, London, v. 76, p. 37-42, 2005.

ZOPOLLATTO, M.; DANIEL, J.L.P.; NUSSIO, L. G. Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, p.170-189, 2009 (supl. especial).

3 A CONTRIBUIÇÃO ENERGÉTICA DE ETANOL OU ÁCIDO LÁTICO EM RAÇÕES CONTENDO SILAGEM DE MILHO

Resumo

Os principais produtos de fermentação de silagens são os ácidos orgânicos e os alcoóis. Dentre estes, o ácido láctico e o etanol são os principais compostos passíveis de serem metabolizados pelos microrganismos e alterarem o ambiente ruminal. O objetivo deste experimento foi avaliar o consumo de alimentos e o processo de digestão de bovinos suplementados com ácido láctico ou etanol. Seis novilhos da raça Nelore, providos de cânulas ruminais, foram agrupados em dois Quadrados Latinos 3x3 e alojados em gaiolas metabólicas individuais. Os tratamentos dietéticos foram: controle (C) – 60% silagem de milho e 40% concentrado; etanol (E) – 60% silagem de milho adicionada de 2,8% de etanol (% MS) e 40% concentrado e; ácido láctico (L) – 60% silagem de milho adicionada de 5,4% de ácido láctico (% MS) e 40% concentrado. Cada período experimental teve duração de 14 dias, sendo nove de adaptação e os últimos cinco dias de coletas. Imediatamente após o descarregamento do silo, os aditivos foram aspergidos na silagem para prover cerca de 20 kcal/kg de MS de silagem. O teor de MS das silagens foi equiparado por adição de água. O consumo de matéria seca foi similar ($P = 0,41$) entre os tratamentos ($C = 11,83$; $E = 11,63$; $L = 11,70$ kg/d). Não foram detectadas diferenças no comportamento ingestivo, na seleção de partículas, na degradação ruminal, na digestibilidade aparente, na excreção urinária de derivados de purinas, no pH, redox, pressão parcial de H_2 e concentração total de AGV no fluido ruminal, nas taxas fracionais de passagem de sólidos e líquidos, na remoção ruminal de valerato e na absorção de energia metabolizável proveniente dos AGV ruminais. A maior concentração ruminal de amônia foi a única alteração causada pelo tratamento etanol ($P < 0,01$). O enriquecimento da ração com ácido láctico elevou o pH ruminal ($P = 0,01$) e diminuiu a razão acetato/propionato ($P < 0,01$). Quando o método de determinação do teor de matéria seca foi a desidratação em estufa a $105^{\circ}C$, os valores de NDT foram, em média, 1,5 a 1,6 unidades percentuais inferiores àqueles obtidos pelos cálculos utilizando a matéria seca determinada por destilação com tolueno. A adição de etanol ou ácido láctico em rações contendo silagem de milho não alterou o consumo de alimentos e o processo de digestão. A fração volátil da silagem de milho deve ser considerada no valor energético desta forragem.

Palavras-chave: Silagem de milho; Consumo; Matéria seca; NDT

Abstract

Organic acids and alcohols are the major fermentation end-products from silages. Among those silage compounds, lactic acid and ethanol are the mainly metabolized by rumen microbes and may alter the digestion process. The objective of this study was to determine whether lactic acid and ethanol affect feed intake and digestion in cattle. Six rumen-cannulated Nelore steers were grouped in two 3x3 Latin squares with 14-d periods and housed in a tie-stall barn. Treatments were: Control – 60% corn silage plus 40% concentrates; ethanol – 60% corn silage added with 2.8% ethanol (DM basis) plus 40% concentrates and; lactic acid – 60% corn silage added with 5.4% lactic acid (DM basis) plus 40% concentrates. After silo unload, additives were sprayed onto the corn silage to supply 20 kcal/kg of silage DM, mixed to concentrates and fed once daily. DM content of control silage was adjusted by water addition. The DM intake was similar ($P = 0.41$) across treatments (control = 11.83; ethanol = 11.63; lactic acid = 11.70 kg/d). There were no differences on ingestive behavior, feed sorting index, rumen degradation, apparent digestibility, urinary purine derivative excretion, rumen pH, rumen redox, rumen P_{H_2} , total VFA concentration, solid and fluid passage rate, clearance of valerate and daily absorption of metabolizable energy from rumen VFA. The higher concentration of rumen ammonia was the only change caused by ethanol treatment ($P < 0.01$). Diet enrichment with lactic acid increased rumen pH ($P = 0.01$) and decreased acetate/propionate ratio ($P < 0.01$). When the DM content of diets was determined by oven at 105°C the TDN values averaged 1.5 to 1.6 units lower than that calculated by using DM achieved by toluene distillation. Lactic acid and ethanol supplementation did not alter DM intake and digestion process. However, the volatile fraction from corn silage should be considered on silage energy value.

Keywords: Corn silage, Intake, Dry matter, TDN

3.1 Introdução

Os principais produtos de fermentação de silagens são os ácidos orgânicos e os alcoóis (Weiß et al., 2009). Dentre estes, o ácido láctico e o etanol são os principais compostos passíveis de serem metabolizados pelos microrganismos e, conseqüentemente, alterarem o ambiente ruminal. Além da contribuição energética direta para os tecidos, estes compostos poderiam contribuir indiretamente para o desempenho animal, por alteração do consumo de alimentos e do processo de digestão (Weiss et al., 2003).

O metabolismo ruminal de lactato à propionato (Hueter et al., 1956) leva à formação de produto final com calor de combustão superior ao substrato. Neste processo, o ambiente ruminal despende dois elétrons e transforma um ácido forte em outro ácido fraco, o que favorece o tamponamento do pH (Jaakkola e Huhtanen, 1989) e poderia diminuir a produção de metano. Ao contrário, o etanol é oxidado parcialmente à acetato (Durix et al., 1991) e os equivalentes redutores gerados por esta rota poderiam alterar a degradação ruminal (Chalupa et al., 1964) e a produção de metano (Yoshii et al., 2005). Frente a estas possibilidades, o objetivo deste experimento foi avaliar o consumo de alimentos e o processo de digestão de novilhos canulados suplementados com ácido láctico ou etanol em rações contendo silagem de milho.

3.2 Material e métodos

A cultura do milho foi implantada nas dependências do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP/ESALQ e quando atingiram cerca de 30% de MS, as plantas foram colhidas utilizando-se colhedora de uma linha acoplada ao trator. A silagem foi preparada em silo tipo “bag” (1,5 m ø; 60 m comprimento - Pacifil®), sem a adição de aditivos. Aproximadamente 90 dias após a ensilagem, o silo foi aberto e o experimento foi iniciado.

Seis novilhos da raça Nelore, com peso vivo de 583 ± 29 kg, providos de cânula no saco dorsal do rúmen, foram agrupados em dois Quadrados Latinos 3x3, com base no peso corporal, e alojados em gaiolas metabólicas individuais. Dentro de cada QL os animais foram alocados aleatoriamente à sequência de três tratamentos dietéticos: Controle (C) – 60% silagem de milho e 40% concentrado; Etanol (E) – 60% silagem de milho adicionada de 2,8% de etanol (% MS) e

40% concentrado e; Ácido láctico (L) – 60% silagem de milho adicionada de 5,4% de ácido láctico (% MS) e 40% concentrado (Tabelas 15 e 16). Imediatamente após o descarregamento do silo, os aditivos foram aspergidos na silagem para prover cerca de 20 kcal/kg de MS de silagem (Tabela 17). O teor de MS das silagens foi equiparado por adição de água. Em seguida, as silagens foram misturadas aos concentrados e fornecida aos animais, uma vez ao dia (8:00 h), em quantidade para que houvesse no mínimo 15% do oferecido como sobras.

Tabela 15 - Composição dos ingredientes adotados nas rações experimentais, após aplicação dos tratamentos

Nutrientes	Sil. milho controle		Sil. milho etanol		Sil. milho ác. láctico		Milho	F. soja
	% MS ₁₀₅ ¹	% MS _{tol} ²	% MS ₁₀₅	% MS _{tol}	% MS ₁₀₅	% MS _{tol}	% MS ₁₀₅	% MS ₁₀₅
MS, % MN	28,69	32,43	28,94	32,66	30,11	34,46	86,78	86,01
PB	8,93	7,90	8,98	7,96	8,67	7,58	9,66	55,28
PBIDN	1,45	1,28	1,45	1,28	1,45	1,27	0,70	0,70
PBIDA	0,98	0,87	0,98	0,87	0,98	0,86	0,30	0,40
FDN	58,36	51,63	57,86	51,27	57,58	50,31	12,10	20,19
FDA ³	34,32	30,36	34,95	30,97	34,75	30,36	4,36	11,00
FDNi ⁴	37,85	33,48	37,92	33,60	37,94	33,15	4,08	2,28
FDNpf ⁵	20,51	18,14	19,94	17,67	19,64	17,16	8,02	17,91
Lignina	5,58	4,94	5,15	4,56	5,17	4,52	0,42	0,71
Extrato etéreo	2,37	2,10	2,39	2,12	2,77	2,42	0,82	0,80
Cinzas	5,96	5,27	5,85	5,18	5,72	5,00	1,72	6,91
CNF ⁶	25,83	34,38	26,37	34,76	26,71	35,96	76,40	17,52
DVIVMS ⁷	65,32	-	66,82	-	68,52	-	-	-
NDT _{lx} ⁸	58,02	60,89	58,95	61,69	59,59	62,52	84,49	77,52

¹ Matéria seca obtida por desidratação em estufa a 105°C;

² Matéria seca obtida por destilação com tolueno;

³ FDA obtido por método não sequencial;

⁴ FDN indigestível = resíduo de FDN incubado *in situ* por 120 horas;

⁵ FDN potencialmente fermentável = FDN – FDNi;

⁶ Carboidratos não fibrosos = 100 – (PB + (FDN-PBIDN) + EE + Cinzas);

⁷ Determinada por NIRS;

⁸ Nutrientes Digestíveis Totais em nível de manutenção estimado pelo NRC (2001).

Tabela 16 - Composição das rações experimentais

Ingredientes (% MS _{tol})	Controle	Etanol	Ácido láctico
Silagem de milho	62,20	62,36	63,62
Milho moído fino	31,16	31,02	29,99
Farelo de soja	3,90	3,88	3,75
Uréia	0,96	0,95	0,92
Calcário calcítico	0,83	0,82	0,79
Núcleo vit-mineral	0,96	0,95	0,92
Nutrientes (% MS _{tol})			
MS, % MN	42,56	42,74	44,21
Matéria orgânica	94,13	94,19	94,33
PB	12,77	12,79	12,39
FDN	36,67	36,51	36,39
Extrato etéreo	1,59	1,61	1,82
CNF	45,87	46,04	46,45
NDT _{1x}	67,22	67,69	68,02
Estratificação de partículas			
> 19 mm, %	5,10	5,39	5,23
8 – 19 mm, %	44,60	43,42	43,57
< 8 mm, %	50,30	51,19	51,20
Tamanho médio de partículas, mm	9,78	9,63	9,61

Cada período experimental teve duração de 14 dias, sendo nove de adaptação e os últimos cinco dias de coletas. O consumo diário de alimentos foi determinado pela diferença entre a quantidade ofertada e as sobras, entre os dias 10 e 13 de cada período. Em decorrência da perda dos produtos de fermentação pôde-se calcular e comparar três variáveis associadas ao consumo de matéria seca: 1) consumo de MS₁₀₅, utilizando-se os teores de matéria seca do oferecido e das sobras, obtidos por desidratação em estufa a 105°C; 2) consumo de MS_{tol}, utilizando-se os teores de matéria seca do oferecido e das sobras, obtidos por destilação com tolueno, 3) consumo de MS, utilizando-se o consumo de MS_{tol} corrigido para as perdas de etanol e ácido acético. Para isto, a taxa de ingestão (min/kg MS) foi utilizada para converter tempo de ingestão em consumo

(kg de MS) para cada hora do dia, assumindo-se que a taxa de ingestão para cada animal seria constante ao longo do dia. Com a taxa fracional de desaparecimento, as concentrações de etanol e ácido acético nas rações foram preditas para cada uma das 24 horas, e o consumo de cada composto foi calculado.

Tabela 17 - Produtos de fermentação e pH das silagens de milho, após aplicação dos tratamentos

	Controle	Etanol ¹	Ác. láctico ¹
pH	3,71	3,79	3,40
N-NH ₃ /N total, %	4,27	4,34	4,06
Ácido láctico, % MS _{tol}	3,37	3,44	8,23
Ácido acético, % MS _{tol}	4,00	3,88	3,92
Ácido propiônico, % MS _{tol}	0,40	0,39	0,38
Ácido isobutírico, % MS _{tol}	0,07	0,06	0,07
Ácido butírico, % MS _{tol}	0,00	0,00	0,00
Ácido isovalérico, % MS _{tol}	0,00	0,00	0,00
Ácido valérico, % MS _{tol}	0,00	0,00	0,00
Etanol, % MS _{tol}	0,59	1,91	0,49
Acético/Lático	1,19	1,13	0,48
Lático+AGV+Etanol, % MS _{tol}	8,44	9,68	13,10
MS _{corr} ² , % MN	30,35	31,00	31,94
MS _{tol} ³ - MS _{corr} , % MN	2,08	1,66	2,52

¹ Suplementados para prover 20 kcal/kg MS de silagem. Etanol = 28 g/kg MS. Ácido láctico = 54 g/kg MS;

² Matéria seca corrigida para produtos de fermentação: $MS_{corr} = MS_{105} + 0,95*AGV + 0,08*\text{Ác. láctico} + 1*\text{Etanol}$ (% MN) (adaptado de Weissbach, 2009);

³ Matéria seca obtida por destilação com tolueno.

Do dia 11 ao dia 13 foi realizada coleta total de fezes para estimativa da digestibilidade aparente de nutrientes. No dia 11 de cada período, o comportamento ingestivo dos animais foi observado a cada 5 minutos durante 24 horas (Maekawa et al., 2002), a fim de verificar os possíveis efeitos deletérios do ácido láctico e do etanol no padrão de consumo. Foram registrados os tempos de ingestão, ruminação e mastigação. Amostras de silagens, rações totais e sobras foram coletadas para determinação do tamanho de partículas, com auxílio do “Penn State Particle Size Separator” (Lammers et al., 1996). O índice de seleção de partículas foi calculado como o

consumo observado de cada fração retida em cada peneira, expresso como porcentagem do consumo predito daquela fração (% da matéria natural). Valores indicaram recusa (<100%), ingestão preferencial (>100%) ou ausência de seleção (=100%) (Leonardi e Armentano, 2003).

Para caracterização dos efeitos do ácido láctico e do etanol na degradação ruminal *in situ*, amostras de silagem de milho, desidratadas a 60°C e moídas a 5 mm, foram alocadas em sacos de nylon e incubadas no rúmen por 24 horas, no dia 11 de cada período. Respeitou-se a taxa de 15 mg de amostra/cm² de superfície do saco (Nocek, 1985).

No dia 12, coletou-se uma amostra de urina de cada animal, entre quatro e seis horas após a alimentação, para estimar o fluxo de proteína microbiana, por meio dos derivados de purinas. As amostras foram acidificadas com ácido sulfúrico concentrado (2-3 gotas de ácido/40 mL de amostra) e armazenadas a -20°C para posteriores determinações das concentrações de alantoína, ácido úrico e creatinina por cromatografia líquida (Czauderna e Kiwalczyk, 2000), no Laboratório de Nutrição Animal (CENA/USP, Piracicaba/SP). O volume de urina produzido foi estimado com base na excreção de creatinina (mg/kg PV), no peso vivo (kg) e na concentração de creatinina na amostra “spot” (Chizzotti et al., 2008):

$$\text{Urina (L/d)} = [(32,27 - 0,01093 \cdot \text{PV}) \cdot \text{PV}] / \text{Concentração de creatinina (mg/L)} \quad (1)$$

A excreção de derivados de purinas (alantoína e ácido úrico) (mmol/d) foi determinada multiplicando-se o volume de urina (L/d) pela concentração total de derivados de purinas (mM). A absorção de purinas foi calculada a partir da excreção de derivados de purinas (X, mmol/d) (Verbic et al., 1990):

$$\text{Absorção de purinas (mmol/d)} = (X - 0,385 \cdot \text{PV}^{0,75}) / 0,85 \quad (2)$$

onde 0,85 representa a recuperação de purinas absorvidas como derivados de purinas e $0,385 \cdot \text{PV}^{0,75}$ a contribuição endógena para a excreção de purinas.

A síntese ruminal de compostos nitrogenados foi calculada em função da absorção de purinas (Y, mmol/d), utilizando a equação descrita por Chen e Gomes (1992):

$$\text{Síntese de compostos nitrogenados (g/d)} = 70 \cdot Y / (0,83 \cdot 0,116 \cdot 1000) \quad (3)$$

onde 70 indica o conteúdo de N nas purinas microbianas (mg N/mol), 0,83 a digestibilidade das purinas bacterianas e 0,116 a razão $N_{\text{purinas}}/N_{\text{total}}$ nas bactérias. A massa de N foi convertida para proteína bruta pelo fator 6,25.

No 13º dia, amostras de fluido ruminal foram coletadas sob atmosfera de nitrogênio (anaerobiose), a cada duas horas, por 24 horas, para determinação de pH e potencial redox (E_h). Como o potencial redox foi medido com eletrodo de platina (E_0), os valores foram corrigidos pela equação (Marden et al., 2005):

$$E_h = E_0 + 199 \text{ mV} \quad (4)$$

A pressão parcial de hidrogênio (P_{H_2}) foi estimada com base na equação de Nernst (Marden et al., 2009):

$$-\log P_{H_2} = E_h/30 + 2 \cdot \text{pH} \quad (5)$$

Alíquotas de fluido foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20°C para posteriores determinações das concentrações de AGV (Palmquist e Conrad, 1971) e N-NH_3 (Chaney e Marback, 1962).

Ainda no dia 13, as temperaturas e as taxas fracionais de desaparecimento de etanol e ácido acético foram determinadas nas silagens e nas rações completas. Aproximadamente 3 kg das silagens ou das rações completas foram alocados em baldes de plástico, que foram posicionados próximo aos cochos dos animais, em duplicata. Tomou-se o cuidado de não compactar a massa, ao acomodá-la nos baldes. As temperaturas foram mensuradas a cada 30 minutos com o auxílio de *data loggers*, inseridos no centro geométrico da massa. Dois *data loggers* foram programados para registrar a temperatura do ambiente. Amostras foram coletadas 0, 2, 4, 8, 12 e 24 horas de exposição. As taxas fracionais de desaparecimento foram determinadas pela queda exponencial das concentrações de etanol e ácido acético, expressas como % MS_{105} .

No dia 14 de cada período, aproximadamente 6 h após a alimentação, 3 L de solução contendo CrEDTA (Binnerts et al., 1968) e 150 mL de ácido valérico, com pH ajustado para 6,5, foram infundidos em vários pontos do rúmen. Amostras de fluido ruminal foram coletadas 0,5; 1;

1,5; 2; 4 e 6 horas após a infusão. Durante as coletas, água e alimentos foram suspensos para evitar interferências no volume de fluido ruminal. As taxas fracionais de remoção, absorção e passagem de valerato foram determinadas pelas taxas de queda nas concentrações de valerato e Cr (Resende Júnior et al., 2006). As concentrações de valerato foram determinadas por cromatografia e as concentrações de Cr por ICP-plasma, no sobrenadante do fluido ruminal obtido por centrifugação.

Após o ensaio de absorção, o conteúdo ruminal foi evacuado manualmente e a massa de digesta foi registrada. Amostras foram desidratadas em estufa a 60°C para determinação do teor de matéria seca, volume de fluido ruminal e teor de FDN indigestível (FDNi). Ao término das coletas, todos os animais foram pesados no dia 14 de cada período.

Os teores de FDNi do conteúdo ruminal e das rações foram determinados como o resíduo de FDN após incubação in situ das amostras por 120 horas em vacas canuladas não lactantes, alimentadas com rações com alto teor de forragens. A taxa fracional de ciclagem de matéria seca no rúmen foi calculada em conformidade com Voelker e Allen (2003):

$$\text{Ciclagem (\%/h)} = 100 * (\text{Consumo de MS}_{105} / \text{Pool ruminal de MS}_{105}) / 24 \quad (6)$$

A taxa fracional de passagem de sólidos foi estimada como (Krizsan et al., 2010):

$$k_p (\%/h) = 100 * (\text{Consumo de FDNi} / \text{Pool ruminal de FDNi}) / 24 \quad (7)$$

A diferença entre as taxas fracionais de ciclagem e passagem foi definida como a taxa fracional de degradação ruminal (Voelker e Allen, 2003).

Com o volume de fluido ruminal (L) e as concentrações médias dos AGV ao longo de 24 horas (mM) foi possível estimar o pool ruminal médio de cada AGV (mol). Multiplicando-se a taxa fracional de remoção do ácido valérico (%/h) pelo pool ruminal médio de cada AGV (mol), determinou-se o fluxo ruminal de cada AGV (mol/h). Então, o fluxo diário de cada AGV foi determinado multiplicando-se o fluxo por 24 horas (mol/d). A energia proveniente dos AGV ruminais (Mcal/d) foi estimada pelo somatório dos produtos entre fluxo diário de cada AGV e seu respectivo calor de combustão. Os AGV considerados foram acetato (209 kcal/mol), propionato (367 kcal/mol) e butirato (524 kcal/mol) (Resende Júnior et al., 2006).

As amostras de silagens, concentrados, sobras e fezes foram preservadas a -20°C. Uma amostra composta foi obtida para cada período, tomando-se proporções iguais de matéria original das amostras individuais. Das amostras compostas de silagens, uma porção foi utilizada para preparo de extrato aquoso (Kung Jr. et al., 1984), outra alíquota para determinação do teor de matéria seca por destilação com tolueno (Dewar e McDonald, 1961) e o remanescente desidratado em estufa a 60°C. Uma porção das amostras de sobras foi usada para determinação do teor de matéria seca por destilação com tolueno e o restante desidratado em estufa a 60°C. As amostras de fezes foram desidratadas em estufa a 60°C.

As amostras secas foram moídas em moído tipo Wiley provido de peneira com poro de 1 mm. Sub-amostras foram utilizadas para determinação do teor de matéria seca a 105°C (AOAC, 1980), proteína bruta (Wiles et al., 1998), extrato etéreo (AOAC, 1990), cinzas (AOAC, 1980), FDN, FDA, nitrogênio ligado a FDN (N-FDN), nitrogênio ligado a FDA (N-FDA) e lignina (Van Soest et al., 1991). No extrato aquoso foram determinados o pH e as concentrações de AGV (Palmquist e Conrad, 1971), amônia (Chaney e Marback, 1962), etanol (Procedimento Sigma N° 332 - UV) e ácido láctico (Pryce, 1969). A digestibilidade verdadeira in vitro da matéria seca (DVIVMS) das silagens foi estimada por espectroscopia de reflectância de infravermelho proximal (NIRSystems 5000 - FOSS®).

As variáveis foram analisadas pelo procedimento MIXED do SAS (2001), usando o seguinte modelo: $y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_{j(i)} + \gamma_k + \delta_l + \varepsilon_{ijkl}$; onde μ : média geral, α_i : efeito de quadrado latino ($i = 1$ ou 2), $\beta_{j(i)}$: efeito de animal dentro de quadrado ($j = 1$ a 6), γ_k : efeito de período ($k = 1$ a 3), δ_l : efeito de tratamento ($l = C, E$ ou L), ε_{ijkl} : resíduo. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer. As variáveis mensuradas várias vezes no mesmo período foram analisadas como medidas repetidas no tempo. A interação Animal*Tratamento foi usada como termo de erro para testar o efeito de tratamento. Foram testadas as seguintes estruturas de covariância: componentes de variância, simetria composta, auto-regressiva de primeira ordem e não estruturada (Littell et al., 1998). Adotou-se a estrutura com menor valor para o Critério de Informação de Akaike (AIC). Regressões foram desenvolvidas com o procedimento REG do SAS.

3.3 Resultados e discussão

Parte do etanol e do ácido láctico suplementar foi perdida no processo de aplicação destes compostos. O enriquecimento das silagens, entretanto, elevou as concentrações destes compostos de forma satisfatória. As doses efetivamente suplementadas sobre as concentrações basais da silagem controle foram 1,32% de etanol e 4,79% de ácido láctico (Tabela 17), contrastando com os valores planejados de 2,8% de etanol e 5,4% de ácido láctico.

Considerando a taxa fracional de desaparecimento do etanol nas rações ($\mu = 5,8\%/h$; Figura 4) e o comportamento ingestivo dos animais (Figura 8), estimou-se que 74% do etanol presente nas silagens foi efetivamente consumido. O restante volatilizou ou foi oxidado por microrganismos (Mitloehner et al., 2009; Spoelstra et al., 1988; Driehuis et al., 1999). A determinação da concentração de ácido láctico em amostras de sobras, coletadas aleatoriamente, indicou estabilidade plena deste composto durante o período de exposição das rações. Tal ocorrência já era esperada devido a baixa pressão de vapor, ditada pela alta polaridade deste composto (Atkins, 1994). No trabalho publicado por Weissbach (2009), apenas 8% do ácido láctico por perdido por volatilização após secagem de amostras de silagens a 105°C.

Figura 4 - Taxas fracionais de desaparecimento de etanol nas silagens de milho e rações totais. $P = 0,15$ para efeito de ingrediente (forragem ou ração); $P = 0,78$ para efeito de aditivo; $P = 0,42$ para interação entre ingrediente e aditivo

Adicionalmente, estimou-se o desaparecimento de ácido acético, devido a abundância deste composto nas silagens. Tanto nas rações completas quanto nas silagens, as concentrações de ácido acético mantiveram-se inalteradas ou aumentaram ao longo do tempo. Isto significa que as taxas fracionais de desaparecimento foram ligeiramente negativas (Figura 5). A explicação plausível para o aparecimento de ácido acético nas silagens seria a oxidação parcial de etanol à acetato, resultante da ação de bactérias aeróbias, especialmente àquelas do gênero *Acetobacter* (Spoelstra et al., 1988). Isto corrobora o fato do menor aquecimento das silagens e rações enriquecidas com ácido láctico (Figura 6), provavelmente pela ação antimicrobiana sinérgica entre ácido láctico e os ácidos fracos (ex. ác.acético), previamente presentes na massa (Nishino, 2011; O'Kiely, 2009; Moon, 1983).

Figura 5 - Taxas fracionais de desaparecimento de ácido acético nas silagens de milho e rações totais. $P = 0,18$ para efeito de ingrediente (forragem ou ração); $P = 0,14$ para efeito de aditivo; $P = 0,24$ para interação entre ingrediente e aditivo

A adição de etanol não alterou o perfil de temperatura das silagens e das rações durante a exposição aeróbia, relativamente aos controles. Embora o efeito antimicrobiano do etanol seja bem conhecido (Ingram e Buttke, 1984; Gray, 1941), as concentrações normalmente encontradas em silagens não têm apresentado efeito preservativo (Nishino, 2011). A diminuição numérica do pH das silagens e das rações enriquecidas com etanol, após 24 horas de exposição, também apóia a hipótese de conversão de etanol em ácido acético (Figura 7).

Figura 6 - Temperatura das silagens, das rações totais e do ambiente. $P = 0,20$ para efeito de ingrediente (forragem ou ração); $P = 0,06$ para efeito de aditivo; $P < 0,01$ para efeito de tempo; $P > 0,82$ para interações

Figura 7 - pH das silagens de milho (Sil C, Sil E, Sil L) e das rações completas (Rac C, Rac E, Rac L). $P < 0,01$ para efeito de ingrediente (forragem ou ração); $P < 0,01$ para efeito de aditivo; $P < 0,01$ para efeito de tempo; $P = 0,03$ para interação entre aditivo e tempo; $P > 0,11$ para outras interações

Com a fórmula publicada por Weissbach (2009), foi possível estimar o teor de matéria seca corrigido para perda de compostos voláteis das silagens (Tabela 17). Mesmo após a correção, estes valores foram 1,7 a 2,5 unidades percentuais inferiores ao teor de matéria seca obtido por destilação com tolueno. Isto indica que os compostos não analisados, incluindo ésteres, alcoóis, aldeídos e cetonas, podem ter importância significativa no teor de matéria seca da silagem de milho.

A adição de etanol ou ácido láctico não alterou o consumo de matéria seca nem o comportamento ingestivo dos animais (Tabela 18, Figura 8). Logo, os centros reguladores de consumo, seja de caráter sensitivo (olfato, paladar), de regulação física ou quimiostática (Forbes, 2007), foram insensíveis às doses dos compostos estudados no presente trabalho. A indiferença dos animais ao aumento em 2,6 vezes a acidez⁴ da ração enriquecida com ácido láctico, pode indicar que o baixo pH per se não é fator inibidor do consumo de silagens. Em alguns experimentos, a neutralização parcial da acidez de forragens fermentadas foi exitosa em aumentar o consumo (Shaver et al., 1984; Shaver et al., 1985; Erdman, 1988), mas falhou em outros casos (Shaver et al., 1985; Ndwiga et al., 1990; Dawson e Steen, 1997). Na prática, silagens de milho com pH elevados tendem a ser de pior qualidade e conter metabólitos indesejáveis capazes de inibir o consumo de alimentos (Rook et al., 1990; Rook e Gill, 1990; McDonald et al., 1991).

Tabela 18 - Comportamento ingestivo de novilhos suplementados com etanol ou ácido láctico

Variável	Controle	Etanol	Ác. Láctico	EP	P
Consumo de MS ₁₀₅ , kg/d	10,93	10,79	10,69	0,34	0,26
Consumo de MS _{tol} , kg/d	11,84	11,67	11,71	0,36	0,49
Consumo de MS ¹ , kg/d	11,83	11,63	11,70	0,36	0,41
Ingestão, min/d	245	240	232	23,31	0,78
Ruminação, min/d	513	457	477	48,88	0,15
Mastigação, min/d	758	697	708	35,88	0,19
Mastigação/CMS, min/kg	63,97	59,80	60,65	2,16	0,27
Mastigação/CFDN, min/kg	178,55	166,80	171,53	5,89	0,27
Tempo de ingestão durante 4 h após a alimentação, min	83	84	83	16,47	0,96

¹CMS (kg/d) = CMS_{tol} ajustada para perdas de compostos voláteis no cocho.

⁴ Acidez = [H⁺] = 10^{-pH}

Figura 8 - Padrão de ingestão de alimentos ao longo do dia. $P = 0,78$ para efeito de tratamento; $P < 0,01$ para efeito de tempo; $P = 0,72$ para interação entre tratamento e tempo

O consumo preferencial de partículas, indicado pelo índice de seleção, não foi alterado pelos tratamentos (Figura 9). Em todos os casos, os animais priorizaram o consumo de partículas menores. Como consequência, o consumo de partículas longas foi menor que o predito. Este achado tem sido frequente e parece normal para bovinos (Leonardi e Armentano, 2003; Leonardi et al., 2005; Maulfair et al., 2010). Em rações com suprimento adequado de fibra, a inclusão de volumosos com partículas muito longas agrava o comportamento seletivo e pode comprometer o consumo de fibra fisicamente efetiva (Armentano, 2005). A utilização de colhedoras de forragens capazes de gerar partículas de tamanho uniformizado pode se constituir em estratégia para diminuir a seleção e os desvios de composição entre dieta formulada e dieta consumida.

As características do conteúdo ruminal e as digestibilidades foram similares entre os tratamentos (Tabela 19). Diante do mesmo consumo de matéria seca, de rações com composições químicas e físicas similares, não eram esperadas mudanças acentuadas destas variáveis. O tempo de retenção ruminal da fase sólida (1/kp) variou entre 25 e 27 horas e foi coerente com a proporção de matéria seca digerida no rúmen (Tabela 19), que representou 78-80% da digestibilidade aparente no trato total. O conteúdo energético das rações, expresso como NDT (Tabela 19), não diferiu entre os tratamentos, porque o incremento da fração digestível ocasionado pela adição de etanol ou ácido láctico foi compensado matematicamente por diminuição discreta da digestibilidade aparente da matéria seca não volátil das rações. Embora

não tenha sido encontrada explicação plausível para esta ocorrência, deve-se ressaltar que a digestão ruminal não foi prejudicada, visto as degradabilidades in situ da silagem de milho, numericamente superiores para os tratamentos etanol e ácido lático (Tabela 19).

Figura 9 - Índice de seleção de partículas. $P = 0,95$ para efeito de tratamento, $P < 0,01$ para efeito de peneira, $P = 0,17$ para interação entre tratamento e peneira. ^{a,b} Indicam diferenças entre peneiras (Tukey-Kramer, $\alpha = 0,05$)

Quando o método de determinação do teor de matéria seca considerado foi a secagem em estufa a 105°C, os valores de NDT foram 1,5 a 1,6 unidades percentuais inferiores àqueles obtidos pelos cálculos que computaram o consumo de compostos voláteis. Levando em conta os desvios no consumo de matéria seca do presente estudo, esta variação representou 0,78-0,92 kg de NDT. Em simulação realizada com auxílio do software do NRC Gado de Corte (1996), esta variação poderia ser traduzida em ganho de peso diário de até 330 g para tourinhos da raça Nelore em terminação⁵. Estes desvios poderiam ser menores caso o método de determinação do teor de MS das fezes fosse a destilação com tolueno ao invés de secagem em estufa (Colovos et al., 1957).

⁵ Entradas consideradas: PV = 400 kg; ECC = 5,0; Idade = 24 meses; PV à maturidade = 540 kg; *Grading system* = 2; Uso de ionóforos = Sim; Uso de implantes = Não.

Tabela 19 - Conteúdo ruminal, degradabilidade in situ das silagens, digestibilidade aparente e NDT das rações

Variável	Controle	Etanol	Ác. Lático	EP	P
Massa úmida, kg	40,82	41,53	38,53	1,93	0,24
Teor de MS ₁₀₅ , % MN	12,78	12,44	12,62	0,83	0,81
Pool de fluido, kg	35,63	36,39	33,64	1,69	0,27
Pool de MS ₁₀₅ , kg	5,18	5,15	4,90	0,43	0,42
Pool de FDNi, kg	3,01	2,95	2,88	0,28	0,81
Pool de FDNi/PV ^{0,75} , g/kg	24,75	24,16	23,73	2,27	0,81
Ciclagem de MS ₁₀₅ , %/h	8,86	8,82	9,48	0,88	0,35
kp de sólidos ¹ , %/h	3,76	3,79	3,98	0,43	0,74
Degradabilidade da MS ₁₀₅ no rúmen ² , %	57,83	57,18	58,33	0,84	0,64
Degradabilidade in situ da MS ₁₀₅ da silagem de milho em 24 h, %	54,44	55,36	56,55	1,08	0,38
Digestibilidade aparente da MS no trato total, %	74,20	73,26	73,05	1,21	0,30
Digestibilidade aparente da FDN no trato total, %	55,98	54,69	54,92	1,99	0,75
Nutrientes digestíveis totais, % MS ₁₀₅	73,78	73,19	72,93	1,22	0,52
Nutrientes digestíveis totais, % MS	75,28	74,65	74,54	1,16	0,53

¹Estimada por evacuação do ruminorretículo (Krizsan et al., 2010);²Digestibilidade ruminal (%) = (Ciclagem - Taxa de passagem) / Ciclagem.

O pH ruminal não foi alterado pelo etanol suplementar, entretanto, o maior consumo de ácido láctico resultou em pH ruminal mais elevado (Figura 10). À primeira instância isto parece paradoxal, mas já foram publicados trabalhos onde a suplementação com ácido láctico induziu pH ruminal mais elevado (Jaakkola e Huhtanen, 1989; Huntington e Britton, 1979). A adaptação da microbiota ao metabolismo de lactato (Huntington e Britton, 1979) e o consumo de elétrons durante a conversão de lactato à propionato (Russell e Wallace, 1988) corroboram o fato do pH mais alto. Devido ao teor de forragem das dietas e ao consumo de matéria seca próximo ao nível de manutenção, todas os tratamentos resultaram em pH ruminal dentro da faixa ótima para atuação de microrganismos fibrolíticos (Russell, 2002).

Figura 10 - pH ruminal de novilhos da raça Nelore alimentados com rações constituídas de silagens de milho suplementadas com etanol ou ácido láctico. $P = 0,01$ para efeito de tratamento, $P < 0,01$ para efeito de tempo, $P = 0,28$ para interação entre tratamento e tempo

Figura 11 - Potencial redox (Eh) ruminal de novilhos da raça Nelore alimentados com rações contendo silagens de milho suplementadas com etanol ou ácido láctico. $P = 0,45$ para efeito de tratamento, $P < 0,01$ para efeito de tempo, $P = 0,98$ para interação entre tratamento e tempo

Contrariamente à hipótese original do trabalho, o potencial redox do fluido ruminal foi inalterado com o enriquecimento das rações com etanol ou ácido láctico (Figura 11). Possivelmente, a capacidade moduladora do sistema não foi desafiada o suficiente para alterar a disponibilidade de equivalentes redutores. Assim, não seriam esperados desdobramentos, positivos ou negativos, de alteração no potencial redox, haja vistos os valores similares para proporção de matéria seca degradada no rúmen e as degradabilidades in situ das silagens de milho (Tabela 19).

A Figura 12 ilustra a relação entre redox e pH. De forma geral, os ambientes neutros apresentaram maior disponibilidade de equivalentes redutores e seriam mais propícios ao crescimento de microrganismos estritamente anaeróbios, como por exemplo, as bactérias fibrolíticas (Russell, 2002; Wolin e Miller, 1988). Apesar do coeficiente angular da regressão diferir significativamente de zero, o baixo coeficiente de determinação ($r^2 = 0,15$) indicou variabilidade alta de potencial redox para determinada faixa de pH. Por exemplo, para o pH 6,2 pôde-se observar valores de redox entre -15 e -150 mV. Assim, não seria aconselhável o emprego de equações para predição de redox, com base no pH ruminal.

Figura 12 - Relação entre pH e redox ruminal de animais alimentados com rações contendo silagens de milho suplementadas com etanol ou ácido láctico. $E_h = -32,40 \text{ pH} - 78,79$; $R^2 = 0,15$; $P < 0,01$

Figura 13 - Pressão parcial de hidrogênio (P_{H_2}) no fluido ruminal de animais alimentados com rações contendo silagens de milho suplementadas com etanol ou ácido láctico. $P = 0,84$ para efeito de tratamento

Com os valores de pH e redox, foi possível estimar a pressão parcial de H_2 (Figura 13). Da mesma forma que o redox, esta variável não foi afetada pelos tratamentos. Em trabalhos similares, a P_{H_2} foi negativamente correlacionada à produção de metano (Marden, 2008; Marden et al., 2009). Se esta relação for válida para o presente estudo, pode-se afirmar que os tratamentos não afetaram a emissão de metano. Por outro lado, o tratamento ácido láctico diminuiu significativamente a razão acetato/propionato no fluido ruminal (Tabela 21) e pode ter restringido a perda energética via metano (Wolin e Miller, 1988), contudo esta variável não foi aferida.

A concentração ruminal de amônia não foi afetada pela ingestão adicional de ácido láctico (Figura 14). No trabalho de Jaakkola e Huhtanen (1989) a substituição de carboidratos fermentescíveis (sacarose) por ácido láctico resultou em aumento da concentração de amônia no rúmen. No presente estudo, entretanto, não houve diminuição do aporte ruminal de matéria orgânica fermentescível e as concentrações de amônia foram similares àsquelas do tratamento controle.

Por outro lado, o enriquecimento das rações com etanol elevou a concentração ruminal de amônia. Esta ocorrência já foi observada por outros autores (Chalupa et al., 1964; Otsuki et al., 1991) e pode ter ocorrido por: 1) aumento da taxa proteolítica, 2) diminuição da síntese protéica ou 3) diminuição da absorção ruminal e/ou passagem da amônia juntamente com a fase fluida.

No presente trabalho, a taxa fracional de passagem de líquidos não foi alterada pelos aditivos (Tabela 22). A absorção de amônia pela parede do rúmen não foi mensurada e não foram encontradas publicações sobre os efeitos do álcool sobre este parâmetro. Também não foram realizadas medidas capazes de indicar a atividade proteolítica, mas esta alusão seria menos relevante frente à possibilidade de captação de amônia para síntese protéica (Chalupa et al., 1964). Adicionalmente, a população ruminal de protozoários, caracterizada como unidade importante de proteólise (Russell, 2002), é passível de diminuição com o maior consumo de etanol (Otsuki et al., 1991), gerando a expectativa de menor atividade proteolítica.

A síntese de proteína microbiana foi estimada pela excreção diária de derivados de purinas na urina (Tabela 20). Não foram observados efeitos do etanol ou do ácido láctico suplementares na produção de proteína bruta microbiana nem na eficiência de síntese, ilustrada pelas razões síntese de PB microbiana/kg NDT e síntese de PB microbiana/kg MS₁₀₅ degradada no rúmen. A concentração ruminal de amônia pode ter sido mais sensível ao metabolismo de compostos nitrogenados no rúmen que a excreção de derivados de purinas, vistos os elevados coeficientes de variação para as variáveis relativas à estimação da síntese de proteína microbiana. Somente os experimentos capazes de modelar a dinâmica do nitrogênio no rúmen seriam capazes de esclarecer esta questão.

Figura 14 - Concentração ruminal de amônia. $P < 0,01$ para efeito de tratamento, $P < 0,01$ para efeito de tempo, $P = 0,76$ para interação entre tratamento e tempo

Tabela 20 - Excreção urinária de derivados de purinas

Variável	Controle	Etanol	Ác. Lático	EP	P
Alanina/Creatinina	0,73	0,68	0,68	0,11	0,93
Ác. úrico/Creatinina	0,12	0,15	0,11	0,06	0,32
Alanina+Ác. úrico/Creatinina	0,87	0,83	0,76	0,12	0,81
Produção de urina ¹ , L/d	16,75	25,13	14,41	4,60	0,21
Síntese de PB microbiana ² , g/d	441,84	416,01	416,87	73,12	0,94
PB microbiana/Consumo de NDT, g/kg	48,67	47,25	48,00	7,71	0,99
PB microbiana/MS ₁₀₅ degradada no rúmen, g/kg	69,70	67,09	67,96	11,66	0,98

¹ Estimada pela concentração de creatinina na urina e pelo peso vivo;

² Estimada pela excreção diária de derivados de purina.

A dose suplementar de etanol não alterou as concentrações e o perfil de AGV no fluido ruminal (Tabela 21). Já o ácido láctico diminuiu a concentração de acetato e tendeu a aumentar a concentração de propionato. Consequentemente, a razão acetato/propionato foi diminuída (Tabela 21 e Figura 16). Em todos os tratamentos, as concentrações totais de AGV atingiram picos entre 8 e 10 horas após a alimentação (Figura 15), o que aparenta ser o padrão normal da fermentação ruminal em bovinos consumindo rações completas, fornecidas uma ou duas vezes ao dia (Pereira e Armentano, 2000; Salvador et al., 2008; Goulart, 2010). Os maiores consumos de etanol e de ácido láctico não alteraram o padrão de acúmulo intraruminal de AGV. A razão acetato/propionato, entretanto, seguiu comportamento quadrático, similar ao pH e inverso ao redox, e pode ter indicado menor atividade metanogênica para o tratamento ácido láctico (Russell e Wallace, 1988; Russell, 2002; Owens e Goetsch, 1988). Apesar da P_{H_2} ser potencialmente capaz de indicar a produção de metano, a razão acetato/propionato apresentou-se mais simplificada do ponto de vista metodológico e mais sensível à variação da dieta.

Tabela 21 - Concentrações ruminais de ácidos graxos voláteis

Parâmetro	Tratamento				<i>P</i>		
	Controle	Etanol	Ác. Lático	EP	Trat	Tempo	Trat*Tempo
Acetato, mM	63,98 ^a	62,64 ^{ab}	61,42 ^b	1,54	0,02	<0,01	0,99
Propionato, mM	20,96 ^{ab}	20,20 ^b	21,57 ^a	0,52	0,02	<0,01	0,91
Isobutirato, mM	0,80	0,63	0,60	0,08	0,09	<0,01	0,84
Butirato, mM	12,18	12,07	11,83	0,47	0,58	<0,01	0,96
Isovalerato, mM	1,94	2,09	1,84	0,16	0,33	<0,01	0,01
Valerato, mM	1,53	1,48	1,47	0,06	0,72	<0,01	0,90
AGV, mM	101,39	99,10	98,73	2,57	0,27	<0,01	0,99
Acetato/Propionato	3,08 ^a	3,13 ^a	2,89 ^b	0,05	<0,01	<0,01	0,51

^{a, b} Letras indicam que as médias diferem (Tukey-Kramer; $\alpha = 0,05$).

Figura 15 - Concentração ruminal de ácidos graxos voláteis em novilhos da raça Nelore alimentados com rações contendo silagens de milho suplementadas com etanol ou ácido lático. $P = 0,27$ para efeito de tratamento, $P < 0,01$ para efeito de tempo, $P = 0,99$ para interação entre tratamento e tempo

Figura 16 - Razão acetato/propionato no fluido ruminal de novilhos da raça Nelore alimentados com rações contendo silagens de milho suplementadas com etanol ou ácido láctico. $P < 0,01$ para efeito de tratamento, $P < 0,01$ para efeito de tempo, $P = 0,51$ para interação entre tratamento e tempo

As mudanças nas taxas fracionais de remoção de valerato no ruminorretículo foram apenas numéricas. A absorção pela parede e a passagem de fluido para o omaso não foram alterados significativamente pelos tratamentos (Tabela 22). Hipoteticamente, o tratamento ácido láctico deveria gerar mais AGV, resultando em maior taxa fracional de remoção e/ou maior concentração ruminal. Mesmo não havendo indícios que os principais AGV são absorvidos em velocidades diferentes em pH ruminal próximo à neutralidade (Úden, 2010), no trabalho de Resende Júnior et al. (2006) as correlações entre as taxas fracionais de remoção de valerato (usado como marcador) e os principais AGV foram proporcionais à similaridade química dos ácidos. Logo, o ácido acético, que representa aproximadamente metade do fluxo ruminal de AGV, apresentou a menor correlação com o marcador (Resende Júnior et al., 2006). No presente trabalho, o pH ruminal mais elevado para o tratamento ácido láctico pode ter interferido na técnica empregada e subestimado a taxa fracional de absorção de AGV (Melo, 2007; Dijkstra et al., 1993).

Tabela 22 - Taxas fracionais de remoção (kc), absorção (ka) e passagem (kp) de valerato no ruminorretículo¹

Parâmetro	Controle	Etanol	Ác. Lático	EP	P
ka, %/h	24,19	29,10	27,87	2,46	0,18
kp, %/h	10,74	10,24	11,35	0,57	0,43
kc, %/h	34,93	39,34	39,22	2,39	0,12
<i>Índice relativo</i> ‡, %	-	112,63	112,28		

¹ CrEDTA foi usado como marcador da taxa fracional de passagem de líquidos;

‡ Índice relativo = Etanol/Controle ou Ác. láctico/Controle.

Como não houveram diferenças significativas nas concentrações de AGV, nos volumes de fluido ruminal e nas taxas fracionais de remoção de valerato, os fluxos de AGV e a absorção diária de energia metabolizável proveniente de AGV ruminais foram similares entre os tratamentos (Tabela 23). No trabalho de Penner et al. (2009) também não foi possível detectar diferença estatística no fluxo ruminal de AGV (mol/h), que foi aumentado em 25% na dieta com maior teor de concentrados. Uma das justificativas descrita pelos autores se referiu à sensibilidade do método adotado para mensurar a taxa fracional de absorção de AGV, supostamente insuficiente para detectar diferenças causadas pelas dietas. Mesmo não havendo indícios que os principais AGV são absorvidos em velocidades diferentes em pH ruminal próximo à neutralidade (Úden, 2010), no trabalho de Resende Júnior et al. (2006b) as correlações entre as taxas fracionais de remoção de valerato (usado como marcador) e os principais AGV foram proporcionais à similaridade química dos ácidos. Logo, o ácido acético, que representa aproximadamente metade do fluxo ruminal de AGV, apresentou a menor correlação com o marcador (Resende Júnior et al., 2006b).

Considerando os principais AGV, as contribuições energéticas foram 48-49% para acetato, 28-29% para propionato e 23% para butirato, e não foram afetadas pelos tratamentos. Na revisão de Bergman (1990) cerca de 50% da energia dos AGV ruminais proveio de acetato e o restante foi compartilhado entre propionato (25%) e butirato (25%). No experimento de Resende Júnior et al. (2006) a contribuição calórica como energia metabolizável foi 50-52% para acetato, 27-29% para propionato e 21% para butirato. Aparentemente, o perfil da energia metabolizável proveniente dos AGV ruminais só seria alterada por dietas completamente distintas, o que não foi o caso deste experimento.

A energia derivada dos principais AGV produzidos no rúmen variou entre 58 e 65% da exigência de manutenção dos animais (NRC, 1996). Outros autores têm publicado percentagens entre 52 e 75% do requerimento total de energia metabolizável (manutenção + produção) (Bergman, 1990; Resende Júnior et al., 2006). Considerando que grande parte da exigência energética dos animais utilizados nos experimentos referenciados se destinou à produção (Bergman, 1990; Resende Júnior et al., 2006), o suprimento de AGV, no presente experimento, deveria representar a maior parte ou exceder a exigência energética de manutenção. Adicionalmente, a absorção estimada de acetato, propionato e butirato por quilograma de matéria seca consumida variou entre 2,5 e 2,8 mol/kg, que são valores abaixo da média encontrada na literatura, ao redor de 5 mol/kg MS (Bergman, 1990; Owens e Goetsch, 1988). A técnica adotada para mensurar o fluxo ruminal de AGV pode ter subestimado a absorção diária de energia.

Tabela 23 - Estimativa do fluxo ruminal de ácidos graxos voláteis

Parâmetro	Controle	Etanol	Ác. Lático	EP	P
Acetato ¹ , mol/d	19,09	21,63	19,54	1,99	0,32
Propionato ¹ , mol/d	6,24	6,93	6,86	0,60	0,34
Butirato ¹ , mol/d	3,62	4,15	3,76	0,37	0,16
AGV ¹ , mol/d	28,94	32,71	30,16	2,95	0,32
AGV/CMS, mol/kg	2,46	2,81	2,59	0,26	0,28
<i><u>Energia metabolizável</u></i>					
Acetato ² , Mcal/d	3,99	4,52	4,09	0,42	0,31
Propionato ² , Mcal/d	2,29	2,55	2,52	0,22	0,34
Butirato ² , Mcal/d	1,90	2,17	1,97	0,19	0,17
AGV, Mcal/d	8,17	9,24	8,57	0,83	0,31
<i>Índice relativo</i> ‡, %	-	113,10	104,90		

¹ Fluxo (mol/d) = Concentração ruminal (mol/L) * Volume ruminal (L) * kc (%/h) * 24 h;

² Assumiu-se os seguintes calores de combustão: 209 kcal/mol de acetato, 367 kcal/mol de propionato e 524 kcal/mol de butirato;

‡ Índice relativo = Etanol/Controle ou Ác. láctico/Controle.

3.4 Conclusões

A adição de etanol ou ácido láctico em rações contendo silagem de milho não alterou o consumo de alimentos e o processo de digestão nos animais. Entretanto, a fração volátil da silagem de milho deve ser considerada no valor energético desta forragem.

Referências

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 13th ed. Washington: AOAC International, 1980. 1015p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington, 1990. v. 1, 1117p.

ARMENTANO, L.E. Separação dos alimentos da dieta completa por vacas em lactação. In: CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 9., 2005. Uberlândia. **Anais...** Uberlândia/MG, 2005. p. 281-295.

ATKINS, P.W. **Physical Chemistry**. 5th ed. Oxford :Oxford University Press, 1994.1031p.

BERGMAN, E.N. Energy contribution of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 70, p. 567-590, 1990.

BINNERTS, W.T.; Van't KLOOSTER, A.T.; FRENS, A.M. Soluble chromium indicator measured by atomic absorption in digestion experiments. **Veterinary Research**, London, v. 82, p. 470, 1968.

CHALUPA, W. ;EVANS, J.L.; STILLIONS, M.C. Influence of ethanol on rumen fermentation and nitrogen metabolism. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 23, p. 802-807, 1964.

CHANEY, A.L., MARBACK, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 8, p. 130-137, 1962.

CHEN, X.B.; GOMES, M.J. **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of technical details** (Occasional publication). INTERNATIONAL FEED RESOURCES UNIT. Bucksburnd, Aberdeen:Rowett Research Institute. 1992. 21p.

CHIZZOTTI, M.L.; VALADARES FILHO, S.C; VALADARES, R.F.D.; CHIZZOTTI, F.H.M.; TEDESCHI, L.O. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. **Livestock Science**, Amsterdam, v.113, p. 218-225, 2008.

COLOVOS, N.F.; KEENER, H.A.; DAVIS, H.A. Errors in drying silage and feces for protein and energy determinations. Improved procedures. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 40, p. 173-179, 1957.

CZAUDEANA, M.; KIWALCZYK, J. Quantification of allantoin, uric acid, xanthine and hypoxanthine in ovine by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Science and Applications**, Washington, v. 74, p. 129-138, 2000.

DAWSON, L.E.R.; STEEN, R.W.J. The effect of spreading sodium bicarbonate over the surface of grass silage on the intake of grass silages by beef cattle. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 67, p. 61-67, 1997.

DEWAR, W.A.; McDONALD, P. Determination of dry matter in silage by distillation with toluene. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 12, p. 790-795, 1961.

DIJKSTRA, J.; BOER, H.; VAN BRUCHEM, J.; BRUINING, M.; TAMMINGA, S. Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 69, p. 385-396, 1993.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; SPOELSTRA, S. F. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 87, p. 583-594, 1999.

DURIX, A.; JEAN-BLAIN, C.; SALLMANN, H.P.; JOUANY, J.P. Use of a semicontinuous culture system (RUSITEC) to study the metabolism of ethanol in the rumen and its effects on ruminal digestion. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 71, p. 115-123, 1991.

ERDMAN, R. Forage pH Effects on Intake in Early Lactation Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, p. 1198-1203, 1988.

FORBES, J.M. **Voluntary food intake and diet selection in farm animals**. 2nd Ed. Wallingford, UK :CABI, , 2007. 453p.

GOULART, R.S. **Avaliação da fibra fisicamente efetiva em rações para bovinos de corte**. 2010. 200p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagem) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

GRAY, W.D. Studies on the alcohol tolerance of yeasts. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 42, p. 561-574, 1941.

HUETER, F.G.; SHAW, J.C.; DOETSCH, R.N. Absorption and dissimilation of lactates added to the bovine rumen and the resulting effects on blood glucose. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 39, p. 1430-1437, 1956.

HUNTINGTON, G.B.; BRITTON, R.A. Effect of dietary lactic acid on rumen lactate metabolism and blood acid-base status of lambs switched from low to high concentrate diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 49, p.1569-1576, 1979.

INGRAM, L.O.; BUTTKE, T.M. Effects of alcohols on microorganisms. **Advances in microbial physiology**, London, v. 25, p. 253-300, 1984.

JAANKOLA, S.; HUHTANEN, P. The effect of lactic acid on the microbial protein synthesis in the rumen of cattle. **American Journal of Applied Sciences**, Vails Gate, v. 2, p. 398-399, 1989.

KRIZSAN, S.J.; AHVENJÄRVI, S.; HUHTANEN, P. A meta-analysis of passage rate estimated by rumen evacuation with cattle and evaluation of passage rate prediction models. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 93, p. 5890–5901, 2010.

KUNG JÚNIOR, L.; GRIEVE, D.B.; THOMAS, J.W.; HUBER, J.T. Added ammonia or microbial inocula for fermentation and nitrogenous compounds of alfalfa ensiled at various percents of dry matter. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, p. 299-306, 1984.

LAMMERS, B.P.; BUCKMASTER, D.R.; HEINRICHS, A.J. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 79, p. 922-928, 1996.

LEONARDI, C.; ARMENTANO, L.E. Effect of quantity, quality, and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 86, p. 557-564, 2003.

LEONARDI, C.; GIANNICO, F.; ARMENTANO, L.E. Effect of water addition on selective consumption (sorting) of dry diets by dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 88, p. 1043–1049, 2005.

LITTELL, R.C.; HENRY, P.R.; AMMERMAN, C.B. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 76, p. 1216-31, 1998.

MAEKAWA, M.; BEAUCHEMIN, K.A.; CHRISTENSEN, D.A. Effect of concentrate level and feeding management on chewing activities, saliva production, and ruminal pH of lactating dairy cow. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 85, p. 1165–1175, 2002.

MARDEN, J.P.; BAYOURTHE, C.; ENJALBERT, F.; MONCOULON, R. A new device for measuring kinetics of ruminal pH and redox potential in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 88, p. 277–281, 2005.

MARDEN, J.P.; UNGERFELD, E.; KOHN, R.A.; JULIEN, C.; AUCLAIR, E.; MONCOULON, R.; BAYOURTHE, C. From redox potential field measurement to its bioenergetic meaning in the rumen. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 92 (E-Suppl. 1), p. 518, 2009.

MARDEN, J.P. Redox Potential: From its routine measurement to its energetic meaning. **ADSA-ASAS Meeting**, Indianapolis, USA, 2008. Disponível em: <http://www.dascor.com/downloadfiles/Marden.pdf> Acesso em: 04 jul.2011.

MAULFAIR, D.D.; ZANTON, G.I.; FUSTINI, M.; HEINRICHS, A.J. Effect of feed sorting on chewing behavior, production, and rumen fermentation in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 93, p. 4791–4803, 2010.

McDONALD, P.; HENDERSON, N.; HERON, S. **The biochemistry of silage**. 2nd ed. Chalcombe Publications, 1991. 340 p.

MELO, L.Q. **Morfometria ruminal e efeito do pH e do volume da digesta sobre a absorção de ácidos graxos voláteis**. 2007. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

MITLOEHNER, F.M.; MALKINA, I.L.; KUMAR, A.; GREEN, P G. Volatile organic compounds emitted from dairy silages and other feeds. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE PROCEEDINGS, 15, 2009. Madison. **Proceedings...** Madison, 2009. p. 15-26.

MOON, N.J. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 55, p. 453-460, 1983.

NDWIGA, C.A.; ERDMAN, R.A.; VANDERSALL, J.H.; SHARMA, B.K. effect of type and site of acid neutralization on voluntary intake of corn silage by dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, p. 1571-1577, 1990.

NISHINO, N. Aerobic stability and instability of silages caused by bacteria. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2., 2011. São Pedro.. **Proceedings...** São Pedro. 2011.1 CD-ROM.

NOCEK, J.F. Evaluation of specific variables affecting in situ estimates of ruminal dry matter and protein digestion. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 60, p. 1347-1358, 1985.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients Requirements of Beef Cattle**. 7th ed. Washington, DC: National Academy Press, 1996. 242 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients Requirements of Dairy Cattle**. 7th rev. ed. Washington, DC: National Academy Press, 2001. 381 p.

O'KIELY, P. Chemical additives and the aerobic stability of silages. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2009. São Pedro **Proceedings...** São Pedro, 2009. p. 155-174.

OTSUKI, K.; KOBAYASHY, T.; MATSUMOTO, M.; ITABASHI, H. Effects of ethanol on rumen fermentation pattern in steers fed a diet high in concentrate. **Bulletin of National Institute of Animal Industry**, Tokyo, v. 51, p. 9-15 1991.

- OWENS, F.N.; GOETSCH, A.L. Ruminal fermentation. In: CHURCH, D.C. (Ed.). **The ruminant Animal** - Digestive physiology and nutrition. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1988. 121p.
- PALMQUIST, D.L.; CONRAD, H.R. Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high grain or high fat diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, p. 1025-1030, 1971.
- PENNER, G.B.; TANIGUCHI, M.; GUAN, L.L.; BEAUCHEMIN, K.A.; OBA, M. Effect of dietary forage to concentrate ratio on volatile fatty acid absorption and the expression of genes related to volatile fatty acid absorption and metabolism in ruminal tissue. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 92, p 2767–2781, 2009.
- PEREIRA, M.N.; ARMENTANO, L.E. Partial replacement of forage with nonforage fiber sources in lactating cow diets. II. Digestion and rumen function. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 83, p. 2876–2887, 2000.
- PRYCE, J. D. A modification of Barker-Summerson method for determination of lactic acid. **Analyst**, v. 94, p. 1151-1152, 1969.
- RESENDE JÚNIOR, J.C.; PEREIRA, M.N.; BÔER, H.; TAMMINGA, S. Comparison of techniques to determine the clearance of ruminal volatile fatty acids. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 89, p. 3096-3106, 2006.
- ROOK, A.J.; GILL, M. Prediction of the voluntary intake of grass silages by beef cattle. 1. Linear regression analyses. **Animal Production**, Collingwood, v. 50, p. 425-438, 1990.
- ROOK, A.J.; DHANOA, M.S.; GILL, M. Prediction of the voluntary intake of grass silages by beef cattle. 2. Principle component and ridge regression analysis. **Animal Production**, Collingwood, v. 50, p. 439-454, 1990.
- RUSSELL, J.B., WALLACE, R.J. Energy yielding and consuming reactions. In: HOBSON, P. N. **The rumen microbial ecosystem**. Londo: Elsevier Science Publishers, 1988. p. 185-215.
- RUSSELL, J.B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca:editora, 2002. 119p.
- SALVADOR, S.C.; PEREIRA, M.N.; SANTOS, J.F.; MELO, L.Q.; CHAVES, M.L. Resposta de vacas leiteiras à substituição total de milho por polpa cítrica e à suplementação com microminerais orgânicos I: Consumo e digestão. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, p. 682-690, 2008.
- SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide**. Version 8.2. 5th ed. Cary: Statistical Analysis System Institute, 2001. 846p.
- SHAVER, R.D.; ERDMAN, R.A.; VANDERSALL, J.H. Effects of silage pH on voluntary intake of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, p. 2045-2049, 1984.

SHAVER, R.D.; ERDMAN, R.A.; O'CONNOR, A.M.; VANDERSALL, J.H. Effects of silage pH on voluntary intake of corn silage and alfalfa haylage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, p. 338-346, 1985.

SPOELSTRA, S.F.; COURTIN, M.G.; van BEERS, J.A.C. Acetic acid bacteria can initiate aerobic deterioration of whole crop maize silage. **Journal of Agriculture Science**, London, v. 111, p. 127-132, 1988.

ÚDEN, P. Using a novel macro in vitro technique to estimate differences in absorption rates of volatile fatty acids in the rumen. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, p. 1-7, 2010.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

VERBIC, J.; CHEN, X.B.; MACLEOD, N.A.; ORSKOV, E.R. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effects of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 114, p. 243-248, 1990.

VOELKER, J.A.; ALLEN, M.S. Pelleted beet pulp substituted for high-moisture corn: 2. Effects on digestion and ruminal digestion kinetics in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 86, p. 3553-3561, 2003.

WEIß, K.; KALZENDORF, C.; ZITTLAU, J.; AUERBACH, H. Novel results on the occurrence of volatile compounds in maize silages. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE PROCEEDINGS, 15., 2009. Madison **Proceedings...** Madison, 2009. p. 33-34.

WEISS, W.P.; CHAMBERLAIN, D.G.; HUNT, C.W. Feeding Silage. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America, 2003. p. 469-504.

WEISSBACH, F. Correction of dry matter content of silages used as substrate for biogas production. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE PROCEEDINGS, 15., 2009 **Madison. Proceedings...** Madison, 2009. p. 483-484.

WILES, P.G.; GRAY, I. K.; KISSLING, R.C. Routine analysis of protein by Kjeldahl and Dumas methods: review and interlaboratory study using dairy products. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 81, n. 3, p. 620-632, 1998.

WOLIN, M.J.; MILLER, T.L. Microbe-microbe interactions. In: HOBSON, P. N. **The rumen microbial ecosystem**. Elsevier Science Publishers 1988. p. 343-359.

YOSHII, T.; ASANUMA, N.; HINO, T. Effect of ethanol on nitrate and nitrite reduction and methanogenesis in the ruminal microbiota. **Animal Science Journal**, London, v. 76, p. 37-42, 2005.

4 CONTRIBUIÇÃO DA FRAÇÃO VOLÁTIL NO VALOR NUTRICIONAL DA SILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR

Resumo

A ensilagem da cana-de-açúcar leva a conversão de carboidratos solúveis à produtos de fermentação, que são, em sua maior parte, compostos orgânicos voláteis, especialmente o etanol. O objetivo deste experimento foi determinar se a fração volátil da silagem de cana-de-açúcar e a proporção deste volumoso na dieta afetam o consumo de alimentos e a digestão em bovinos. Seis novilhos da raça Nelore, adaptados com cânulas ruminais, foram agrupados em dois Quadrados Latinos 3x3 e alojados em gaiolas metabólicas individuais. Os tratamentos dietéticos foram: 75S: 75% de silagem de cana-de-açúcar sem a fração volátil (seca e reidratada) e 25% de concentrados; 75U: 75% de silagem de cana-de-açúcar com umidade original e 25% de concentrados e; 40U: 40% de silagem de cana-de-açúcar com umidade original e 60% de concentrados (% da MS₁₀₅). Cada período experimental teve duração de 14 dias, sendo nove de adaptação e os últimos cinco dias de coletas. Cerca de 21% da matéria seca da silagem de cana constituiu-se de compostos voláteis. A presença destes compostos na ração não alterou o consumo de matéria seca, mas aumentou a razão acetato/propionato e as taxas fracionais de absorção de valerato e etanol com o ruminorretículo evacuado. O menor teor de forragem da ração 40U possibilitou maior consumo de matéria seca e, conseqüentemente, alterou a maior parte das variáveis tradicionalmente associadas aos acréscimos de concentrados na dieta. A queda na digestibilidade dos nutrientes causada pelo maior consumo de matéria seca foi coerente àquela predita pelo NRC (2001). Quando o método de determinação do teor de matéria seca foi a desidratação em estufa a 105°C, os valores de NDT foram, em média, 1,1 a 3,8 unidades percentuais inferiores àqueles obtidos pelos cálculos utilizando a matéria seca determinada por destilação com tolueno. A fração volátil não alterou o consumo de alimentos e o processo de digestão nos animais, mas representou importante contribuição no valor energético de silagem de cana-de-açúcar, equivalente a 10% do valor determinado por digestibilidade.

Palavras-chave: Energia; Compostos orgânicos voláteis; Etanol; Consumo; Matéria seca

Abstract

Ensiling sugarcane leads to the conversion of water soluble carbohydrates to fermentation end-products, which are well characterized by high levels of volatile organic compounds, such as ethanol. The objective of this trial was to determine if volatile fraction from sugarcane silage and forage proportion would affect dry matter intake and digestion in cattle. Six rumen-cannulated Nellore steers were randomly assigned to a replicated 3x3 Latin square design with 14-d period. Steers were housed in a tie-stall barn, and individually fed ad libitum daily at 0800 h. Dietary treatments were balanced to reach isonitrogen content: 75S (dry) – 75% sugarcane silage without volatile fraction (dried at 60°C and re-hydrated) and 25% concentrate, 75U (wet) – 75% wet sugarcane silage and 25% concentrate, and 40U (wet) – 40% wet sugarcane silage and 60% concentrate (DM basis). About 21% of dry matter of sugarcane silage consisted of volatile compounds. The fate of these compounds did not alter the dry matter intake but increased the acetate/propionate ratio and the fractional absorption rates of valerate and ethanol with empty rumen. The lower forage content of 40U led to higher dry matter intake and, in turn, changed most of the measured variables traditionally associated with high concentrate diets. The decrease in digestibility caused by higher dry matter intake was consistent with the predicted by NRC (2001). By using the dehydration in an oven at 105°C, the DM content lead to TDN values ranging from 1.1 to 3.8 percentage units lower than those obtained by calculations using the dry matter determined by distillation with toluene. The volatile fraction did not alter dry matter intake and digestion process of the animal, but represented an important contribution to the energy content of sugarcane silage, as such 10% of energy value determined by digestibility.

Keywords: Energy; Volatile organic compounds; Ethanol; Intake; Dry matter

4.1 Introdução

A ensilagem da cana-de-açúcar leva a conversão de carboidratos solúveis à produtos de fermentação, que são, em sua maior parte, compostos orgânicos voláteis, especialmente o etanol. Esta rota se caracteriza por perda elevada de matéria, enquanto a energia bruta é preservada, devido ao alto valor calórico do produto final (McDonald et al., 1991).

Frequentemente, os produtos de fermentação de silagens são associados com redução do consumo de matéria seca pelo animal. Embora sem amparo científico, o etanol tem sido apontado como capaz de deprimir o consumo de alimentos. O comportamento ingestivo de animais alimentados com silagens de cana já foi comparado àquele de animais consumindo cana-de-açúcar in natura (Mari, 2008; Queiroz, 2006). No entanto, não existe entendimento detalhado de como os produtos de fermentação podem afetar a ingestão de alimentos e a digestão de rações contendo esta forragem.

Por outro lado, especula-se que a fração volátil de silagens de cana-de-açúcar, normalmente desconsiderada nas análises laboratoriais convencionais, pode contribuir para o desempenho animal. Em diversos experimentos, o desempenho observado de bovinos em crescimento, alimentados com silagens de cana-de-açúcar, atingiu valores entre 12 e 20% superiores ao desempenho predito por modelos matemáticos (Pedroso, 2003; Schmidt, 2006; Mari, 2008). Diante disso, o objetivo deste trabalho foi determinar se a fração volátil da silagem de cana-de-açúcar e a proporção deste volumoso na dieta afetam o consumo de alimentos e os parâmetros de digestão de novilhos canulados.

4.2 Material e métodos

A cana-de-açúcar da variedade SP81-3250 proveniente de um talhão implantado nas dependências do Departamento de Zootecnia da ESALQ, foi colhida aos 17 meses de crescimento (primeiro corte), sem a retirada da palha, com auxílio de colhedora (Mentamit®) acoplada ao trator. No momento da colheita, a determinação do teor de sólidos solúveis no caldo, por meio de refratômetro de campo, indicou 21,6°brix, o que indica a maturidade da cultura (Dinardo-Miranda et al., 2008). A produtividade estimada do talhão atingiu 164 t/ha e o teor de

matéria seca médio da cana-de-açúcar no momento da ensilagem foi 31,6%, caracterizando cultura com histórico antecedente de bom manejo agrônomo (Dinardo-Miranda et al., 2008).

A ensilagem foi realizada em tambores de plástico com capacidade de 200 L, sem aplicação de aditivos. A pesagem dos tambores na ensilagem e na abertura permitiu calcular as perdas de matéria seca e de gases. Como o teor de matéria seca da silagem foi determinado em estufa (%MS₁₀₅) e por destilação com tolueno (%MS_{tol}), foram geradas duas variáveis associadas à perda de matéria seca, perda de MS₁₀₅ e perda de MS_{tol}.

Tabela 24 - Produtos de fermentação, pH e N-NH₃ das silagens de cana

	Silagem de cana original	Sil. cana seca reidratada
pH	3,58	3,78
N-NH ₃ /N total, %	5,34	3,71
Ácido láctico, % MS _{tol}	5,65	4,71
Ácido acético, % MS _{tol}	2,00	0,48
Ácido propiônico, % MS _{tol}	0,06	0,01
Ácido isobutírico, % MS _{tol}	0,02	0,01
Ácido butírico, % MS _{tol}	0,37	0,21
Ácido isovalérico, % MS _{tol}	0,07	0,03
Ácido valérico, % MS _{tol}	0,01	0,00
Etanol, % MS _{tol}	10,79	1,25
Acético/Lático	0,35	0,10
Lático+AGV+Etanol, % MS _{tol}	18,96	6,70
Fração volátil identificada ¹ , % MS _{tol}	12,26	-
(MS _{tol} - MS ₁₀₅)/MS _{tol} , %	20,74	5,93
Fração volátil não identificada ² , % MS _{tol}	8,48	-

¹ Diferença entre as somas (Lático+AGV+Etanol) das silagens original e seca-reidratada, como proporção da MS_{tol};

² Fração volátil não identificada (% MS_{tol}) = (MS_{tol} - MS₁₀₅)/MS_{tol} - fração volátil identificada.

Após 60 dias de estocagem, iniciou-se o processo de secagem de parte da silagem, em estufa de ventilação forçada a 60°C. Cerca de metade dos silos experimentais, identificados ao acaso, foram desidratados e a forragem armazenada em sacos plásticos. Com o início do experimento, cerca de 90 dias após o fechamento dos silos, a forragem seca foi reidratada diariamente para atingir teor de matéria seca de aproximadamente 28% e os silos remanescentes

foram abertos conforme a demanda de silagem com umidade original, de aproximadamente um tambor para cada dois dias. A composição das silagens encontra-se na Tabela 24.

Seis novilhos da raça Nelore, com peso vivo de 522 ± 34 kg, providos de cânula no saco dorsal do rúmen, foram agrupados em dois quadrados latinos 3x3, com base no peso corporal, e alojados em gaiolas metabólicas individuais. Dentro de cada QL, os animais foram alocados aleatoriamente à sequência de três tratamentos dietéticos: 75S: 75% de silagem de cana-de-açúcar sem a fração volátil (seca e reidratada) e 25% de concentrados; 75U: 75% de silagem de cana-de-açúcar com umidade original e 25% de concentrados e; 40U: 40% de silagem de cana-de-açúcar com umidade original e 60% de concentrados (% da MS_{105}) (Tabelas 25 e 26).

Tabela 25 - Composição dos ingredientes das rações experimentais

Nutrientes	Sil. cana-de-açúcar		Sil. cana seca reidratada		Milho	F. soja
	% MS_{105} ¹	% MS_{tol} ²	% MS_{105}	% MS_{tol} ²	% MS_{105}	% MS_{105}
MS, % MN	22,00	27,76	27,77	29,52	86,78	86,01
PB	4,90	3,88	4,90	4,61	9,66	55,28
PBIDN	1,23	0,97	1,23	1,16	0,70	0,70
PBIDA	1,14	0,90	1,14	1,07	0,30	0,40
FDN	69,55	55,12	69,55	65,43	12,10	20,19
FDA ³	45,35	35,94	45,35	42,66	4,36	11,00
FDNi ⁴	45,69	36,21	45,69	42,98	4,08	2,28
FDNpf ⁵	23,86	18,91	23,86	22,45	8,02	17,91
Lignina	6,97	5,52	6,97	6,56	0,42	0,71
Extrato etéreo	1,00	0,79	1,00	0,94	0,82	0,80
Cinzas	3,90	3,09	3,90	3,67	1,72	6,91
CNF ⁶	21,88	38,09	21,88	26,51	76,40	17,52
DVIVMS ⁷	53,40	-	53,40	-	-	-
NDT _{1x} ⁸	54,12	61,79	54,12	56,31	84,49	77,52

¹ Matéria seca obtida por desidratação em estufa a 105°C;

² Matéria seca obtida por destilação com tolueno;

³ FDA obtido por método não sequencial;

⁴ FDN indigestível = resíduo de FDN incubado *in situ* por 120 horas;

⁵ FDN potencialmente fermentável = FDN – FDNi;

⁶ Carboidratos não fibrosos = $100 - (PB + (FDN - PBIDN) + EE + Cinzas)$;

⁷ Determinada por NIRS;

⁸ Nutrientes Digestíveis Totais em nível de manutenção estimado pelo NRC (2001).

Tabela 26 - Composição das rações experimentais

Ingredientes (% MS _{tol})	75S	75U	40U
Silagem de cana original	-	79,19	45,72
Silagem de cana sem fração volátil	75,65	-	-
Milho moído fino	11,35	9,70	48,19
Farelo de soja	10,02	8,56	2,43
Uréia	1,19	1,02	1,65
Calcário calcítico	0,39	0,34	0,72
Núcleo vit-mineral	1,40	1,19	1,29
Nutrientes (% MS _{tol})			
MS, % MN	35,21	32,37	44,11
Matéria orgânica	94,54	95,26	95,58
PB	13,47	11,60	12,41
FDN	52,89	46,55	31,52
Extrato etéreo	0,88	0,77	0,78
CNF	30,48	39,07	54,65
NDT _{1x}	59,96	63,76	70,85
Proporção forragem:concentrados (% MS _{tol})	76:24	79:21	46:54
Estratificação de partículas			
> 38 mm, %	1,48	4,13	3,15
19 – 38 mm, %	4,38	7,26	4,15
8 – 19 mm, %	42,90	44,65	27,70
< 8 mm, %	51,24	43,97	65,00
Tamanho médio de partículas, mm	11,06	15,63	11,32

Diariamente, as silagens foram misturadas aos concentrados e fornecida aos animais (8:00 h), em quantidade para que houvesse no mínimo 15% do oferecido como sobras. Cada período experimental teve duração de 14 dias, sendo os nove primeiros de adaptação e os últimos cinco dias de coletas.

O consumo diário de alimentos foi determinado pela diferença entre a quantidade ofertada e as sobras, entre os dias 10 e 13 de cada período. Em decorrência da perda dos produtos de fermentação pôde-se calcular e comparar três variáveis associadas ao consumo de matéria seca: 1) consumo de MS₁₀₅, utilizando-se os teores de matéria seca do oferecido e das sobras, obtidos

por desidratação em estufa a 105°C; 2) consumo de MS_{tol} , utilizando-se os teores de matéria seca do oferecido e das sobras, obtidos por destilação com tolueno, 3) consumo de MS, utilizando-se o consumo de MS_{tol} corrigido para as perdas de etanol, ácido acético e fração volátil não identificada. Para isto, a taxa de ingestão (min/kg MS) foi utilizada para converter tempo de ingestão em consumo (kg de MS) para cada hora do dia, assumindo-se que a taxa de ingestão para cada animal seria constante ao longo do dia. Com a taxa fracional de desaparecimento, as concentrações de etanol, ácido acético e fração volátil não identificada nas rações foram previstas para cada uma das 24 horas, e o consumo dos compostos foi estimado. A taxa fracional de perda da fração volátil não identificada foi assumida como a média entre as taxas de perdas de etanol e ácido acético.

Do dia 11 ao dia 13 foi realizada coleta total de fezes para estimativa da digestibilidade aparente de nutrientes. No dia 11 de cada período, o comportamento ingestivo dos animais foi observado a cada 5 minutos durante 24 horas (Maekawa et al., 2002). Foram registrados os tempos de ingestão, ruminação e mastigação. Amostras de silagens, rações totais e sobras foram coletadas para determinação do tamanho de partículas, com auxílio do “Penn State Particle Size Separator” (Lammers et al., 1996). O índice de seleção de partículas foi calculado como o consumo observado de cada fração retida em cada peneira expresso como porcentagem do consumo predito daquela fração (% da matéria natural). Valores indicaram recusa (<100%), ingestão preferencial (>100%) ou ausência seleção (=100%) (Leonardi e Armentano, 2003). No dia 12, as quantidades acumuladas de alimento consumido em 4, 12 e 24 h foram aferidas a fim de verificar os possíveis efeitos deletérios da fração volátil no padrão de consumo.

Para caracterização dos efeitos da fração volátil da silagem na degradação ruminal, amostras de cana-de-açúcar *in natura* e de silagem de cana, desidratadas a 60°C e moídas a 5 mm, foram alocadas em sacos de nylon e incubadas em triplicata no saco ventral do rúmen por 24 horas, no dia 11 de cada período. Respeitou-se a taxa de 15 mg de amostra/cm² de superfície do saco (Nocek, 1985). No mesmo dia, *data loggers* foram inseridos no saco ventral do rúmen para registrar a temperatura a cada 30 minutos durante 24 horas. Para estimar o fluxo de proteína microbiana, amostras de urina foram coletas no dia 12 de cada período, entre quatro e seis horas após a alimentação. As amostras foram acidificadas com ácido sulfúrico concentrado (2-3 gotas de ácido/40 mL de amostra) e armazenadas a -20°C para posteriores determinações das concentrações de alantoína, ácido úrico e creatinina por cromatografia líquida (Czauderna e

Kiwalczyk, 2000), no Laboratório de Nutrição Animal (CENA/USP, Piracicaba/SP). O volume de urina produzido foi estimado com base na excreção de creatinina (mg/kg PV), no peso vivo (kg) e na concentração de creatinina na amostra “spot” (Chizzotti et al., 2008):

$$\text{Urina (L/d)} = [(32,27 - 0,01093 \cdot \text{PV}) \cdot \text{PV}] / \text{Concentração de creatinina (mg/L)} \quad (1)$$

A excreção de derivados de purinas (alantoína e ácido úrico) (mmol/d) foi determinada multiplicando-se o volume de urina (L/d) pela concentração total de derivados de purinas (mM). A absorção de purinas foi calculada a partir da excreção de derivados de purinas (X, mmol/d) (Verbic et al., 1990):

$$\text{Absorção de purinas (mmol/d)} = (X - 0,385 \cdot \text{PV}^{0,75}) / 0,85 \quad (2)$$

onde 0,85 representa a recuperação de purinas absorvidas como derivados de purinas e $0,385 \cdot \text{PV}^{0,75}$ a contribuição endógena para a excreção de purinas.

A síntese ruminal de compostos nitrogenados foi calculada em função da absorção de purinas (Y, mmol/d), utilizando a equação descrita por Chen e Gomes (1992):

$$\text{Síntese de compostos nitrogenados (g/d)} = 70 \cdot Y / (0,83 \cdot 0,116 \cdot 1000) \quad (3)$$

onde 70 indica o conteúdo de N nas purinas microbianas (mg N/mol), 0,83 a digestibilidade das purinas bacterianas e 0,116 a razão $N_{\text{purinas}}/N_{\text{total}}$ nas bactérias. A massa de N foi convertida para proteína bruta pelo fator 6,25.

No 13º dia, amostras de fluido ruminal foram coletadas sob atmosfera de nitrogênio (anaerobiose), a cada duas horas, por 24 horas, para determinação de pH e potencial redox (E_h). Como o potencial redox foi medido com eletrodo de platina (E_0), os valores foram corrigidos pela equação (Marden et al., 2005):

$$E_h = E_0 + 199 \text{ mV} \quad (4)$$

A pressão parcial de hidrogênio (P_{H_2}) foi estimada com base na equação de Nernst (Marden et al., 2009):

$$-\log P_{H_2} = E_h/30 + 2 \cdot \text{pH} \quad (5)$$

Alíquotas de fluido ruminal foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20°C para posteriores determinações das concentrações de AGV (Palmquist e Conrad, 1971) e N-NH_3 (Chaney e Marback, 1962).

Ainda no dia 13, as temperaturas e as taxas fracionais de desaparecimento de etanol e ácido acético foram determinadas nas silagens e nas rações completas. Aproximadamente 3 kg das silagens ou das rações completas foram alocados em baldes de plástico, que foram posicionados próximo aos cochos dos animais, em duplicata. Tomou-se o cuidado de não compactar a massa, ao introduzi-la nos baldes. As temperaturas foram mensuradas a cada 30 minutos com o auxílio de *data loggers*, inseridos no centro geométrico da massa. Dois *data loggers* foram programados para registrar a temperatura do ambiente. Amostras foram coletadas 0, 2, 4, 8, 12 e 24 horas de exposição. As taxas fracionais de desaparecimento foram determinadas pela queda exponencial das concentrações de etanol e ácido acético, expressas como % MS_{105} .

No dia 14 de cada período, aproximadamente 6 h após alimentação, 3 L de solução contendo CrEDTA (Binnerts et al., 1968), 150 mL de ácido valérico e 100 mL de etanol, com pH ajustado para 6,5, foram infundidos em vários pontos do rúmen. Amostras de fluido ruminal foram coletadas 0,5; 1; 1,5; 2 e 4 horas após a infusão. Durante as coletas, a água e os alimentos foram suspensos para evitar interferências no volume de fluido ruminal. A taxa fracional de passagem de fluido foi determinada pela queda na concentração de Cr. As taxas fracionais de remoção de valerato e etanol foram determinadas pelas taxas de queda nas concentrações de valerato e etanol. As taxas fracionais de absorção de valerato e de absorção+degradação de etanol foram estimadas por diferença entre as taxas fracionais de remoção e passagem. As concentrações de valerato foram determinadas por cromatografia, as concentrações de Cr por ICP-plasma e as concentrações de etanol por colorimetria.

Imediatamente após o ensaio de absorção com o rúmen intacto, a digesta foi evacuada manualmente e o ruminorretículo foi lavado com solução fisiológica (NaCl 0,9%) a 37°C . Quinze

litros de solução contendo CrEDTA, 100 mL de ácido valérico e 65 mL de etanol, com pH ajustado para 6,5 foi infundida e amostras da solução foram coletadas nos tempos 0; 0,5; 1; 1,5 e 2 horas após a infusão. O conteúdo ruminal foi pesado e amostras foram desidratadas em estufa a 60°C para determinação do teor de matéria seca, volume de fluido ruminal e teor de FDN indigestível (FDNi).

Antes de retornar a digesta ao órgão, um fragmento de aproximadamente 2 cm² da mucosa do saco ventral (recesso do rúmen) foi coletado por biópsia. Metade do fragmento foi preservado em solução tampão fosfato resfriada e utilizado para mensurações macroscópicas (superfície média de papilas, no de papilas/cm² e razão superfície do fragmento/cm² de parede) e a outra metade fixada em líquido de Bouin e preservada em álcool 70°GL para posterior confecção de lâminas histológicas e a determinação do índice mitótico (Daniel, 2007). Ao término das coletas do dia 14, todos os animais foram pesados.

Os teores de FDNi do conteúdo ruminal e das rações foram determinados como o resíduo de FDN após incubação in situ das amostras por 120 horas em vacas canuladas não lactantes, alimentadas com rações com alto teor de forragens. A taxa fracional de ciclagem de matéria seca no rúmen foi calculada como descrita por Voelker e Allen (2003):

$$\text{Ciclagem (\%/h)} = 100 * (\text{Consumo de MS}_{105} / \text{Pool ruminal de MS}_{105}) / 24 \quad (6)$$

A taxa fracional de passagem de sólidos foi estimada como (Krizsan et al., 2010):

$$\text{kp (\%/h)} = 100 * (\text{Consumo de FDNi} / \text{Pool ruminal de FDNi}) / 24 \quad (7)$$

A diferença entre as taxas fracionais de ciclagem e passagem foi definida como a taxa fracional de degradação ruminal.

Com o volume de fluido ruminal (L) e as concentrações médias dos AGV ao longo de 24 horas (mM) foi possível estimar o pool ruminal médio de cada AGV (mol). Multiplicando-se a taxa fracional de remoção do ácido valérico (%/h) pelo pool ruminal médio de cada AGV (mol), determinou-se o fluxo ruminal de cada AGV (mol/h). Então, o fluxo diário de cada AGV foi determinado multiplicando-se o fluxo ruminal por 24 horas (mol/d). A energia proveniente dos AGV ruminais (Mcal/d) foi estimada pelo somatório do produto entre o fluxo diário de cada

AGV e seu respectivo calor de combustão. Os AGV considerados foram acetato (209 kcal/mol), propionato (367 kcal/mol) e butirato (524 kcal/mol) (Resende Júnior et al., 2006).

As amostras de silagens, concentrados, sobras e fezes foram preservadas a -20°C. Uma amostra composta foi formada para cada período, tomando-se proporções iguais de matéria original das amostras individuais. Das amostras compostas de silagens, uma porção foi utilizada para preparo de extrato aquoso (Kung Jr. et al., 1984), outra alíquota para determinação do teor de matéria seca por destilação com tolueno (Dewar e McDonald, 1961) e o remanescente desidratado em estufa a 60°C. Uma porção das amostras de sobras foi usada para determinação do teor de matéria seca por destilação com tolueno e o restante desidratado em estufa a 60°C. As amostras de fezes foram desidratadas em estufa a 60°C.

As amostras secas foram moídas em moído tipo Wiley provido de peneira com poro de 1 mm. Sub-amostras foram utilizadas para determinação do teor de matéria seca a 105°C (AOAC, 1980), proteína bruta (Wiles et al., 1998), extrato etéreo (AOAC, 1990), cinzas (AOAC, 1980), FDN, FDA, nitrogênio ligado a FDN (N-FDN), nitrogênio ligado a FDA (N-FDA) e lignina (Van Soest et al., 1991). Nos extratos aquosos de silagens foram determinadas o pH e as concentrações de ácidos graxos voláteis (Palmquist e Conrad, 1971), nitrogênio amoniacal (Chaney e Marback, 1962), etanol (Procedimento Sigma N° 332 - UV) e ácido láctico (Pryce, 1969). As digestibilidades verdadeiras in vitro da matéria seca (DVIVMS) das silagens e o teor de amido fecal foram estimados por espectroscopia de reflectância de infravermelho proximal (NIRSystems 5000 - FOSS®).

O teor de amido fecal foi usado para estimar a concentração energética do milho moído (Zinn et al., 2007):

$$\text{ELm milho (Mcal/kg)} = 2,49 - 0,0127 * (\% \text{Amido fecal}) - 0,000292 * (\% \text{Amido fecal} * \% \text{Amido fecal}) \quad (8)$$

O valor de ELm foi convertido para ED e, posteriormente, para NDT (Zinn et al., 2007):

$$\text{ED milho (Mcal/kg)} = (\text{ELm milho} + 0,568)/0,708 \quad (9)$$

$$\text{NDT milho (\%)} = \text{ED milho}/0,04409 \quad (10)$$

A razão entre o NDT_{1x} do farelo de soja e o NDT_{1x} do milho moído estimados pelo NRC (2001) foi 0,92 (Tabela 22). Esta razão foi usada para calcular o NDT do farelo de soja a partir do NDT do milho moído estimado pelo amido fecal:

$$NDT \text{ farelo de soja (\%)} = NDT \text{ milho (\%)} * 0,92 \quad (11)$$

De posse dos NDT das rações, determinado pela digestibilidade aparente dos nutrientes, os NDT das silagens de cana foram calculados por diferença:

$$NDT \text{ sil. cana (\%)} = [\%NDT \text{ ração} - (\%NDT \text{ milho} * \% \text{milho na ração}) - (\%NDT \text{ f. soja} * \% \text{f. soja na ração})] / (\% \text{sil. cana na ração}) \quad (12)$$

As variáveis foram analisadas pelo procedimento MIXED do SAS (2001), usando o seguinte modelo: $y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_{j(i)} + \gamma_k + \delta_l + \varepsilon_{ijkl}$; onde μ : média geral, α_i : efeito de quadrado latino ($i = 1$ ou 2), $\beta_{j(i)}$: efeito de animal dentro de quadrado ($j = 1$ a 6), γ_k : efeito de período ($k = 1$ a 3), δ_l : efeito de tratamento ($l = 75S, 75U$ ou $40U$), ε_{ijkl} : resíduo. As médias foram comparadas por contrastes ortogonais, para verificar o efeito da fração volátil (75S vs 75U) e o efeito do teor de forragem nas dietas (75U vs 40U). As variáveis mensuradas várias vezes no mesmo período foram analisadas como medidas repetidas no tempo. A interação animal*tratamento foi usada como termo de erro para testar o efeito de tratamento. Foram testadas as seguintes estruturas de covariância: componentes de variância, simetria composta, auto-regressiva de primeira ordem e não estruturada (Littell et al., 1998). Adotou-se a estrutura com menor valor para o Critério de Informação de Akaike (AIC). Correlações foram estabelecidas pelo procedimento CORR do SAS.

4.3 Resultados e discussão

O objetivo de obter silagem de cana-de-açúcar (controle positivo) com concentrações elevadas de produtos de fermentação foi alcançado pela confecção dessa silagem sem aditivos (Tabela 24). O somatório das frações ácido lático, AGV e etanol perdidos durante a secagem das amostras em estufa a 60°C representou a maior parte dos compostos voláteis, todavia, cerca de

8% da MS_{tot} da silagem de cana-de-açúcar constituiu-se de compostos não identificados. Embora a destilação com tolueno possa ter superestimado o teor de MS, diversos compostos, de diferentes grupos químicos, têm sido identificados em silagens de milho e de capins em clima temperado, com destaque para ésteres, alcoóis, cetonas e aldeídos (Morgan e Pereira, 1962; Weiß et al., 2009; Chmelová, 2010). A inclusão de marchas analíticas capazes de determinar estes compostos é de urgência para a rotina dos laboratórios envolvidos com pesquisas no campo da ensilagem.

A partir das pesagens dos silos experimentais foi possível estimar as perdas gasosas e de matéria seca, por meio de método gravimétrico. Quando o teor de matéria seca da silagem foi determinado em estufa a 105°C, a perda de MS atingiu 33%, mas este valor foi, de fato, muito menor (15%) e mais coerente quando o teor de matéria seca foi determinado por destilação com tolueno (Figura 17). A determinação do teor de MS em estufas de ventilação forçada superestimou as perdas e pode ser um fator de confundimento em experimentos que visem comparar estratégias para redução de perdas no processo de ensilagem, especialmente para culturas cujos produtos de fermentação constituem-se, em sua maior parte, de compostos orgânicos voláteis, como por exemplo, a cana-de-açúcar.

Figura 17 - Perdas de matéria seca e de gases dos silos experimentais de cana-de-açúcar

As taxas fracionais de desaparecimento de etanol não diferiram entre as silagens e as rações (Figura 18), apesar das características contrastantes em termos de pH, teor de matéria seca e concentração de etanol. Devido a natureza neutra deste composto, a menor possibilidade de interferir na taxa de volatilização remete a importância do controle de microrganismos capazes de

oxidar o etanol na presença de oxigênio, como estratégia para diminuição de perdas. Interferir na atividade microbiana na fase aeróbia pós-abertura também pode resultar em menor aquecimento da massa e, portanto, em menor taxa de perdas de compostos orgânicos voláteis.

Figura 18 - Taxas fracionais de desaparecimento de etanol nas silagens de cana e rações totais. $P = 0,93$ para efeito de tratamento

Na Figura 19, houve tendência ($P = 0,11$) de menor taxa fracional de perda de ácido acético para a ração 75S (0,9%/h) em relação à ração 75U (3,0%/h). Provavelmente isto ocorreu pela menor concentração deste composto (Tabela 24) e pela menor proporção de moléculas não dissociadas, ditada pelo pH mais elevado do meio (Figura 20). Para que ocorra volatilização, as moléculas devem estar na forma não dissociada (Atkins, 1994), daí a justificativa para a menor taxa de perdas para o pH mais alto. Comparando as rações 75U e 40U pode-se inferir que as variações de pH e de teor de MS causadas pelos alimentos concentrados (Figura 20) não foi capaz de alterar a taxa fracional de desaparecimento do ácido acético. O efeito benéfico do ácido acético na estabilidade aeróbia de silagens é consenso na literatura e a aplicação de *L. buchneri* tem sido considerada promissora para geração deste composto. Entretanto, são necessárias alternativas à bactérias heteroláticas, visto que a produção excessiva de ácido acético pode ser problemática, pois diminui a recuperação de MS (McDonald et al., 1991), inibe o consumo de alimentos em animais não adaptados (Daniel et al., 2011) e acelera a volatilização deste próprio composto, como observado neste trabalho. A aplicação de aditivos químicos (O'Kiely, 2009) e a visão contemporânea relativa à ação de bactérias lácticas homofermentativas ou

heterofermentativas facultativas com atividades antifúngicas (Nishino, 2011) são alguns dos caminhos promissores a serem percorridos.

Figura 19 - Taxas fracionais de desaparecimento de ácido acético nas silagens de cana e rações totais. $P = 0,39$ para efeito de tratamento

Figura 20 - pH das silagens (S: seca e reidratada; U: úmida) e das rações completas (75S; 75U; 40U). $P < 0,01$ para efeito de tratamento; $P < 0,01$ para efeito de tempo; $P < 0,01$ para interação entre tratamento e tempo

Considerando as taxas médias de desaparecimento do etanol (3,6%/h) e do ácido acético (2,3%/h) e o comportamento ingestivo dos animais (Figura 23), pôde-se estimar que 82% do etanol e 87% do ácido acético presentes nas silagens foram efetivamente ingeridos pelos animais. O restante volatilizou ou foi oxidado por microrganismos (Mitloehner et al., 2009; Spoelstra et

al., 1988; Driehuis et al., 1999). A determinação da concentração de ácido láctico em amostras de sobras, coletadas aleatoriamente, indicou estabilidade plena deste composto durante o período de exposição das rações. Tal ocorrência já era esperada devido a baixa pressão de vapor, ditada pela alta polaridade deste composto (Atkins, 1994). No trabalho publicado por Weissbach (2009), apenas 8% do ácido láctico foi perdido por volatilização após secagem de amostras de silagens a 105°C.

As temperaturas das rações e das silagens não diferiram e indicaram estabilidade ao longo do dia (Figura 21). A temperatura do estábulo (ambiente) ilustra o desafio térmico para os animais e para as rações por época do experimento, conduzido no verão. A grande variação da temperatura ambiente impediu a exploração de conceitos relacionados à quebra de estabilidade aeróbia (O'Kiely, 2009).

Figura 21 - Temperaturas das silagens (S: seca e reidratada; U: úmida), das rações completas (75S; 75U; 40U) e do ambiente. $P = 0,94$ para efeito de tratamento; $P < 0,01$ para efeito de tempo; $P = 0,99$ para interação entre tratamento e tempo

Os métodos adotados para determinar o teor de matéria seca das silagens afetaram os resultados e as interpretações inerentes à ingestão de rações (Tabela 27 e Figura 22). Por meio da MS_{105} pôde-se afirmar que os compostos voláteis inibiram o consumo de matéria seca ($P = 0,03$

para 75S vs 75U). Por outro lado, quando a massa de fração volátil foi considerada nos cálculos o consumo de matéria seca efetuado pelos animais foi análogo entre os tratamentos com (75U) e sem (75S) fração volátil, ou seja, os produtos de fermentação da silagem de cana não inibiram o consumo de ração. Esta observação é apoiada pela similaridade entre os tempos de ingestão nas primeiras 4 h após a alimentação (Tabela 27). No trabalho de Krizsan et al. (2006), a suplementação de novilhos com ácido acético, isolado ou em mistura, reduziu a ingestão de silagem. Entretanto, quando a massa dos compostos foi levada em conta, o consumo de MS foi o mesmo para todos os tratamentos.

O aumento na proporção de concentrados elevou o consumo de matéria seca (75U vs 40U), indicando a limitação física de consumo pelas rações com alto teor de forragens. Outros indícios de enchimento do trato digestório foram os pools ruminais de massa úmida, matéria seca e FDNi (Tabela 28). As menores taxas de degradação ruminal da matéria seca foram as principais causas do baixo consumo das rações ricas em forragem, já que as taxas fracionais de passagem de sólidos não foram alteradas pelos tratamentos (Tabela 28). No trabalho de Gallo et al. (2000), a maior inclusão de concentrados elevou o consumo de MS e o ganho de peso diário de novilhas da raça Holandesa alimentadas com rações a base de cana-de-açúcar. Deste modo, maior inclusão de concentrados apresentou-se como ferramenta para promover o consumo de dietas contendo silagem de cana.

Os tempos de ingestão, ruminação e mastigação não foram afetados pela fração volátil. Conforme as expectativas, a menor razão forragem:concentrado (40U) reduziu os tempos de ingestão, ruminação e mastigação, apesar do maior consumo de MS (Tabela 27). Como o tempo de mastigação foi numericamente inferior para o tratamento 75S em relação ao tratamento 75U, os tempos de mastigação por kg de MS e por kg de FDN consumidos foram diminuídos. É possível que os processos de secagem e reidratação da silagem tenham fragilizado as partículas, culminado em ligeiramente diminuição da efetividade da FDN da ração 75S, como indicado pela distribuição das partículas na Tabela 26. Por outro lado, o maior consumo de matéria seca apresentado pelo tratamento 40U resultou em menores tempos de mastigação por kg de MS e por kg de FDN consumidos (Tabela 27). O padrão de ingestão ao longo do dia não foi alterado pelas dietas (Figura 23). No trabalho de Schmidt et al. (2004), os autores especularam o efeito inibitório do etanol no consumo de matéria seca. Entretanto, naquele trabalho o tempo de ingestão nas primeiras 6 h após a alimentação foi superior para o tratamento controle, com maior

teor de etanol, e o menor consumo diário de matéria seca pode ter sido causado por enchimento ruminal, indicado pela maior taxa de ruminação (min/kg MS).

Tabela 27 - Respostas de novilhos alimentados com rações contendo silagens de cana

Variável	Tratamento				<i>P</i>	
	75S	75U	40U	EP	75S vs 75U	75U vs 40U
Consumo de MS ₁₀₅ , kg/d	6,19	5,30	8,95	0,35	0,03	<0,01
Consumo de MS _{tol} , kg/d	6,54	6,39	9,96	0,41	0,71	<0,01
Consumo de MS ¹ , kg/d	6,54	6,19	9,79	0,41	0,36	<0,01
CMS – CMS ₁₀₅ , kg/d	0,35	0,89	0,84	-	-	-
Ingestão, min/d	264	268	227	19,50	0,81	0,03
Ruminação, min/d	518	561	472	34,47	0,34	0,05
Mastigação, min/d	782	829	698	47,16	0,36	0,02
Mastigação/CMS, min/kg	118	136	72	6,44	0,02	<0,01
Mastigação/CFDN, min/kg	237	296	227	16,38	<0,01	<0,01
Ingestão durante 4 h após alimentação, min	90	94	96	14,19	0,72	0,86

¹CMS (kg/d) = CMStol ajustada para perdas de compostos voláteis no cocho.

Figura 22 - Consumo acumulado de MS_{tol} ao longo do dia 12 de cada período. $P < 0,01$ para efeito de tratamento. $P < 0,01$ para efeito de tempo. $P < 0,01$ para interação entre tratamento e tempo

Tabela 28 - Conteúdo ruminal de novilhos alimentados com rações contendo silagens de cana

Parâmetro	Tratamento				<i>P</i>	
	75S	75U	40U	EP	75S vs 75U	75U vs 40U
Massa úmida, kg	42,60	38,40	38,98	2,48	0,01	0,64
Teor de MS ₁₀₅ , % MN	12,25	11,10	11,92	0,32	0,04	0,10
Pool de água, kg	37,29	34,14	34,33	2,09	0,01	0,83
Pool de MS ₁₀₅ , kg	4,91	3,97	4,33	0,37	0,02	0,25
Pool de FDNi, kg	3,31	2,62	2,71	0,34	0,03	0,70
Pool de FDNi/PV ^{0,75} , g/kg	29,83	24,15	24,82	2,32	0,03	0,76
Ciclagem de MS ₁₀₅ , %/h	4,61	5,46	7,82	0,64	0,14	<0,01
kp de sólidos ¹ , %/h	2,84	3,03	2,84	0,42	0,48	0,44
Digestibilidade da MS ₁₀₅ no rúmen ² , %	42,97	42,82	64,87	1,77	0,91	<0,01

¹Estimada por evacuação do ruminorretículo (Krizsan et al., 2010);

²Digestibilidade ruminal = (Ciclagem - Taxa de passagem) / Ciclagem.

Figura 23 - Padrão de ingestão de ração ao longo do dia. $P = 0,40$ para efeito de tratamento; $P < 0,01$ para efeito de tempo; $P = 0,98$ para interação entre tratamento e tempo

O consumo preferencial de partículas, indicado pelo índice de seleção, não foi alterado pelos tratamentos (Figura 24). Em todos os casos, os animais priorizaram o consumo de partículas menores, o que reflete a contribuição significativa de partículas longas nas sobras. Este achado tem sido frequente e parece normal para bovinos (Leonardi e Armentano, 2003; Leonardi et al., 2005; Maulfair et al., 2010). Em rações com suprimento adequado de fibra, a inclusão de volumosos com partículas muito longas agrava o comportamento seletivo e pode comprometer o consumo de fibra fisicamente efetiva (Armentano, 2005). Considerando a alta efetividade física de FDN da cana-de-açúcar (Goulart et al., 2010), o fornecimento deste volumoso com partículas pequenas constitui-se em estratégia para diminuir a seleção e os desvios de composição entre dieta formulada e dieta consumida.

Figura 24 - Índice de seleção de partículas. $P = 0,93$ para efeito de tratamento. $P < 0,01$ para efeito de peneira. $P = 0,18$ para interação entre tratamento e peneira. ^{a,b,c} Indicam diferenças entre peneiras (Tukey-Kramer, $\alpha = 0,05$)

A degradação ruminal in situ da cana-de-açúcar fresca ou ensilada indicou que todas as rações resultaram em ambiente ruminal propício à digestão (Figura 25). A hipótese de que o etanol presente na fração volátil da silagem de cana-de-açúcar pudesse favorecer a atividade microbiana (Chalupa et al., 1964) não foi comprovada neste trabalho. A cana fresca, entretanto, apresentou maior degradação da MS₁₀₅ em 24 horas (55%) que a cana ensilada (39%). Grande parte deste efeito se deveu a secagem das amostras em estufa a 60°C, capaz de remover a maior parte dos produtos de fermentação. Em amostras frescas, consumidas pelos animais, os

compostos voláteis compõem a fração A (prontamente degradável no rúmen) e agregam a proporção de MS degradada no rúmen.

Figura 25 - Degradação ruminal da cana-de-açúcar in natura (fresca) ou ensilada (silagem) após 24 horas de incubação in situ. $P = 0,13$ para efeito de tratamento. $P < 0,01$ para efeito de forragem. $P = 0,58$ para interação entre tratamento e forragem

As digestibilidades aparentes e os valores de NDT das rações encontram-se na Tabela 29. A fração volátil não alterou a digestibilidade dos nutrientes, entretanto, a maior proporção de ingredientes concentrados elevou as digestibilidades aparentes da matéria seca e da matéria orgânica. A digestibilidade da FDN não foi afetada pelos tratamentos e apresentou-se superior aos coeficientes comumente encontrados na literatura para condições similares (Andrade e Pereira, 1999). Isolando-se o NDT do milho e o NDT do farelo de soja, foi possível estimar o NDT das silagens de cana (Tabela 29). O baixo consumo de matéria seca contribuiu para a alta digestibilidade dos nutrientes, resultando em valores de NDT superiores àqueles estimados em animais em nível de produção. Assumindo que o consumo apresentado pelo tratamento 75U seja àquele de manutenção (1X), o tratamento 40U representaria o consumo de matéria seca próximo à 2X a manutenção. Neste sentido, o valor de NDT da silagem de cana foi diminuído em 4,59 unidades percentuais com o maior consumo de matéria seca da dieta com maior teor de concentrados. Esta redução é coerente àquela adotada pelo NRC (2001) como fator de desconto para conversão do NDT em nível de manutenção para NDT em nível de produção.

Tabela 29 - Digestibilidade aparente no trato total, NDT das rações e NDT das silagens

Parâmetro (%)	Tratamento				P	
	75S	75U	40U	EP	75S vs 75U	75U vs 40U
MS ₁₀₅	70,60	68,36	74,64	1,55	0,34	0,02
MS _{tol}	72,14	73,76	77,21	1,41	0,43	0,11
MO ₁₀₅	71,54	69,47	75,68	1,48	0,36	0,02
MO _{tol}	73,11	74,95	78,26	1,34	0,36	0,11
FDN	60,08	57,31	54,40	2,22	0,42	0,37
NDT1 ¹ ração	71,94	69,99	77,41	1,45	0,36	<0,01
NDT2 ² ração	73,08	73,74	78,96	1,37	0,74	0,02
NDT2/NDT1 ração, %	101,58	105,36	102,00	-	-	-
Amido fecal, % MS ₁₀₅	3,49	3,63	5,05	-	-	-
NDT do milho ³ , % MS ₁₀₅	96,43	96,36	95,66	-	-	-
NDT1 da sil. cana ⁴ , % MS ₁₀₅	68,79	66,21	60,25	-	-	-
Índice relativo [‡] , %	-	96,25	91,00	-	-	-
NDT2 da sil. cana ⁵ , % MS	70,38	71,73	67,20	-	-	-
Índice relativo [‡] , %	-	101,92	93,68	-	-	-
NDT2/NDT1 sil. cana, %	102,31	108,34	111,54	-	-	-

¹Nutrientes digestíveis totais (% MS₁₀₅). Compostos voláteis não foram considerados;

²Nutrientes digestíveis totais considerando os compostos voláteis na fração carboidratos não fibrosos (% MS);

³Estimado pelas equações publicadas por Zinn et al. (2007);

⁴Calculado pela diferença entre o NDT1 da ração e o NDT dos concentrados;

⁵Calculado pela diferença entre o NDT2 da ração e o NDT dos concentrados;

[‡] Índice relativo = 75U/75S ou 40U/75U.

Quando o método de determinação do teor de matéria seca foi a desidratação em estufa a 105°C, os valores de NDT das rações foram 1,1 a 3,8 unidades percentuais inferiores àqueles obtidos pelos cálculos que computaram o consumo de compostos voláteis. Levando em conta o consumo de matéria seca, esta variação representou 0,33 a 0,86 kg de NDT. Em simulação realizada com auxílio do software do NRC Gado de Corte (1996), esta variação poderia ser traduzida em ganho de peso diário de até 338 g para tourinhos da raça Nelore em terminação⁶. Vale comentar que estes desvios poderiam ser menores caso o método de determinação do teor de

⁶ Entradas consideradas: PV = 400 kg; ECC = 5,0; Idade = 24 meses; PV à maturidade = 540 kg; *Grading system* = 2; Uso de ionóforos = Sim; Uso de implantes = Não.

MS das fezes fosse a destilação com tolueno ao invés de secagem em estufa (Colovos et al., 1957).

Em relação aos parâmetros físico-químicos do fluido ruminal, a fração volátil da silagem de cana-de-açúcar não alterou o pH, o E_h , a temperatura e a P_{H_2} . A mudança da razão forragem:concentrado, entretanto, foi capaz de alterar estas variáveis (Figuras 26 a 29). Maior proporção de concentrados aumentou o E_h ($P < 0,01$) e a temperatura ($P < 0,01$), mas abaixou o pH ($P < 0,01$) e tendeu a diminuir a P_{H_2} ($P = 0,11$). De forma conjunta, estas alterações confirmam a maior atividade microbiana no rúmen dos animais alimentados com a ração 40U (Russell, 2002).

Figura 26 - pH ruminal de novilhos alimentados com rações contendo silagem de cana-de-açúcar. $P < 0,01$ para efeito de tratamento. $P < 0,01$ para efeito de tempo. $P < 0,01$ para interação entre tratamento e tempo

Figura 27 - Potencial redox (E_h) do fluido ruminal. $P < 0,01$ para efeito de tratamento. $P < 0,01$ para efeito de tempo. $P = 0,96$ para interação entre tratamento e tempo. $P = 0,88$ para o contraste 75S vs 75U e $P < 0,01$ para o contraste 75U vs 40U

Figura 28 - Temperatura do fluido ruminal. $P < 0,01$ para efeito de tratamento. $P < 0,01$ para efeito de tempo. $P = 0,84$ para interação entre tratamento e tempo. $P = 0,53$ para o contraste 75S vs 75U e $P < 0,01$ para o contraste 75U vs 40U

Figura 29 - Pressão parcial de hidrogênio (P_{H_2}) no fluido ruminal de novilhos alimentados com rações contendo silagens de cana-de-açúcar. $P < 0,06$ para efeito de tratamento. $P = 0,28$ para o contraste 75S vs 75U e $P = 0,11$ para o contraste 75U vs 40U

O possível efeito benéfico do etanol encontrado na fração volátil no potencial redox não foi demonstrado. Em condições de campo, onde aditivos são aplicados no momento da ensilagem da cana-de-açúcar e a produção de etanol é atenuada, esta conjectura é ainda menos realística. Como esperado, o maior suprimento de energia resultante da maior proporção de concentrados e do maior consumo de matéria seca resultou em mudanças físico-químicas mais intensas no fluido ruminal, possivelmente pela maior atividade microbiana. Ao contrário dos livros clássicos, a temperatura ruminal variou em média 1,5 a 1,75 unidade ao longo do dia com ponto de máximo entre 10 a 14 horas após a alimentação, coincidente com a máxima fermentação, indicada pelo acúmulo intraruminal de AGV (Figura 31). A correlação entre pH e temperatura ruminal tem sido explorada como ferramenta potencial para detecção de acidose subclínica (AlZahal et al., 2008).

Em trabalhos previamente publicados, a P_{H_2} foi negativamente correlacionada à produção de metano (Marden, 2008; Marden et al., 2009). Se esta relação for válida para o presente estudo, pode-se afirmar que o tratamento 40U aumentou a emissão diária de metano (mol/d), o que parece coerente com os maiores fluxos diários de acetato e butirato (Owens e Goetsch, 1988), apresentados mais adiante.

Com exceção da correlação entre pH e P_{H_2} , todos os parâmetros físico-químicos se correlacionaram mutuamente (Tabela 30). O E_h pareceu ser a característica mais representativa do balanço físico-químico do ambiente ruminal. Todavia, a dificuldade para coleta de amostras

de fluido ruminal em anerobiose tem limitado a publicação massiva de manuscritos onde esta variável foi aferida.

Tabela 30 - Coeficientes de correlação de Pearson e probabilidades entre parâmetros físico-químicos do fluido ruminal

	E_h	P_{H_2}	Temperatura
pH	-0,63 ($P < 0,01$)	0,05 ($P = 0,44$)	-0,51 ($P < 0,01$)
E_h		-0,58 ($P < 0,01$)	0,47 ($P < 0,01$)
P_{H_2}			-0,20 ($P < 0,01$)

A concentração ruminal de amônia não foi alterada pelos produtos de fermentação da silagem de cana perdidos na secagem (75S vs 75U). Apesar da maior fermentabilidade da ração 40U, a maior proporção de uréia (Tabela 26) e o maior consumo de matéria seca resultaram em níveis mais elevados de amônia no rúmen (Figura 30). A maior síntese de proteína microbiana (PBmic), estimada pela excreção urinária de derivados de purinas, foi confirmada para o tratamento 40U (Tabela 31).

Figura 30 - Concentração ruminal de amônia de novilhos alimentados com rações contendo silagens de cana-de-açúcar. $P < 0,01$ para efeito de tratamento. $P < 0,01$ para efeito de tempo. $P < 0,01$ para interação entre tratamento e tempo

O aumento numérico em 10% na eficiência de síntese de PBmic (g/kg NDT) para o tratamento 75U em relação ao tratamento 75S, indica que o NDT dos produtos de fermentação de silagens poderia ser incluído no NDT da ração, utilizado para estimar a produção ruminal de proteína microbiana por softwares de formulação de ração (ex. NRC, 1996; NRC, 2001), sem inflacionar o erro residual desta variável resposta. Na meta-análise apresentada por Rinne et al. (2009) a aplicação de descontos para correção do suprimento de energia para o crescimento de microrganismos ruminais não melhorou a predição da excreção de proteína no leite. Ainda assim, caso os produtos de fermentação não contribuam efetivamente para a síntese de PBmic, este efeito poderia ser parcialmente compensado pela economia de utilização de aminoácidos para gliconeogênese, devido o maior aporte esplênico de compostos energéticos. As menores concentrações de glicose plasmática em vacas leiteiras alimentadas com silagens de capim restritamente fermentadas (alto teor de açúcares, precursores de acetato no rúmen) em relação àquelas recebendo silagens devidamente fermentadas (alto teor de ácido láctico) (Miettinen e Huhtanen, 1997), suportam a hipótese que o suprimento de glicose pode ser mais limitante que o suprimento de aminoácidos sintetizados no rúmen de animais alimentados com silagens pouco fermentadas.

Tabela 31 - Excreção urinária de derivados de purinas

Variável	Tratamento				P	
	75S	75U	40U	EP	75S vs 75U	75U vs 40U
Alanina/Creatinina	0,79	0,80	1,02	0,16	0,91	0,10
Ác. úrico/Creatinina	0,14	0,36	0,17	0,14	0,27	0,31
Alanina+Ác. úrico/Creatinina	0,77	0,86	1,20	0,16	0,44	0,04
Produção de urina ¹ , L/d	18,60	33,05	15,00	7,81	0,24	0,11
Síntese de PB microbiana ² , g/d	331,27	382,14	602,13	94,61	0,48	0,03
PB microbiana/Consumo NDT, g/kg	70,46	87,36	79,02	16,26	0,35	0,59
PB microbiana/MS ₁₀₅ deg. rúmen, g/kg	127,14	175,73	108,15	28,16	0,13	0,05

¹ Estimada pela concentração de creatinina na urina e pelo peso vivo;

² Estimada pela excreção diária de derivados de purina.

A fração volátil da silagem de cana diminuiu as concentrações de propionato e butirato e aumentou as concentrações de isovalerato e valerato, resultando em maior razão

acetato/propionato no fluido ruminal. Apesar das mudanças no perfil, a concentração total de AGV não foi alterada (Tabela 32 e Figuras 31 e 32). Uma possível explicação para as menores concentrações de propionato e butirato, sem alteração na concentração de acetato, seria a maior taxa fracional de remoção de todos os AGV com concomitante aumento na produção de acetato, originado principalmente da conversão de etanol no rúmen. A taxa fracional de remoção de valerato não diferiu entre os tratamentos 75S e 75U no ensaio com a digesta ruminal intacta (Tabela 33). Todavia, a absorção de valerato no tratamento 75U foi 50% superior ao tratamento 75S quando esta medida foi realizada com o ruminorretículo evacuado e lavado (Tabela 34). Além disso, houve tendência de aumento na superfície absorptiva do rúmen com o maior aporte de compostos voláteis da silagem de cana (Tabela 35). De fato, a expansão da superfície absorptiva deve ter ocorrido pela maior necessidade de absorção AGV (Sutton et al., 1963; Dirksen et al., 1985; Melo, 2007). Os efeitos estimulatórios diretos (Sakata e Tamate, 1978; Sander et al., 1959) e indiretos (Sakata et al., 1980; Shen et al., 2004) dos AGV na morfologia ruminal são conhecidos de longa data. Não foram encontrados trabalhos sobre o efeito do etanol na morfologia ruminal e na absorção de AGV.

Tabela 32 - Concentração ruminal de ácidos graxos voláteis

Parâmetro	Tratamento				<i>P</i>		
	75S	75U	40U	EP	Trat	Tempo	Trat*Tempo
Acetato ¹ , mM	52,39	53,94	63,25	2,98	<0,01	<0,01	0,01
Propionato ^{1,2} , mM	17,04	14,57	16,58	0,85	<0,01	<0,01	0,50
Isobutirato, mM	0,63	0,65	0,55	0,06	0,15	<0,01	0,75
Butirato ^{1,2} , mM	8,75	7,46	9,82	0,71	<0,01	<0,01	0,02
Isovalerato ² , mM	1,30	2,14	2,16	0,42	<0,01	0,84	0,56
Valerato ² , mM	1,18	1,63	1,66	0,09	<0,01	<0,01	0,59
AGV ¹ , mM	81,40	80,38	94,03	4,40	<0,01	<0,01	0,09
Acetato/Propionato ²	3,10	3,74	3,84	0,16	<0,01	0,33	<0,01

¹ $P < 0,05$ para o contraste 75U vs 40U; ² $P < 0,05$ para o contraste 75S vs 75U.

Figura 31 - Concentração ruminal de ácidos graxos voláteis. $P < 0,01$ para efeito de tratamento. $P < 0,01$ para efeito de tempo. $P = 0,09$ para interação entre tratamento e tempo

Figura 32 - Razão acetato/propionato no fluido ruminal de novilhos alimentados com rações contendo silagens de cana-de-açúcar. $P < 0,01$ para efeito de tratamento. $P = 0,33$ para efeito de tempo. $P < 0,01$ para interação entre tratamento e tempo

O maior consumo de MS, possibilitado pelo menor teor de forragem da dieta 40U, elevou as concentrações ruminiais dos principais AGV (acetato, propionato e butirato), resultando em maior concentração de AGV total (Tabela 32 e Figura 31). Para este tratamento, o pico ruminal

de AGV ocorreu aproximadamente 10 horas após a alimentação, o que aparenta ser o curso normal da fermentação ruminal em bovinos consumindo rações completas, fornecidas uma ou duas vezes ao dia (Pereira e Armentano, 2000; Salvador et al., 2008; Goulart, 2010). Apesar do maior consumo de carboidratos não fibrosos (predominantemente amido) no tratamento 40U, a razão acetato/propionato não foi alterada. Ao contrário do padrão circadiano frequentemente encontrado em bovinos (Pereira e Armentano, 2000; Salvador et al., 2008) e encontrado para o tratamento 75S, as rações contendo a fração volátil (75U e 40U) elevaram a razão acetato/propionato ao longo do tempo, com ponto de máximo entre 10 e 12 horas após a alimentação. A abundância de compostos com dois carbonos na fração volátil da silagem de cana, especialmente etanol e acetato, pode ter sido causativa desta alteração.

Não foi possível detectar diferenças nas taxas fracionais de absorção e remoção de valerato com o maior consumo de concentrados (Tabelas 33 e 34). Penner et al. (2009) também não observou diferenças na absorção de valerato em vacas não lactantes alimentadas com dietas de composição bem distinta (64% vs 8% de concentrados). Uma das justificativas descrita pelos autores se referiu à sensibilidade do método adotado para mensurar a taxa fracional de absorção de AGV, supostamente insuficiente para detectar diferenças causadas pelas dietas. Mesmo não havendo indícios que os principais AGV são absorvidos em velocidades diferentes em pH ruminal próximo à neutralidade (Úden, 2010), no trabalho de Resende Júnior et al. (2006b) as correlações entre as taxas fracionais de remoção de valerato (usado como marcador) e os principais AGV foram proporcionais à similaridade química dos ácidos. Logo, o ácido acético, que representa aproximadamente metade do fluxo ruminal de AGV, apresentou a menor correlação com o marcador (Resende Júnior et al., 2006b).

As taxas de remoção de etanol no rúmen (absorção, passagem e metabolismo microbiano) tenderam a aumentar nos tratamentos onde a fração volátil da silagem esteve presente (Tabela 33), e corrobora o fato da adaptação dos sistemas enzimáticos envolvidos no metabolismo do etanol (Jean-Blain et al., 1992). Por outro lado, quando a absorção de etanol foi avaliada com o ruminorretículo evacuado e lavado pôde-se observar a maior adaptação do epitélio ruminal para o tratamento 75U relativamente à ração 40U. A análise conjunta destes resultados permitiu especular que o teor de concentrado das rações alterou as respostas adaptativas ao consumo de etanol via fração volátil da silagem de cana. No tratamento 40U, o maior consumo de concentrados deve ter aumentado a proporção de etanol oxidada à acetato pelos microrganismos,

antes de atingir o epitélio ruminal (Pradham e Hemken, 1970) e, provavelmente, menor proporção de etanol foi absorvida. Por outro lado, no tratamento 75U, com baixa inclusão de concentrados, mais álcool mais etanol deve ter atingido a parede do rúmen e desencadeado mecanismos de adaptação que resultaram na maior taxa de absorção (Tabela 34). A recuperação portal de etanol já foi mensurada em vacas leiteiras com digesta intacta (Raun e Kristensen, 2011), mas não foi possível isolar as contribuições metabólicas dos microrganismos e do epitélio ruminal. A replicação do ensaio, realizado pela equipe dinamarquesa, utilizando animais com rúmen evacuado e lavado é o caminho a ser seguido para quantificar o metabolismo de etanol pela parede ruminal.

Tabela 33 - Taxas fracionais de remoção (kc), absorção (ka), degradação (kd) e passagem (kp) de ácidos graxos voláteis e etanol no ruminorretículo¹

Parâmetro	Tratamento				P	
	75S	75U	40U	EP	75S vs 75U	75U vs 40U
kp, %/h	15,30	13,52	16,29	1,97	0,45	0,23
<i><u>Valerato</u></i>						
ka, %/h	37,05	44,55	53,83	6,34	0,39	0,27
kc, %/h	52,45	58,08	70,12	7,28	0,51	0,16
<i>Índice relativo</i> ‡, %	-	110,73	120,73			
<i><u>Etanol</u></i>						
ka + kd, %/h	39,84	93,38	81,65	24,69	0,10	0,65
kc, %/h	57,13	106,50	99,25	24,23	0,12	0,78
<i>Índice relativo</i> ‡, %	-	186,42	93,19			

¹Ácido valérico, etanol e CrEDTA foram usados como marcadores;

‡ Índice relativo = 75U/75S ou 40U/75U.

Tabela 34 - Taxas fracionais de absorção (ka) de valerato e etanol pelo ruminorretículo evacuado¹

Parâmetro	Tratamento				P	
	75S	75U	40U	EP	75S vs 75U	75U vs 40U
ka valerato, %/h	36,68	55,16	56,38	6,83	< 0,01	0,78
<i>Índice relativo</i> ‡, %	-	150,38	102,21			
ka etanol, %/h	115,21	208,75	157,70	28,94	0,02	0,13
<i>Índice relativo</i> ‡, %	-	181,19	75,54			

¹CrEDTA foi utilizado para corrigir a taxa fracional de diluição;

‡ Índice relativo = 75U/75S ou 40U/75U.

Como discutido anteriormente, tanto a fração volátil da silagem de cana quanto o aumento no teor de concentrado tenderam a aumentar a superfície do rúmen (Tabela 35). A área média das papilas e o número de papilas/cm² não foram alterados pelos tratamentos e têm sido questionados como variáveis resposta à alteração do plano nutricional (Resende Júnior et al., 2006a). O índice mitótico do epitélio ruminal, determinado 14 dias após a alteração da dietas, foi similar entre os tratamentos, pois diferenças nesta variável só têm sido observadas a curto prazo (Goodlad, 1981; Resende Júnior et al., 2006a).

Tabela 35 - Morfologia ruminal de novilhos da raça Nelore alimentados com rações contendo silagens de cana-de-açúcar

Variável	Tratamento				P	
	75S	75U	40U	EP	75S vs 75U	75U vs 40U
Área média das papilas, cm ²	0,20	0,23	0,23	0,02	0,30	0,91
Número de papilas/cm ²	57,44	57,68	64,08	10,12	0,99	0,62
Superfície do rúmen ¹ , m ²	5,86	6,50	7,19	0,29	0,12	0,09
<i>Índice relativo</i> ‡, %	-	110,92	110,62			
Índice mitótico, %	0,85	0,86	0,96	0,08	0,96	0,39

¹ Superfície (cm²) = 29718,00 + 2604,65*(Área mucosa/cm² biópsia) (Daniel et al., 2006);

‡ Índice relativo = 75U/75S ou 40U/75U.

A ausência de efeitos significativos da fração volátil da silagem de cana na concentração total de AGV, no volumes de fluido ruminal e na taxa fracional de remoção de valerato culminou em fluxos de AGV e absorção diária de energia metabolizável via AGV similares para as rações

75S e 75U. A maior proporção de concentrados concomitante com o maior consumo de MS, entretanto, aumentou o fluxo diário de AGV em 47% e a absorção diária de energia metabolizável via AGV ruminais em 49% (Tabela 36).

Considerando os principais AGV, as contribuições energéticas variaram entre 50% a 55% para acetato, 25% a 29% para propionato e 19% a 22% para butirato. Na revisão de Bergman (1990) cerca de 50% da energia dos AGV ruminais proveio de acetato e o restante foi compartilhado entre propionato (25%) e butirato (25%). No experimento de Resende Júnior et al. (2006b) a contribuição calórica como energia metabolizável foi 50-52% para acetato, 27-29% para propionato e 21% para butirato. Mesmo com dietas bem distintas, o perfil da energia metabolizável proveniente dos AGV ruminais foi pouco alterada. Adicionalmente, a absorção estimada de acetato, propionato e butirato variou entre 5,4 e 6,1 mol/kg de MS consumida. Estes valores são próximos à média encontrada na literatura, ao redor de 5 mol/kg MS (Bergman, 1990; Owens e Goetsch, 1988; Resende Júnior et al., 2006b).

Tabela 36 - Estimativa do fluxo ruminal de ácidos graxos voláteis

Parâmetro	Tratamento				P	
	75S	75U	40U	EP	75S vs 75U	75U vs 40U
Acetato ¹ , mol/d	24,52	25,35	37,10	3,81	0,85	0,02
Propionato ¹ , mol/d	8,00	6,86	9,70	1,14	0,33	0,03
Butirato ¹ , mol/d	4,23	3,46	5,80	0,75	0,24	<0,01
AGV ¹ , mol/d	36,84	35,67	52,60	5,65	0,85	0,02
AGV/CMS, mol/kg	5,62	6,13	5,43	1,05	0,61	0,46
<i>Energia metabolizável</i>						
Acetato ² , Mcal/d	5,12	5,30	7,76	0,80	0,85	0,02
Propionato ² , Mcal/d	2,94	2,52	3,56	0,42	0,33	0,03
Butirato ² , Mcal/d	2,22	1,81	3,04	0,40	0,24	<0,01
AGV, Mcal/d	10,31	9,63	14,35	1,59	0,68	0,02
Índice relativo‡, %	-	93,40	149,00			

¹ Fluxo (mol/d) = Concentração ruminal (mol/L) * Volume ruminal (L) * kc (/h) * 24 h;

² Assumiu-se os seguintes calores de combustão: 209 kcal/mol de acetato, 367 kcal/mol de propionato e 524 kcal/mol de butirato;

‡ Índice relativo = 75U/75S ou 40U/75U.

4.4 Conclusões

A fração volátil não alterou o consumo de alimentos e o processo de digestão nos animais, mas representou importante contribuição no valor energético de silagem de cana-de-açúcar, equivalente a 10% do valor do valor determinado por digestibilidade.

Referências

- ALZAHAL, O.; KEBREAB, E.; FRANCE, J.; FROETSCHER, M.; MCBRIDE, B.W. Ruminant temperature may aid in the detection of subacute ruminal acidosis. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 91, p. 202–207, 2008.
- ANDRADE, M.A.F; PEREIRA, M.N. Performance of Holstein heifers on fresh sugarcane as the only dietary forage. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 82 (Suppl. 1), p. 91, 1999.
- ARMENTANO, L E. Separação dos alimentos da dieta completa por vacas em lactação. In: CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 9., 2005. Uberlândia/MG. **Anais ...** Uberlândia/MG, 2005. p. 281-295.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 13th ed. Washington: AOAC International, 1980. 1015p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington, 1990. v. 1, 1117p.
- ATKINS, P.W. **Physical Chemistry**. 5th ed. Oxford,: Oxford University Press: 1994, 1031p.
- BERGMAN, E.N. Energy contribution of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 70, p. 567-590, 1990.
- BINNERTS, W.T.; Van't KLOOSTER, A.T.; FRENS, A.M. Soluble chromium indicator measured by atomic absorption in digestion experiments. **Veterinary Research**, London, v. 82, p. 470, 1968.
- CHALUPA, W. ;EVANS, J.L.; STILLIONS, M.C. Influence of ethanol on rumen fermentation and nitrogen metabolism. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 23, p. 802-807, 1964.
- CHANEY, A.L., MARBACK, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 8, p. 130-137, 1962.

CHEN, X.B.; GOMES, M.J. **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of technical details** (Occasional publication). INTERNATIONAL FEED RESOURCES UNIT. Bucksburn, Aberdeen: Rowett Research Institute. 1992. 21p.

CHIZZOTTI, M.L.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D.; CHIZZOTTI, F.H.M.; TEDESCHI, L.O. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. **Livestock Science**, Amsterdam, v.113, p. 218-225, 2008.

CHMELOVÁ, Š. Aldehydes in maize and grass silages. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE CONSERVATION, 14., 2010. Brno, Czech Republic. **Proceedings...** Brno, Czech Republic, 2010. p. 189-191.

COLOVOS, N.F.; KEENER, H.A.; DAVIS, H.A. Errors in drying silage and feces for protein and energy determinations. Improved procedures. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 40, p. 173-179, 1957.

CZAUDERNA, M.; KIWALCZYK, J. Quantification of allantoin, uric acid, xanthine and hypoxanthine in ovine by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Science and Applications**, Washington, v. 74, p. 129-138, 2000.

DANIEL, J.L.P.; RESENDE JÚNIOR, J.C.; CRUZ, F.J. Participação do ruminorretículo e omaso na superfície absorptiva total do proventrículo de bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, p.688-694, 2006.

DANIEL, J. L. P. **Avaliação morfofisiológica da absorção e metabolização de ácidos graxos voláteis pelo proventrículo de bovinos**. 2007. 147 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

DANIEL, J. L. P.; NUSSIO, L. G.; AMARAL, R.C.; SÁ NETO, A.; GARCIA, E.H.C.; BISPO, A.W.; OLIVEIRA, F.C.L.; SILVA, I.F. Energy efficiency and performance of lactating dairy cows fed ethanol and acetic acid. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 94, E- Supplement 1, 2011.

DEWAR, W.A.; McDONALD, P. Determination of dry matter in silage by distillation with toluene. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 12, p. 790-795, 1961.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. **Cana-de-açúcar**. 2008, 882p.

DIRKSEN, G.U.; LIEBICH, H.G.; MAYER, E. Adaptive changes of the ruminal mucosa and their functional and clinical significance. **The Bovine Practitioner**, Montreal, v. 20, p. 116-120, 1985.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; SPOELSTRA, S. F. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits

yeast growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 87, p. 583-594, 1999.

GALLO, P.C.S.; PEREIRA, M.N.; ANDRADE, M.A.F. Effect of dietary sugarcane concentration on heifer growth. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 83(Suppl. 1), p. 114, 2000.

GOODLAD, R. A some effects of diet on the mitotic index and the cell cycle of the ruminal epithelium of sheep. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, Cambridge, v. 66, p. 487-499, 1981.

GOULART, R.S. **Avaliação da fibra fisicamente efetiva em rações para bovinos de corte**. 2010. 200p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagem) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

JEAN-BLAIN, C.; DURIX, A.; TRANCHANT, B. Kinetics of ethanol metabolism in sheep. **Reproduction, Nutrition, Development**, Paris, v. 32, p. 83-90, 1992.

KRIZSAN, S. J.; RANDBY, A. T.; WESTAD, F. The effect of acetic acid, caproic acid and tryptamine on voluntary intake of grass silage by growing cattle. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM FORAGE CONSERVATION, 12., 2006 Brno, Czech Republic, **Proceedings...** Brno, Czech Republic, 2006, p. 143-145.

KRIZSAN, S.J.; AHVENJÄRVI, S.; HUHTANEN, P. A meta-analysis of passage rate estimated by rumen evacuation with cattle and evaluation of passage rate prediction models. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 93, p. 5890–5901, 2010.

KUNG JÚNIOR, L.; GRIEVE, D.B.; THOMAS, J.W.; HUBER, J.T. Added ammonia or microbial inocula for fermentation and nitrogenous compounds of alfalfa ensiled at various percents of dry matter. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, p. 299-306, 1984.

LAMMERS, B.P.; BUCKMASTER, D.R.; HEINRICHS, A.J. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 79, p. 922-928, 1996.

LEONARDI, C.; ARMENTANO, L.E. Effect of quantity, quality, and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 86, p. 557-564, 2003.

LEONARDI, C.; GIANNICO, F.; ARMENTANO, L.E. Effect of water addition on selective consumption (sorting) of dry diets by dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 88, p. 1043–1049, 2005.

LITTELL, R.C.; HENRY, P.R.; AMMERMAN, C.B. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 76, p. 1216-31, 1998.

MAEKAWA, M.; BEAUCHEMIN, K.A.; CHRISTENSEN, D.A. Effect of concentrate level and feeding management on chewing activities, saliva production, and ruminal pH of lactating dairy cow. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 85, p. 1165–1175, 2002.

MARDEN, J.P.; BAYOURTHE, C.; ENJALBERT, F.; MONCOULON, R. A new device for measuring kinetics of ruminal pH and redox potential in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 88, p. 277–281, 2005.

MARDEN, J.P.; UNGERFELD, E.; KOHN, R.A.; JULIEN, C.; AUCLAIR, E.; MONCOULON, R.; BAYOURTHE, C. From redox potential field measurement to its bioenergetic meaning in the rumen. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 92 (E-Suppl. 1), p. 518, 2009.

MARDEN, J.P. Redox Potential: From its routine measurement to its energetic meaning. **ADSA-ASAS Meeting**, Indianapolis, USA, 2008. Disponível em: <http://www.dascor.com/downloadfiles/Marden.pdf> Acesso em: 04 jul.2011.

MARI, L.J. **Desempenho de bovinos de corte alimentados com rações contendo cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) fresca ou ensilada e o padrão de fermentação e a estabilidade aeróbia das silagens aditivadas**. 2008. 315 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MAULFAIR, D. D.; ZANTON, G. I.; FUSTINI, M.; HEINRICHS, A. J. Effect of feed sorting on chewing behavior, production, and rumen fermentation in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 93, p. 4791–4803, 2010.

McDONALD, P.; HENDERSON, N.; HERON, S. **The biochemistry of silage**. 2nd ed. Chalcombe Publications, 1991. 340 p.

MELO, L.Q. **Morfometria ruminal e efeito do pH e do volume da digesta sobre a absorção de ácidos graxos voláteis**. 2007. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

MIETTINEN, H. O.; HUHTANEN, P. Effects of silage fermentation and post-ruminal casein supplementation in lactating dairy cows. 2. Energy metabolites and amino acids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 74, p. 459–468, 1997.

MITLOEHNER, F.M.; MALKINA, I.L.; KUMAR, A.; GREEN, P.G. Volatile organic compounds emitted from dairy silages and other feeds. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE PROCEEDINGS, 15., 2009. Madison. **Proceedings...** Madison, 2009. p. 15-26.

MORGAN, M.E.; PEREIRA, R.L. Volatile constituents of grass and corn silage. I. Steam distillates. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 45, p. 457-466, 1962.

NISHINO, N. Aerobic stability and instability of silages caused by bacteria. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2., 2011. São Pedro.. **Proceedings...** São Pedro. 2011.1 CD-ROM.

NOCEK, J.F. Evaluation of specific variables affecting in situ estimates of ruminal dry matter and protein digestion. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.60, p.1347-1358, 1985.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients Requirements of Beef Cattle**. 7th ed. Washington, DC: National Academy Press, 1996. 242 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients Requirements of Dairy Cattle**. 7th rev. ed. Washington, DC: National Academy Press, 2001. 381 p.

O'KIELY, P. Chemical additives and the aerobic stability of silages. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2009. São Pedro **Proceedings...** São Pedro, 2009. p. 155-174.

OWENS, F.N.; GOETSCH, A.L. Ruminal fermentation. In: CHURCH, D.C. (Ed.). **The ruminant Animal** - Digestive physiology and nutrition. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1988. 121p.

PALMQUIST, D.L.; CONRAD, H.R. Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high grain or high fat diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, p. 1025-1030, 1971.

PEDROSO, A.F. **Aditivos químicos e microbianos no controle de perdas e na qualidade de silagem de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2003. 120 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

PENNER, G.B.; TANIGUCHI, M.; GUAN, L.L.; BEAUCHEMIN, K.A.; OBA, M. Effect of dietary forage to concentrate ratio on volatile fatty acid absorption and the expression of genes related to volatile fatty acid absorption and metabolism in ruminal tissue. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 92, p 2767–2781, 2009.

PEREIRA, M.N.; ARMENTANO, L.E. Partial replacement of forage with nonforage fiber sources in lactating cow diets. II. Digestion and rumen function. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 83, p. 2876–2887, 2000.

PRADHAM, K.; HEMKEN, R.W. Utilization of ethanol and its effect on fatty acid patterns in ruminants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 53, p. 1739-1746, 1970.

PRYCE, J. D. A modification of Barker-Summerson method for determination of lactic acid. **Analyst**, v. 94, p. 1151-1152, 1969.

QUEIROZ, O. C. M. **Associação de aditivos microbianos na ensilagem e o desempenho de vacas em lactação recebendo silagem de cana-de-açúcar comparada a volumosos tradicionais**. 2006, 99 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

RAUN, B. M. L.; KRISTENSEN, N. B. Metabolic effects of feeding ethanol or propanol to postpartum transition Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 94, p. 2566–2580, 2011.

RESENDE JÚNIOR, J.C.; ALONSO, L.S.; PEREIRA, M.N.; ROCA, M.G.M.; DUBOC, M.V.; OLIVEIRA, E.C.; MELO, L.Q. Effect of the feeding pattern on rumen wall morphology of cows and sheep. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, p. 526-536, 2006a.

RESENDE JÚNIOR, J. C.; PEREIRA, M. N.; BÔER, H.; TAMMINGA, S. Comparison of techniques to determine the clearance of ruminal volatile fatty acids. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 89, p. 3096-3106, 2006b.

RUSSELL, J.B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca:editora, 2002. 119p.

SAKATA, T.; TAMATE, H. Rumen epithelium cell proliferation accelerated by rapid increase in intra-ruminal butyrate. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 61, p. 1109-1113, 1978.

SAKATA, T.; HIKOSAKA, K.; SHIOMURA, Y.; TAMATE, H. Stimulatory effect of insulin on ruminal epithelium cell mitosis in adult sheep. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 44, p.325-331, 1980.

SALVADOR, S.C.; PEREIRA, M.N.; SANTOS, J.F.; MELO, L.Q.; CHAVES, M.L. Resposta de vacas leiteiras à substituição total de milho por polpa cítrica e à suplementação com microminerais orgânicos I: Consumo e digestão. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, p. 682-690, 2008.

SANDER, E.G.; WARNER, R.G.; HARRISON, H.N.; LOOSLI, J.K. The stimulatory effect of sodium butyrate and sodium propionate on development of rumen mucosae in the young calf. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 42, p. 1600-1605, 1959.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide**. Version 8.2. 5th ed. Cary: Statistical Analysis System Institute, 2001. 846p.

SCHMIDT, P.; NUSSIO, L.G.; SANTOS, M.C.; RIBEIRO, J.L.; ZOPOLLATTO, M.; PAZIANI, S.F.; MARI, L.J.; LOURES, D. R.S.; JUNQUEIRA, M.C. Comportamento ingestivo de bovinos alimentados com silagens de cana-de-açúcar inoculadas com doses de "*Lactobacillus buchneri*" NCIMB 40788. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004. Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, 2004. NR438.

SCHMIDT, P. **Perdas fermentativas na ensilagem, parâmetros digestivos e desempenho de bovinos de corte alimentados com rações contendo silagens de cana-de-açúcar**. 2006. 228 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

SHEN, Z.; SEYFERT, H.M.; LÖHRKE, B.; SCHNEIDER, F.; ZITNAN, R.; CHUDY, A.; KUHLA, S.; HAMMON, H.M.; BLUM, J.W.L MARTENS, H.; HAGEMEISTER, H.; VOIGT, J. An energy-rich diet causes rumen papillae proliferation associated with more IGF type 1 receptors and increased plasma IGF-1 concentrations in young goats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 134, p. 11-17, 2004.

SPOELSTRA, S.F.; COURTIN, M.G.; van BEERS, J.A.C. Acetic acid bacteria can initiate aerobic deterioration of whole crop maize silage. **Journal of Agriculture Science**, London, v. 111, p. 127-132, 1988.

SUTTON, J.D.; MCGILLIARD, A.D.; JACOBSON, N.L. Functional development of rumen mucosa: I. Absorptive ability. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 46, p. 426-436, 1963.

ÚDEN, P. Using a novel macro in vitro technique to estimate differences in absorption rates of volatile fatty acids in the rumen. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, p. 1-7, 2010.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

VERBIC, J.; CHEN, X.B.; MACLEOD, N.A.; ORSKOV, E.R. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effects of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 114, p. 243-248, 1990.

VOELKER, J. A.; ALLEN, M. S. Pelleted beet pulp substituted for high-moisture corn: 2. Effects on digestion and ruminal digestion kinetics in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 86, p. 3553-3561, 2003.

WEIß, K.; KALZENDORF, C.; ZITTLAU, J.; AUERBACH, H. Novel results on the occurrence of volatile compounds in maize silages. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE PROCEEDINGS, 15., 2009. Madison, , **Proceedings...** Madison, 2009. p. 33-34.

WEISSBACH, F. Correction of dry matter content of silages used as substrate for biogas production. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE PROCEEDINGS, 15., 2009 **Madison. Proceedings...** , Madison, 2009. p. 483-484.

WILES, P.G.; GRAY, I. K.; KISSLING, R.C. Routine analysis of protein by Kjeldahl and Dumas methods: review and interlaboratory study using dairy products. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 81, n. 3, p. 620-632, 1998.

ZINN, R.A.; BARRERAS, A.; CORONA, L.; OWENS, F. N.; WARE, R. A. Starch digestion by feedlot cattle: Predictions from analysis of feed and fecal starch and nitrogen. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 85, p. 1727-1730, 2007.

5 EFEITOS DO ETANOL NA DEGRADAÇÃO RUMINAL E NA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE GÁS IN VITRO

Resumo

Na literatura não existe consenso sobre os efeitos diretos e indiretos do etanol na fermentação ruminal. O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito indireto da suplementação de etanol na cinética de degradação in vitro da cana-de-açúcar. Amostras de cana-de-açúcar in natura (1 g), desidratadas em estufa (55°C) e moídas a 1 mm, foram incubadas a 39°C durante 30 horas em frascos contendo 40 mL de fluido ruminal tamponado, suplementado com 0, 50, 100, 150 ou 200 mg de etanol. A pressão interna dos frascos foi transmitida via radio e registrada automaticamente a cada 30 minutos por um servidor conectado ao computador. O pH e o potencial redox (E_h) do fluido foram mensurados ao final da incubação em câmara anaeróbia. A pressão parcial de H_2 (PH_2) foi estimada pela equação de Nernst. O pH do fluido ao final da incubação diminuiu linearmente com a inclusão de etanol. O E_h e a PH_2 foram alterados em sentidos opostos e de forma quadrática com a inclusão de etanol. A adição de 10% de etanol resultou no menor E_h (95,5 mV) e a maior PH_2 (32,94). Entretanto, isto não foi suficiente para alterar a produção total de gás (pool) e a taxa fracional de fermentação. O tempo de colonização (fase lag), entretanto, tendeu diminuir com a dose intermediária de etanol. Isto não evitou que a degradação da matéria seca diminuísse linearmente com a adição de etanol. O efeito tóxico e a queda de pH observada com as inclusões crescentes de etanol estiveram associadas com a diminuição na degradação da matéria seca.

Palavras-chave: Redox; Pressão parcial de hidrogênio; Álcool etílico

Abstract

There is no agreement over the direct and side effects of ethanol on rumen fermentation. The purpose of this study was to evaluate the effects of ethanol supplementation on the in vitro kinetics of sugarcane degradation. Zero, 50, 100, 150 or 200 mg of the ethanol was diluted in 1 mL of water and applied to four replicates of 1 g of sugarcane (dried and grounded) suspended in 40 mL of buffered-rumen fluid within 250 mL culture bottles. Subsequently the bottles were incubated at 39°C for 30h. The internal pressure of the bottles was sent by radio frequency signals and recorded automatically every 30 minutes by a server connected to the computer. The rumen fluid pH and redox potential (E_h) were measured at the end of incubation in anaerobic glove under nitrogen atmosphere. The partial pressure of H_2 (P_{H_2}) was estimated by the Nernst's equation. Fluid pH decreased linearly with ethanol supplementation. The E_h and P_{H_2} were changed quadratically and in opposite directions. Ten percent of ethanol led to the lower E_h (95.25) and higher P_{H_2} (32.49). However, those variations were not large enough to alter the gas pool size and fractional rate of fermentation. The lag phase, however, tended to decrease with intermediary dose of ethanol. Nevertheless, the DM degradation decreased linearly with the ethanol addition. The antimicrobial effect of ethanol and drop in rumen fluid pH might be reasonable explanation to the lower DM degradation.

Keywords: Redox; Partial pressure of hydrogen; Ethyl alcohol

5.1 Introdução

O etanol é o produto de fermentação predominante em silagens de cana-de-açúcar (Zopollatto et al., 2010). Na fase aeróbica pós-abertura, o etanol pode volatilizar (Mitloehner et al., 2009) ou ser oxidado por microrganismos aeróbios (Spoelstra et al., 1988). A fração consumida pelos animais, entretanto, pode ter importância nutricional significativa, devido ao alto conteúdo energético por unidade de massa deste álcool (Clymer, 2004).

No ruminorretículo, o etanol pode ser absorvido ou metabolizado pelos microrganismos ruminais (Jean-Blain et al., 1992; Moomaw e Hungate, 1963). O principal produto do metabolismo ruminal do etanol é o ácido acético (Durix et al., 1991; Yoshii et al., 2005). Os equivalentes redutores gerados por esta oxidação poderiam diminuir o potencial redox do fluido ruminal e/ou serem utilizados como fonte de energia e favorecer o crescimento microbiano (Chalupa et al., 1964; Gould, 2000). De outro lado, a possível transferência dos elétrons para microrganismos *Archaea* poderia aumentar a produção de metano (Yoshii et al., 2005) e anular os efeitos potencialmente benéficos. Além disso, o efeito tóxico do etanol também foi observado em microrganismos ruminais (Caldwell e Murray, 1986; Otsuki et al., 1991). Frente a estas divergências, o objetivo deste experimento foi avaliar o efeito da suplementação de etanol na cinética de degradação *in vitro* da cana-de-açúcar.

5.2 Material e métodos

Uma amostra de cana-de-açúcar *in natura* madura (48,5% FDN) foi picada, desidratada em estufa (55°C) e moída em moinho tipo Wiley com peneira de 1 mm. Zero, 50, 100, 150 ou 200 mg de etanol foram diluídos em 1 mL de água destilada e aplicados em quatro frascos de vidro (250 mL) contendo 1 g de substrato e 40 mL de fluido ruminal tamponado (27 mL de saliva artificial + 13 mL de fluido ruminal, obtido imediatamente antes do ensaio, de uma vaca seca canulada alimentada com feno de gramínea e 2 kg de concentrados). Quatro frascos foram incubados apenas com o fluido ruminal tamponado e utilizados para correções (brancos). Em seguida, os frascos foram vedados com tampas adaptadas com sensores de pressão e incubados a 39°C por 30 horas. A pressão interna dos frascos foi transmitida via radio e registrada

automaticamente a cada 30 minutos por um servidor conectado ao computador (Adesogan et al., 2005).

Após a incubação, os frascos foram inseridos em uma câmara anaeróbia antes de serem abertos para determinação do pH e do potencial redox. Posteriormente, o conteúdo dos frascos foi filtrado em papel Whatman N° 541 e desidratado em estufa a 55°C, para determinação da degradação da matéria seca. Como o potencial redox foi medido com eletrodo de platina (E_0), os valores foram corrigidos pela equação: $E_h = E_0 + 199 \text{ mV}$ (Marden et al., 2005). A pressão parcial de hidrogênio (P_{H_2}) foi estimada com base na equação de Nernst (Marden et al., 2009): $-\log P_{H_2} = E_h/30 + 2 \cdot \text{pH}$.

Os valores corrigidos de pressão interna dos frascos foram modelados pelo Proc NLIN do SAS para obtenção do perfil de acúmulo de gás: $y = a + b(1 - e^{-c(t-L)})$ (McDonald, 1981), onde “y” é o volume de gás ou a pressão acumulada no tempo “t”, “a” é a fração imediatamente fermentável, “b” é a fração lentamente fermentável, “a+b” representa a fração potencialmente fermentável ou o pool de gás, “c” é a taxa fracional de fermentação e “L” é o tempo de colonização (fase lag). Todas as variáveis foram analisadas pelo Proc MIXED do SAS e as médias comparadas por contrastes ortogonais (linear e quadrático).

5.3 Resultados e discussão

O etanol não alterou a produção total de gás (pool) e a taxa fracional de fermentação (Tabela 37). O tempo de colonização (fase lag), entretanto, tendeu diminuir com a dose intermediária de etanol. Isto não evitou que a degradação da matéria seca diminuísse linearmente com a adição de etanol (Figura 33). No experimento de Caldwell e Murray (1986), a inibição da atividade microbiana também foi observada com aumento da concentração de etanol nos meios de cultura. Curiosamente, pequenas doses de etanol também estimularam o crescimento microbiano de algumas espécies (ex. *Bacteroides rumenicola*). No presente experimento, a queda de pH observada com as inclusões crescentes de etanol (Tabela 38) pode ter sido determinante da diminuição na degradação da matéria seca.

Tabela 37 - Efeito do etanol na cinética de fermentação in vitro da cana-de-açúcar

Parâmetros	Etanol (% MS)					EP	<i>P</i>	
	0	5	10	15	20		Linear	Quadrático
Fase lag (h)	0,99	1,09	0,84	0,93	1,01	0,03	0,31	0,04
Pool de gás (kPa)	47,38	47,47	50,18	50,43	48,79	1,71	0,32	0,38
Taxa de fermentação (kPa/h)	0,14	0,13	0,15	0,13	0,14	0,01	0,96	0,79

Figura 33 - Efeito do etanol na degradação in vitro da cana-de-açúcar. $P = 0,04$ para efeito linear de dose

O potencial redox (E_h) se comportou de forma quadrática e foi reduzido para a dose intermediária de etanol (Tabela 38). O menor valor de E_h foi associado ao menor tempo de colonização. Os valores elevados de E_h encontrados neste estudo podem ser justificados pela diluição do fluido ruminal com saliva artificial, que embora contivesse agente redutor (cisteína), apresentava poder redutor inferior ao do inóculo. Além disso, o pH final da incubação apresentou-se abaixo do esperado. Considerando que o E_h é negativamente correlacionado ao pH do meio, valores de E_h superiores aos encontrados no rúmen de animais alimentados com dietas ricas em forragens seriam esperados.

A pressão parcial de hidrogênio também foi alterada de forma quadrática (Tabela 38), mas em direção oposta ao E_h . No ambiente ruminal, a P_{H_2} é definida pelas taxas de oxidação e utilização de elétrons, embora o consumo de elétrons pela rota metanogênica tenha sido apontado como regulador majoritário da P_{H_2} (Marden, 2008; Marden et al., 2009). Por esta lógica, as doses

intermediárias de etanol, no presente trabalho, seriam capazes de diminuir a emissão de metano, o que vai contra vários experimentos (Yoshii et al., 2005; Araújo, 2010), onde o etanol induziu maior produção de metano. Então, a atividade microbiana, capaz de oxidar substratos e gerar elétrons, aparentou ser o fator determinante da P_{H_2} mais realístico neste estudo. A queda acentuada da P_{H_2} na dose mais alta de etanol (20% da MS) pôde refletir menor atividade microbiana, induzida pela toxidez do álcool no meio (Caldwell e Murray, 1986). A quantificação simultânea da síntese de proteína microbiana e da emissão de metano em meios perturbados pela adição de etanol é necessária para o entendimento desta questão.

Tabela 38 - Efeito do etanol no pH, no potencial redox (E_h) e na pressão parcial de hidrogênio (P_{H_2}) do fluido ruminal ao final da incubação

Parâmetros	Etanol (% MS)					EP	P	
	0	5	10	15	20		Linear	Quadrático
pH	5,73	5,67	5,67	5,63	5,66	0,03	0,07	0,27
E_h	100,67	98,00	95,25	101,50	112,75	3,52	0,03	0,01
P_{H_2}	18,25	28,97	32,49	28,11	8,49	7,72	0,43	0,03

5.4 Conclusões

As alterações físico-químicas causadas pelo etanol não afetaram a cinética de produção de gás. O etanol determinou redução na degradação de matéria seca ruminal.

Referências

ADESOGAN, A.T.; KRUEGER, N.K.; KIM, S.C. A novel, wireless, automated system for measuring fermentation gas production kinetics of feeds and its application to feed characterization. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.123–124, p. 211–223, 2005.

ARAÚJO, R.C. **Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação ruminal *in vitro***. 2010. 178 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

CALDWELL, D.R.; MURRAY, K. Some effects of ethyl alcohol on the growth of rumen bacteria. **Current Microbiology**, New York, v. 14, p. 193-197, 1986.

CHALUPA, W. ;EVANS, J.L.; STILLIONS, M.C. Influence of ethanol on rumen fermentation and nitrogen metabolism. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 23, p. 802-807, 1964.

CLYMER, J. **Heat of combustion & respiratory quotient calculation**. 2004 Disponível em: <<http://home.fuse.net/clymer/rq/>> Acesso em: 24 set.2008.

DURIX, A.; JEAN-BLAIN, C.; SALLMANN, H.P.; JOUANY, J.P. Use of a semicontinuous culture system (RUSITEC) to study the metabolism of ethanol in the rumen and its effects on ruminal digestion. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa. 71, p. 115-123, 1991.

GOULD, J. **Supplemental ethanol for ruminants consuming forage-based diets**. 2000. 83 p. Thesis (Magister Science) - University of Wyoming, Wyoming, 2000.

JEAN-BLAIN, C.; DURIX, A.; TRANCHANT, B. Kinetics of ethanol metabolism in sheep. **Reproduction, Nutrition, Development**, Paris, v. 32, p. 83-90, 1992.

MARDEN, J.P.; BAYOURTHE, C.; ENJALBERT, F.; MONCOULON, R. A new device for measuring kinetics of ruminal pH and redox potential in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 88, p. 277–281, 2005.

MARDEN, J.P.; UNGERFELD, E.; KOHN, R.A.; JULIEN, C.;AUCLAIR, E.; MONCOULON, R.;BAYOURTHE, C. From redox potential field measurement to its bioenergetic meaning in the rumen. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 92 (E-Suppl. 1), p. 518, 2009.

MARDEN, J.P. Redox Potential: From its routine measurement to its energetic meaning. **ADSA-ASAS Meeting**, Indianapolis, USA, 2008. Disponível em: <http://www.dascor.com/downloadfiles/Marden.pdf> Acesso em: 04 jul.2011.

McDONALD, I. A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. **Journal of Agricultural Science**, London, v. 96, 251–252, 1981.

MITLOEHNER, F.M.; MALKINA, I.L.; KUMAR, A.; GREEN, P.G. Volatile organic compounds emitted from dairy silages and other feeds. In: **INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE PROCEEDINGS**, 15., 2009. Madison. **Proceedings...** Madison., 2009. p. 15-26.

MOOMAW, C.; HUNGATE, R.E. Ethanol conversion in the bovine rumen. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 85, p. 721-722, 1963.

OTSUKI, K., KOBAYASHI, T.; MATSUMOTO, M.; ITABASHI, H. Effects of ethanol on rumen fermentation pattern in steers fed a diet high in concentrate. **Bulletin of National Institute of Animal Industry**, Tokyo, v. 51, p. 9-15 1991.

SPOELSTRA, S.F.; COURTIN, M.G.; van BEERS, J.A.C. Acetic acid bacteria can initiate aerobic deterioration of whole crop maize silage. **Journal of Agriculture Science**, London, v. 111, p. 127-132, 1988.

YOSHII, T.; ASANUMA, N.; HINO, T. Effect of ethanol on nitrate and nitrite reduction and methanogenesis in the ruminal microbiota. **Animal Science Journal**, London, v. 76, p. 37-42, 2005.

ZOPOLLATTO, M.; DANIEL, J.L.P.; NUSSIO, L G. Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, p.170-189, 2009 (supl. especial).

6 DESEMPENHO DE VACAS LEITEIRAS SUPLEMENTADAS COM ETANOL OU ÁCIDO ACÉTICO

Resumo

O etanol e o ácido acético são compostos orgânicos voláteis comumente encontrados em silagens. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do etanol e do ácido acético no desempenho de vacas leiteiras. Trinta vacas da raça Holandês foram agrupadas em dez blocos e receberam uma de três dietas, durante sete semanas: controle (33% feno de Tifton-85 + 67% concentrados), etanol (dieta controle + 5% etanol) e ácido acético (dieta controle + 5% ácido acético). O etanol e o ácido acético foram diluídos em água (1:2) e aspergidos na ração total durante a mistura mecânica dos dois tratos diários. O teor de matéria seca da ração controle foi ajustado por adição de água. Na 1ª semana de comparação, os animais receberam metade da dose dos compostos químicos. As vacas suplementadas com etanol produziram mais leite (37,9 kg/d) que àquelas alimentadas com as rações controle (35,8 kg/d) e ácido acético (35,3 kg/d) ($P = 0,04$), em razão do maior consumo de matéria seca (23,7; 22,2 e 21,6 kg/d, respectivamente). Entretanto, houve interação entre tratamento e semana para o consumo de material seca ($P = 0,02$), visto que na 2ª e 3ª semana de comparação (início da dose 5%) o ácido acético deprimiu a ingestão de ração, comparativamente ao controle. Isto resultou em maior eficiência energética para o tratamento ácido acético neste período. Após a 4ª semana de comparação, a razão ELI no leite/Consumo de MS (Mcal/kg) foi similar entre os tratamentos. Os parâmetros sanguíneos mensurados (glicose, insulina, ácidos graxos não esterificados, etanol e enzima GGT) não apontaram efeitos deletérios dos compostos químicos na saúde dos animais. A qualidade sensorial do leite não foi alterada pelos tratamentos. O desempenho animal apontou valor energético similar para ração contendo etanol comparativamente as outras dietas. A conversão de etanol à acetato pelos microrganismos ruminais deve ser explicação plausível para os resultados encontrados.

Palavras-chave: Compostos orgânicos voláteis; Consumo; Energia; Qualidade de leite

Abstract

Ethanol and acetic acid are common end-products from silages. The objective of this study was to determine whether ethanol and acetic acid affect performance of dairy cows. Thirty lactating Holstein cows were grouped in ten blocks and fed either: Control (33% Bermuda hay + 67% concentrates); Ethanol (control diet + 5% ethanol); or Acetic acid (control diet + 5% acetic acid, DM basis) diets, during seven weeks. Ethanol and acetic acid were diluted in water (1:2) and sprayed onto total mixed ration twice daily before feeding. The same amount of solution was replaced with water in the control diet. During the 1st week the cows received half-dose of these chemical compounds. Cows fed ethanol yielded more milk (37.9 kg/d) than those fed control (35.8 kg/d) or the acetic acid (35.3 kg/d) diets ($P=0.04$), due to the higher DMI (23.7, 22.2, 21.6 kg/d, respectively). The significant diet*week interaction for DMI ($P=0.02$), mainly during the 2nd and 3rd weeks (when the 5% acetic acid achieved the full dose) was related to the decrease in DMI of the acetic acid diet. Energy efficiency showed diet*week interaction ($P=0.06$) and again, during 2nd and 3rd weeks the acetic acid diet increased NEI milk/DMI ratio. Otherwise, energy efficiency was similar across diets. Blood parameters were not altered by feeding ethanol or acetic acid, up to studied level. Those chemical compounds did not impair sensory milk quality which is in agreement to the blood parameters. Animal performance suggested similar energetic value from ethanol containing diet as compared to the other diets. Rumen conversion of ethanol to acetate might be reasonable explanations to the deviation on the predicted energetic value.

Keywords: Volatile organic compounds; Intake; Energy; Milk quality

6.1 Introdução

O etanol e o ácido acético são compostos orgânicos voláteis comumente encontrados em silagens (Weiß et al., 2009). Em silagens de cana-de-açúcar, o etanol é o principal produto de fermentação (Zopollatto et al., 2009) e concentrações de até 22% da MS têm sido descritas na literatura (Freitas et al., 2006). Durante o processamento de amostras, a secagem em estufa de ventilação forçada leva a perda quase total destes compostos (Weissbach, 2009). Então, os resultados de análises bromatológicas tradicionais são provenientes de amostras praticamente livres de etanol e ácido acético. Por outro lado, quando silagens são utilizadas como ingredientes de rações, estes compostos são consumidos por animais e, portanto, deveriam ser considerados na composição do alimento e na formulação de rações.

Até o momento, pouco se sabe sobre o impacto de compostos voláteis de silagens no desempenho de animais. Desvios entre desempenho observado no campo e aquele predito por modelos matemáticos sugerem a contribuição energética dos produtos de fermentação volatilizados durante a secagem de amostras em estufa. Adicionalmente, existem indícios que a qualidade do leite pode ser afetada negativamente pela ingestão de produtos de fermentação de silagens (Randby et al., 1999; Randby, 2007). Diante deste cenário, o objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos do etanol e do ácido acético no desempenho e na qualidade do leite de vacas de alta produção.

6.2 Material e métodos

Trinta vacas holandesas (638 ± 60 kg PV), 12 primíparas e 18 multíparas, com produção média de 40 kg/d leite (245 ± 120 DEL), foram estabuladas em Tie-Stall e receberam ração de padronização durante 12 dias (dieta controle, Tabela 40). Com base na ordem de parto e na produção diária de leite, registrada nos últimos três dias do período de padronização, as vacas foram agrupadas em dez blocos. Dentro de cada bloco, os animais foram alocados à uma de três dietas: controle (33% feno de Tifton-85 + 67% concentrados), etanol (dieta controle + 5% etanol) e ácido acético (dieta controle + 5% ácido acético) (Tabelas 39 e 40).

O etanol e o ácido acético foram diluídos em água (1:2) e aspergidos na ração total durante a mistura mecânica, com auxílio de bomba costal movida a bateria, imediatamente antes

dos dois tratos diários (8:00 h e 18:00 h). O teor de matéria seca da ração controle foi ajustado por adição de água. Os tratamentos foram comparados durante sete semanas, entretanto, na 1ª semana os animais receberam metade da dose dos compostos químicos. Todos os animais receberam uma injeção de rbST (500 mg) a cada 12 dias.

Tabela 39 - Composição dos ingredientes das rações experimentais

Nutrientes (% MS)	Feno	Milho	Polpa cítrica	F. soja
MS ¹ , % MN	88,61	88,01	87,14	89,13
PB	14,96	9,70	7,52	52,30
PBIDN ²	6,63	0,70	0,40	0,70
PBIDA ²	1,35	0,30	0,30	0,40
FDN	72,23	12,61	31,82	21,04
FDA ³	35,01	4,81	27,48	9,81
Lignina	4,01	0,31	0,90	0,65
Extrato etéreo	1,79	3,35	2,70	2,92
Cinzas	7,25	1,43	6,70	6,69
CNF ⁴	10,41	73,62	51,65	17,75
DVIVMS ⁵	55,68	-	-	-
NDT _{1x} ⁶	57,43	87,94	77,63	80,14

¹ Matéria seca obtida por desidratação em estufa a 105°C;

² Valores de PBIDN e PBIDA dos concentrados foram extraídos do NRC (2001);

³ FDA obtido por método não sequencial;

⁴ Carboidratos não fibrosos = 100 – (PB + (FDN-PBIDN) + EE + Cinzas);

⁵ Digestibilidade verdadeira in vitro da MS estimada por NIRS;

⁶ Nutrientes Digestíveis Totais em nível de manutenção estimado pelo NRC (2001).

As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia, às 6:00 h e às 17:00 h. A produção de leite foi registrada diariamente e amostras compostas de leite foram coletadas nos dias 6 e 7 de cada semana experimental para determinação dos teores de gordura, proteína, lactose, caseína e nitrogênio uréico e contagem de células somáticas (CLÍNICA DO LEITE/USP - Piracicaba/SP). O teor de energia do leite foi calculado como (NRC, 2001):

$$\text{ELI leite (Mcal/d)} = 0,0929 * \% \text{gordura} + 0,0547 * \% \text{proteína} + 0,0395 * \% \text{lactose} \quad (1)$$

Tabela 40 - Composição das rações experimentais

Ingredientes (% MS)	Controle	Etanol	Ácido acético
Feno	33,0	32,9	32,9
Milho moído fino	29,2	29,2	29,2
Polpa cítrica	19,1	19,2	19,2
Farelo de soja	16,4	16,3	16,4
Núcleo vit-mineral ¹	2,3	2,4	2,3
<i>Dose do aditivo aplicada²</i>			
Etanol, g/kg MS	-	50,0	-
Ácido acético, g/kg MS	-	-	50,0
<i>Concentração dos aditivos no fornecimento</i>			
Etanol, g/kg MS	-	32,0	-
Ácido acético, g/kg MS	-	-	42,6
<i>Concentração ponderada dos aditivos no cocho</i>			
Etanol, g/kg MS	-	29,3	-
Ácido acético, g/kg MS	-	-	38,6
Nutrientes fornecidos (% MS)			
MS, % MN	76,84	79,30	80,12
Matéria orgânica	92,51	92,66	92,82
PB	17,78	17,17	17,05
PDR ³	11,40	10,90	11,10
FDN	37,05	35,84	35,49
Extrato etéreo	2,56	2,48	2,46
CNF ⁴	35,12	37,16	37,82
NDT _{1x} ⁵	72,60	73,30	73,60
<i>Estratificação de partículas</i>			
> 38 mm, %	14,6	15,4	14,8
19 – 38 mm, %	7,3	7,7	7,1
8 – 19 mm, %	17,0	17,3	16,8
< 8 mm, %	61,1	59,6	61,3
Tamanho médio de partículas, mm	19,2	19,9	19,3

¹ Minerais e vitaminas: 10,0% Ca; 4,2% P; 4,5% Mg; 2,0% K; 1,8% S; 12,3% Na; 2800 mg/kg de Zn; 1400 mg/kg de Mn; 1050 mg/kg de Fe; 500 mg/kg de Cu; 28 mg/kg de I; 20 mg/kg de Cr; 18 mg/kg de Se; 14 mg/kg de Co; 200000 UI/kg de vit A; 40000 UI/kg de vit D3; 1200 UI/kg de vit E; 80 mg/kg de biotina;

² Aditivo diluído em água (1:2) e aspergido na ração total;

³ Proteína degradável no rúmen estimada pelo NRC (2001);

⁴ Carboidratos não fibrosos, incluindo etanol e ácido acético;

⁵ NDT em nível de manutenção (NRC, 2001). Etanol e ácido acético foram considerados com NDT = 100%.

O consumo de ração foi determinado diariamente pela diferença entre a quantidade ofertada e as sobras. Em decorrência da perda dos aditivos durante a exposição das rações no cocho, pôde-se calcular e comparar duas variáveis associadas ao consumo de matéria seca: 1) consumo de MS₁₀₅, utilizando-se os teores de matéria seca do oferecido e das sobras, obtidos por desidratação em estufa a 105°C; 2) consumo de MS, obtido pela soma dos consumos de MS₁₀₅ e de etanol ou de ácido acético, corrigido para as perdas deste compostos no cocho. Para isto, a taxa de ingestão (min/kg MS) foi utilizada para converter o tempo de ingestão em consumo (kg de MS) para cada hora do dia, assumindo-se que a taxa de ingestão para cada animal seria constante ao longo do dia. Com a taxa fracional de desaparecimento, as concentrações de etanol e ácido acético nas rações foram previstas para cada uma das 24 horas, e o consumo de cada composto foi calculado.

Ao final das semanas 1, 2 e 6 os vasos coccígeos medianos foram puncionados e o sangue coletado, imediatamente antes e 6 h após o fornecimento matinal de ração, em tubos à vácuo contendo heparina sódica. O plasma foi separado por centrifugação e submetido à laboratório comercial (PRIMORLABOR, Piracicaba/SP) para análise de glicose (glicose oxidase), ácidos graxos não esterificados (espectrofotometria enzimática), insulina (quimioluminescência), etanol (cromatografia gasosa) e atividade da gama-glutamil transferase (método enzimático).

No 7º dia das semanas 1 e 2, o comportamento ingestivo foi monitorado durante as primeiras quatro horas após a alimentação matinal. Na 6ª semana, a atividade bucal foi registrada a cada 10 minutos, por 24 horas. Foram registrados os tempos de ingestão, ruminação e mastigação. O tempo de mastigação por unidade de MS ou FDN foi calculado usando o consumo mensurado no mesmo dia da avaliação. Amostras de rações totais e sobras foram coletadas para determinação do tamanho de partículas, com auxílio do “Penn State Particle Size Separator”, adaptado com uma peneira adicional com orifícios de 38 mm de diâmetro (Mari e Nussio, 2007). O índice de seleção de partículas foi calculado como o consumo observado de cada fração retida em cada peneira expresso como porcentagem do consumo predito (% da matéria natural). Valores indicaram recusa (<100%), ingestão preferencial (>100%) ou ausência seleção (=100%) (Leonardi e Armentano, 2003).

Na mesma ocasião, as temperaturas e as taxas fracionais de desaparecimento de etanol e ácido acético foram determinadas nas rações completas, fornecidas de manhã e a tarde. Aproximadamente 2,5 kg das rações completas foram alocados em baldes de plástico, que foram

posicionados próximo aos cochos dos animais. As temperaturas foram mensuradas a cada 30 minutos com o auxílio de *data loggers*, inseridos no centro geométrico da massa. Dois *data loggers* foram programados para registrar a temperatura do ambiente. Amostras foram coletadas 0, 1, 2, 4, 8, 12, 18 e 24 horas de exposição. As taxas fracionais de desaparecimento foram determinadas pela queda exponencial das concentrações de etanol e ácido acético, expressas como % MS₁₀₅.

A digestibilidade aparente das rações (n = 15 vacas) foi determinada por coleta total das fezes por 8 horas ininterruptas nos dias 34, 35 e 36 do período de comparação. Em cada dia, a coleta de fezes foi iniciada com 8 horas de atraso em relação ao dia anterior, com vistas à obtenção de amostras representativas das 24 horas, sem causar alterações no ritmo circadiano e, conseqüentemente, no desempenho dos animais. O escore de condição corporal (escala 1 a 5, Wildman et al., 1982) e o peso vivo das vacas foram avaliados após a ordenha da tarde, no primeiro e no último dia do período de comparação.

Amostras de ingredientes, rações e sobras foram coletadas semanalmente e compostas ao final do experimento para cada vaca e destinadas ao laboratório para análises bromatológicas, juntamente com as fezes. Das amostras de rações, uma porção foi utilizada para preparo de extrato aquoso (Kung Jr. et al., 1984) e o remanescente desidratado em estufa a 60°C, assim como as demais amostras. No extrato aquoso foram determinadas o pH e as concentrações de ácido acético (Palmquist e Conrad, 1971) e etanol (Procedimento Sigma N° 332 - UV).

As amostras secas foram processadas em moído tipo Wiley provido de peneira com poro de 1 mm. Sub-amostras foram utilizadas para determinação do teor de matéria seca a 105°C (AOAC, 1980), proteína bruta (Wiles et al., 1998), extrato etéreo (AOAC, 1990), cinzas (AOAC, 1980), FDN, FDA, nitrogênio ligado a FDN (N-FDN), nitrogênio ligado a FDA (N-FDA) e lignina (Van Soest et al., 1991). A digestibilidade verdadeira in vitro da matéria seca (DVIVMS) do feno foi estimada por espectroscopia de reflectância de infravermelho proximal (NIRSystems 5000 - FOSS®).

De posse das digestibilidades aparentes dos nutrientes (CNF, FDN, PB e EE) foi possível calcular o NDT e estimar as concentrações de energia das rações (NRC, 2001):

$$\begin{aligned} \text{Energia digestível (Mcal/kg)} = & (\% \text{CNF digestível}/100) * 4,2 + (\% \text{FDN digestível}/100) * 4,2 \\ & + (\% \text{PB digestível}/100) * 5,6 + (\% \text{EE digestível}/100) * 9,4 - 0,3 \end{aligned} \quad (2)$$

$$\text{Energia metabolizável (Mcal/kg)} = 1,01 * \text{ED (Mcal/kg)} - 0,45 \quad (3)$$

$$\text{Energia líquida de lactação (Mcal/kg)} = 0,703 * \text{EM (Mcal/kg)} - 0,19 \quad (4)$$

A partir do teor de ELI das rações, foi possível estimar o valor energético dos aditivos (etanol e ácido acético):

$$\text{ELI do aditivo (Mcal/kg)} = \{ \text{ELI da ração aditivada} - [\text{ELI da ração controle} * (1 - \% \text{ aditivo na ração}/100)] \} / (\% \text{ aditivo na ração}/100) \quad (5)$$

Ainda na 6ª semana, amostras de leite in natura foram coletadas para realização de análise sensorial, imediatamente após a ordenha da manhã. Os atributos julgados foram aparência, aroma, sabor e impressão global por um painel de 56 provadores não treinados. Os escores foram avaliados em escala de 1 a 9 (1 = baixa qualidade, 9 = alta qualidade).

As variáveis foram analisadas como medidas repetidas pelo procedimento MIXED do SAS (2001), usando o seguinte modelo: $y_{ijkl} = \mu + CV + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \gamma_k + \beta\gamma_{jk} + \varepsilon_{ijk}$; onde μ : média geral, CV: covariável (medida da mesma variável no final do período de padronização), α_i : efeito de bloco ($i = 1$ a 10), β_j : efeito de tratamento ($j =$ controle, etanol ou ác. acético), $\alpha\beta_{ij}$: termo de erro para testar o efeito de tratamento, γ_k : efeito de semana ($k = 1$ a 7), $\beta\gamma_{jk}$: efeito da interação entre tratamento e semana, ε_{ijk} : resíduo. Foram testadas as seguintes estruturas de covariância: componentes de variância, simetria composta, auto-regressiva de primeira ordem e não estruturada (Littell et al., 1998). Adotou-se a estrutura com menor valor para o Critério de Informação de Akaike (AIC). As variáveis mensuradas apenas uma vez foram comparadas incluindo efeitos de bloco e tratamento. Os modelos para comparar a temperatura e o pH das rações e as taxas fracionais de desaparecimento dos aditivos incluíram efeitos de tratamento e tempo (horário e/ou tempo após alimentação). Os dados provenientes da análise sensorial não apresentaram distribuição normal e foram transformados pelo método Box-Cox. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer.

6.3 Resultados e discussão

A temperatura interna do Tie-stall durante o período experimental encontra-se na Figura 34. Apesar do sistema de arrefecimento (ventiladores e nebulizadores de alta pressão), as altas temperaturas indicam o desafio térmico enfrentado pelos animais por época do experimento, conduzido em meses de verão.

Figura 34 - Temperatura interna do estábulo durante o período experimental, 17/11/2010 a 05/01/2011

Parte do etanol e do ácido acético suplementados foi perdida no processo de aplicação destes componentes químicos. O enriquecimento das rações, entretanto, se deu de forma satisfatória e as doses efetivamente suplementadas foram 3,20% de etanol e 4,26% de ácido acético (Tabela 40), contrastando com o valor planejado de 5%. A maior perda de etanol durante a mistura da ração pode ser explicada pela maior pressão de vapor deste composto, comparativamente ao ácido acético (Atkins, 1994).

Adicionalmente, outra parte dos compostos foi perdida durante a exposição das rações no cocho. Mais uma vez, a perda de etanol foi superior àquela de ácido acético (Figura 35). Além da volatilização (Mitloehner et al., 2009), parte dos compostos pode ter sido oxidada por microrganismos aeróbios (Spoelstra et al., 1988). A diminuição do pH das rações enriquecidas com etanol (Figura 36) pode indicar que este composto foi parcialmente oxidado à ácido acético

(Spoelstra, 1988). Por outro lado, o aumento do pH das rações aditivadas com ácido acético sugere que este composto volatilizou ou foi oxidado totalmente à CO_2 e água.

Figura 35 - Taxas fracionais de desaparecimento de etanol e ácido acético adicionados nas rações totais. $P = 0,14$ para efeito de aditivo; $P = 0,02$ para efeito de horário; $P = 0,22$ para interação entre aditivo e horário. ^{a, b} Letras indicam que as médias diferem (Tukey-Kramer; $\alpha = 0,10$)

As taxas fracionais de desaparecimento dos compostos químicos foram associadas ao horário de alimentação. A ração oferecida no período matinal apresentou maior taxa de perda de etanol e tendeu a apresentar maior taxa de perda de ácido acético do que aquela oferecida no final da tarde, possivelmente pelas diferenças de temperatura ambiente (Figura 37).

Considerando as taxas fracionais de desaparecimento e o comportamento ingestivo dos animais (Figura 40), estimou-se que 92% do etanol e 90% do ácido acético contido nas rações foram efetivamente consumidos. Mesmo sendo menos volátil, a proporção efetivamente consumida de ácido acético foi menor. Tal ocorrência foi determinada pelo menor tempo de ingestão subsequente ao arraçoamento matinal apresentada por este tratamento (Figuras 39 e 40).

Figura 36 - pH das rações totais suplementadas com etanol (A) ou ácido acético (B). $P < 0,01$ para interação entre aditivo e horário de alimentação; $P < 0,01$ para interação entre aditivo e tempo após alimentação

Figura 37 - Temperatura ambiente e das rações totais contendo etanol (EtOH) ou ácido acético (C2). $P < 0,01$ para interação entre aditivo, horário de alimentação e tempo após alimentação

O método adotado para calcular o consumo de matéria seca afetou os resultados (Figura 38) e suas interpretações. Quando os aditivos não foram considerados, o consumo de MS₁₀₅ não foi alterado pelo etanol, mas foi deprimido pelo ácido acético. Entretanto, quando a ingestão dos aditivos foi somada ao consumo de MS₁₀₅, o etanol elevou o consumo de MS e o efeito inibitório do ácido acético desapareceu após a 4ª semana de comparação. Independentemente do método de cálculo, o ácido acético deprimiu o consumo de matéria seca durante as duas primeiras semanas subsequentes à imposição da dose completa dos aditivos (2ª e 3ª semanas de comparação). No trabalho de Krizsan et al. (2006), a suplementação de novilhos com ácido acético, isolado ou em mistura, reduziu a ingestão de silagem. Entretanto, quando a massa dos suplementos foi levada em conta, o consumo de MS foi o mesmo para todos os tratamentos. Pode-se inferir que a redução de consumo de matéria seca atribuída aos produtos de fermentação de silagens, sem alterações concorrentes no ganho de peso diário (Wilkinson et al., 1976), deveu-se a confundimento gerado pelo método de determinação do teor de matéria seca.

Figura 38 - Consumo de MS e de MS105 ao longo do período experimental. MS: $P = 0,07$ para efeito de tratamento; $P < 0,01$ para efeito de semana; $P = 0,02$ para interação entre tratamento e semana. MS105: $P = 0,02$ para efeito de tratamento; $P < 0,01$ para efeito de semana; $P = 0,02$ para interação entre tratamento e semana

O tempo de ingestão durante as primeiras 4 h após a alimentação matinal foi menor para o tratamento ácido acético em todas as avaliações (Figura 39). Curiosamente, quando a atividade mastigatória foi avaliada durante 24 h, na 6ª semana de comparação, o efeito inibitório do ácido acético permaneceu sobre a ingestão subsequente a alimentação matinal, mas não foi observado após a segunda alimentação diária, no final da tarde (Figura 40). Isto corrobora o fato da maior taxa de desaparecimento e, provavelmente, de maior volatilização de ácido acético da ração matinal. Assim, o efeito deletério do ácido acético no consumo de matéria seca esteve associado à taxa de volatilização deste composto e consequente rejeição olfativa dos animais (Forbes, 2007). A queda de consumo por ativação de mecanismos metabólicos parece pouco plausível, visto a alta produção diária de acetato no trato digestório. Assumindo produção de acetato no rúmen de aproximadamente 3,5 mol/kg MS consumida (Resende Júnior et al., 2006, Sutton et al., 2003), o ácido acético suplementar poderia representar no máximo 18% daquele absorvido no proventrículo. Se considerarmos a produção adicional de acetato no ceco-cólon (Siciliano-Jones e Murphy, 1989), esta proporção seria ainda menor.

Figura 39 - Tempo de ingestão durante as primeiras 4 h após a alimentação da manhã de vacas leiteiras suplementadas com etanol ou ácido acético. $P = 0,02$ para efeito de tratamento; $P < 0,01$ para efeito de semana; $P = 0,65$ para interação entre tratamento e semana

Figura 40 - Tempo de ingestão em cada hora do dia de vacas leiteiras suplementadas com etanol ou ácido acético. $P = 0,77$ para efeito de tratamento; $P < 0,01$ para efeito de hora; $P < 0,01$ para interação entre tratamento e hora

Os tempos de ingestão, ruminação e mastigação (min/d), assim como as taxas de mastigação por kg de MS ou kg de FDN, não foram afetados pelos aditivos (Tabela 41). O ácido

acético, entretanto, foi capaz de alterar o padrão de ingestão ao longo do dia (Figuras 40 e 41). Da mesma forma, Hutchinson e Wilkins (1971) observaram alteração do padrão de ingestão em ovinos adultos alimentados com silagem de azevém tratada com doses crescentes de ácido acético (2%, 5% e 8,8% da MS). Naquele trabalho, o tempo de ingestão também foi diminuído nas primeiras 4 horas após a alimentação e o inverso ocorreu no período entre 16 e 20 horas após o oferecimento da ração. A especulação alusiva ao possível efeito negativo do etanol no consumo de matéria seca (Schmidt et al., 2004) não foi demonstrada no presente trabalho. De fato, quando a massa de etanol foi contabilizada, o consumo de matéria seca foi superior àquele da ração controle (Figura 38). No experimento de Randby et al. (1999), o consumo de matéria também foi aumentado pela suplementação de etanol.

Tabela 41 - Comportamento ingestivo de vacas leiteiras suplementadas com etanol ou ácido acético

Parâmetro	Controle	Etanol	Ácido acético	EP	<i>P</i>
Ingestão (min)	245	233	231	17,0	0,77
Ruminação (min)	418	435	451	19,0	0,38
Mastigação (min)	663	668	682	25,0	0,81
CMS no dia da avaliação (kg)	21,51	22,42	21,44	0,74	0,46
CFDN no dia da avaliação (kg)	7,37	7,34	8,05	0,27	0,15
Mastigação/CMS (min/kg MS)	31,15	29,80	32,24	1,32	0,43
Mastigação/CFDN (min/kg MS)	91,10	92,39	85,75	3,05	0,64

O padrão diário de consumo de etanol ou ácido acético encontra-se na Figura 41. As maiores taxas de consumo de aditivos foram observadas nas primeiras horas após o fornecimento de ração e atingiram valores máximos ao redor de 150 g/h. Isto se deveu à maior concentração dos compostos nas horas iniciais e ao maior tempo de ingestão subsequente à alimentação.

Figura 41 - Consumo de etanol e ácido acético ao longo do dia. $P < 0,01$ para efeito de tratamento; $P < 0,01$ para efeito de hora; $P < 0,01$ para interação entre tratamento e hora

O consumo preferencial de partículas, indicado pelo índice de seleção, foi modificado pelos aditivos (Figura 42). Os animais dos tratamentos controle e etanol priorizaram o consumo de partículas menores, o que parece normal para bovinos (Leonardi e Armentano, 2003; Leonardi et al., 2005; Maulfair et al., 2010). Ao contrário, as vacas suplementadas com ácido acético selecionaram a favor de partículas maiores, ou seja, o consumo de feno foi priorizado à custa da rejeição parcial de concentrados, apesar do nível adequado de fibra na ração (35% de FDN total e 24% de FDN de forragem). A hipótese ligada à possível diferença na concentração de ácido acético através dos tamanhos de partículas foi desmistificada pela similaridade nas concentrações deste ácido nas frações feno e concentrados, da ração e das sobras (valores não mostrados). Até o momento, não foi encontrada explicação plausível para esta ocorrência.

Assim como o consumo de MS, a produção diária de leite foi aumentada pela suplementação de etanol (Figura 43). Contudo, a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura foi similar entre os tratamentos (Tabela 44), em razão da diminuição numérica no teor de gordura causado pelo tratamento etanol (Tabela 46), ao contrário da expectativa gerada com base nos trabalhos publicados até o momento (Randby et al., 1999; Pradham e Hemken, 1970). Assim

que disponíveis, os resultados da análise do perfil de ácidos graxos do leite, poderão auxiliar no esclarecimento desta questão.

Figura 42 - Índice de seleção de partículas por vacas leiteiras suplementadas com etanol ou ácido acético. $P < 0,01$ para efeito de tratamento; $P < 0,01$ para efeito de peneira; $P < 0,01$ para interação entre tratamento e peneira

Figura 43 - Produção de leite ao longo do período experimental de vacas leiteiras suplementadas com etanol ou ácido acético. $P = 0,04$ para efeito de tratamento; $P < 0,01$ para efeito de semana; $P = 0,13$ para interação entre tratamento e semana

A eficiência energética da ração contendo etanol foi exatamente a mesma da ração controle (Figura 44), rejeitando a hipótese de maior valor energético para o etanol em relação

àquele adotado para os carboidratos. A oxidação parcial do etanol à acetato, no rúmen (microrganismos + epitélio) e no fígado (Raun e Kristensen, 2011), compõe justificativa plausível para o desvio entre o valor energético predito com base no calor de combustão e o apresentado pelas vacas.

Em razão do menor consumo de matéria seca e da manutenção da produção de leite diária, as vacas suplementadas com ácido acético apresentaram maior eficiência energética que aquelas alimentadas com as rações controle ou etanol. Entretanto, após a 4ª semana de comparação, a eficiência energética, indicada pela excreção de energia no leite/kg de MS consumida, foi similar entre os tratamentos (Figura 45), derrubando a idéia de maior conteúdo energético para o ácido acético. Os maiores valores de eficiência calculada com a MS₁₀₅ em relação a matéria seca envolvendo os compostos voláteis (MS), indica que estes compostos químicos têm importância energética significativa.

Figura 44 - Eficiência energética de vacas suplementadas com etanol ou ácido acético. $P < 0,01$ para efeito de tratamento; $P = 0,08$ para efeito de método de determinação de matéria seca; $P = 0,45$ para interação entre tratamento e método. ^{a, b} Letras indicam que as médias diferem (Tukey-Kramer; $\alpha = 0,05$)

Figura 45 - Eficiência energética ao longo do período experimental. $P = 0,27$ para efeito de tratamento; $P < 0,01$ para efeito de semana; $P = 0,08$ para interação entre tratamento e semana

Tabela 42 - Digestibilidade das rações totais suplementadas com etanol ou ácido acético†

	Controle	Etanol	Ác. acético	EPM	<i>P</i>
<i>Consumo, kg/d</i>					
MS	21,90	22,75	21,52	0,99	0,61
MS ₁₀₅	21,90	22,10	20,72	0,96	0,48
MO	20,28	21,12	20,05	0,91	0,61
MO ₁₀₅	20,28	20,48	19,25	0,88	0,50
FDN	7,64	7,50	7,93	0,35	0,68
<i>Digestibilidade, %</i>					
MS	71,38	69,23	70,21	1,86	0,74
MS ₁₀₅	71,38	68,32	69,06	1,91	0,57
MO	74,94	76,27	76,22	1,20	0,60
MO ₁₀₅	74,94	75,52	75,24	1,24	0,92
FDN	65,76	65,95	66,13	2,37	0,99

† Dados de 15 vacas (5 repetições /tratamento).

Os coeficientes de digestibilidade aparente no trato total não foram alterados significativamente pelos tratamentos (Tabela 42). Quando a massa consumida de etanol ou ácido acético foi considerada, entretanto, as digestibilidades da matéria seca e da matéria orgânica apresentaram-se ligeiramente superiores. O conteúdo energético das rações, expresso como NDT ou energia líquida de lactação (ELI), não diferiu entre os tratamentos, mas foi afetado pelo método de cálculo (Tabela 43). Considerando o etanol e o ácido acético com 100% de digestibilidade (NDT3 e ELI3 na Tabela 43), a inclusão destes compostos na equação de NDT elevou os valores em 0,81 e 1,06 unidades percentuais, respectivamente.

Tabela 43 - Valores energéticos das rações totais suplementadas com etanol ou ácido acético§

	Controle	Etanol	Ác. acético	EPM	P
<i>Nutrientes digestíveis totais, %</i>					
NDT 1	72,09	72,13	72,43	1,21	0,97
NDT 2	72,09	72,59	72,99	1,24	0,85
NDT 3	72,09	72,94	73,49	1,18	0,70
NDT 4	72,09	75,58	73,49	1,18	0,19
<i>Energia líquida de lactação‡, Mcal/kg</i>					
ELI 1	1,55	1,55	1,56	0,04	0,97
ELI 2	1,55	1,56	1,58	0,04	0,89
ELI 3	1,55	1,58	1,59	0,04	0,76
ELI 4	1,55	1,64	1,59	0,04	0,35
<i>Energia líquida de lactação dos aditivos†, Mcal/kg</i>					
ELI 2	-	1,89	2,33	-	-
ELI 3	-	2,57	2,59	-	-
ELI 4	-	4,62	2,59	-	-

§ Dados de 15 vacas (5 repetições /tratamento);

1 NDT calculado sem considerar etanol e ácido acético;

2 Etanol e ácido acético foram considerados na fração Carboidratos Não Fibrosos;

3 Etanol e ácido acético foram considerados termos adicionais na fórmula do NDT;

4 Etanol e ácido acético foram considerados termos adicionais na fórmula do NDT. O termo ETANOL foi multiplicado 1,9;

‡ ELI estimada pelo NRC (2001) a partir das digestibilidades;

† Adotou-se o mesmo valor calórico da ração controle para a MS não volátil das rações aditivadas.

De posse das concentrações de ELI das dietas, foi possível isolar a ELI dos aditivos (Tabela 43). Para averiguar e eleger o método de cálculo mais coerente, o uso total de energia líquida pelas vacas foi estimado e comparado ao consumo de ELI determinado pela digestibilidade (Tabela 44). De forma pragmática e com base na Figura 44, a inclusão dos compostos na fração carboidratos não fibrosos (ELI 2) ou a inserção de novo termo “voláteis” para equação do NDT (ELI 3), seriam os mecanismos capazes de contemplar estes compostos de maneira coerente, haja visto a similaridade entre índice relativo para “uso total de ELI” e os “índices relativos 2 e 3” (Tabela 44).

Tabela 44 - Partição energética de vacas leiteiras suplementadas com etanol ou ácido acético

Parâmetro	Controle	Etanol	Ác. acético	EPM	<i>P</i>
Consumo de MS, kg/d	22,16 ^{ab}	22,72 ^a	21,42 ^b	0,58	<0,01
Produção de leite, kg/d	35,50 ^b	37,82 ^a	35,70 ^b	1,38	<0,01
Produção de leite 3,5%G, kg/d	35,79	36,93	36,60	1,14	0,39
Variação de PV, kg/d	0,11	0,08	0,00	0,13	0,82
Variação de ECC, /7 semanas	0,13	0,08	0,03	0,07	0,63
ELI manutenção, Mcal/d	10,21	9,97	10,31	0,21	0,44
ELI variação PV, Mcal/d	0,91	0,57	0,16	0,54	0,63
ELI leite, Mcal/d	24,70	25,52	25,15	0,94	0,75
Uso de ELI produção, Mcal/d	25,60	26,09	25,45	0,96	0,84
ELI produção/ELI total, %	71,20	72,20	70,94	0,83	0,49
Uso total de ELI, Mcal/d	35,82	36,06	35,75	1,02	0,96
<i>Índice relativo</i> ‡, %	-	100,67	99,80	-	-
Consumo ELI 1, Mcal/d	34,60	34,41	32,22	1,06	0,10
<i>Índice relativo 1</i> , %	-	99,45	94,12	-	-
Consumo ELI 2, Mcal/d	34,60	35,66	33,72	1,10	0,29
<i>Índice relativo 2</i> , %	-	103,06	97,46	-	-
Consumo ELI 3, Mcal/d	34,60	35,89	34,04	1,10	0,31
<i>Índice relativo 3</i> , %	-	103,73	98,38	-	-
Consumo ELI 4, Mcal/d	34,60 ^d	37,26 ^c	34,04 ^d	1,11	0,04
<i>Índice relativo 4</i> , %	-	107,69	98,38	-	-

‡ Índice relativo = Etanol/Controle ou Ác. acético/Controle;

^{a, b} Letras indicam que as médias diferem (Tukey-Kramer; $\alpha = 0,05$);

^{c, d} Letras indicam que as médias diferem (Tukey-Kramer; $\alpha = 0,10$).

Com este arranjo, os valores de energia líquida de lactação ficariam entre 1,89 e 2,57 Mcal/kg de etanol e 2,33 a 2,59 Mcal/kg de ácido acético (Tabela 43). A coerência para o ácido acético e o desvio entre valores atual e predito para o etanol⁷, remete a reflexão sobre a recuperação energética pela rota de fermentação alcoólica exercida por leveduras e consagrada na literatura (McDonald et al., 1991). Na prática, a recuperação de matéria seca parece ser melhor do que a recuperação de energia bruta para indicar a recuperação de ELI no processo de conservação de forragens, visto a similaridade nos valores de ELI para os principais produtos de fermentação, incluindo o etanol.

A falta de informações relativas ao consumo de rações com teor elevado de etanol, em médio/longo prazo, e seus efeitos na saúde de vacas leiteiras, caracteriza uma lacuna da literatura. No presente trabalho, o enriquecimento da ração com etanol não alterou os parâmetros sanguíneos estudados (Tabela 45). O teor de ácidos graxos não estificados foi inferior para o tratamento controle na primeira semana de comparação, mas este efeito não foi consistente nas demais coletas. O sangue das vacas suplementadas com ácido acético, coletado imediatamente antes ou 6 h após a alimentação, apresentou menor concentração de glicose que aquele proveniente de vacas alimentadas com as rações controle ou etanol. A baixa glicemia esteve associada ao menor consumo de matéria seca.

Em todas as amostras a concentração plasmática de etanol foi menor do que o limite mínimo de detecção apresentado pelo laboratório comercial (0,1 g/L). No experimento de Raun e Kristensen (2011), também não foi possível detectar etanol no sangue arterial nas coletas realizadas imediatamente antes ou 6 h após a alimentação. Mais uma vez, a conversão de etanol à acetato no rúmen pode ser explicação plausível para ausência de alterações nos parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras consumindo este composto. Até a dose estudada, o etanol não apresentou riscos a saúde dos animais, em médio prazo.

⁷ ELI predita para etanol (Mcal/kg) = Calor de combustão*0,64 (Moe et al., 1964; NRC, 2001) = 7,1*0,64 = 4,54
ELI predita para ác. acético (Mcal/kg) = Calor de combustão*0,64 (Moe et al., 1964; NRC, 2001) = 3,7*0,64 = 2,37

Tabela 45 - Parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras suplementadas com etanol ou ácido acético

Parâmetro	C ¹	E ¹	A ¹	C	E	A	C	E	A	EPM	P	
	1ª semana ²			2ª semana ³			6ª semana ³				Trat	Sem
	<i>Antes da alimentação matutina</i>											
Glicose, mg/dL	57,7 ^b	57,8 ^b	51,5 ^b	40,1 ^c	42,3 ^c	31,6 ^d	69,5 ^a	72,1 ^a	67,4 ^a	2,01	<0,01	<0,01
NE ⁴ , mmol/L	0,23 ^b	0,38 ^a	0,30 ^{ab}	0,37 ^a	0,33 ^{ab}	0,36 ^{ab}	0,24 ^{ab}	0,28 ^{ab}	0,27 ^{ab}	0,03	0,25	<0,01
	<i>6 h após a alimentação matutina</i>											
Glicose, mg/dL	55,9 ^d	58,8 ^d	54,4 ^d	60,0 ^{cd}	60,8 ^{bcd}	54,4 ^d	67,2 ^{ab}	68,6 ^a	66,1 ^{abc}	1,7	0,04	<0,01
ALT ⁵ , U/L	25,3	26,9	26,2	26,8	27,3	27,1	26,4	26,9	26,6	2,1	0,95	<0,01
Amilina, mU/L	0,33	0,28	0,31	0,29	0,33	0,26	0,21	0,22	0,29	0,06	0,96	0,38
Trigol, g/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	-	-	-

C: controle, E: etanol, A: ác. acético;

¹ Impostos fornecidos na dose 2,5%;

² Impostos fornecidos na dose 5,0%;

³ Ácidos graxos não esterificados, mmol/L;

⁴ Ácido gama-glutamil transferase;

^d Letras indicam que as médias diferem na mesma linha (Tukey-Kramer; $\alpha = 0,05$).

Em relação à composição química do leite, não foram observadas alterações acentuadas (Tabela 46). Como discutido anteriormente, a diminuição numérica no teor de gordura causado pelo tratamento etanol (Tabela 46) mostrou-se contrária a expectativa gerada com base literatura (Randby et al., 1999; Pradham e Hemken, 1970), sem justificativa racional. Por causa da maior produção de leite, houveram aumentos das produções diárias de proteína e lactose para o tratamento etanol. O suprimento deste composto puramente energético deve ter interferido no estado energético geral dos animais e alterado a exigência de glicose e a economia de aminoácidos para gliconeogênese (Randby et al., 1999).

Tabela 46 - Composição e produção de sólidos do leite de vacas suplementadas com etanol ou ácido acético

	Controle	Etanol	Ácido acético	EPM	P		
Trat					Sem	T*S	
<i>Composição</i>							
Gordura, %	3,55	3,37	3,69	0,11	0,12	<0,01	0,03
Proteína, %	3,32	3,33	3,29	0,03	0,56	<0,01	0,29
Caseína, %	2,62	2,59	2,60	0,05	0,93	<0,01	0,22
Caseína/Proteína, %	76,97	76,61	76,76	0,20	0,43	<0,01	0,36
Lactose, %	4,67	4,65	4,67	0,03	0,84	<0,01	0,83
Extrato seco desengordurado, %	8,94	8,94	8,92	0,04	0,95	<0,01	0,32
Sólidos totais, %	12,45	12,32	12,64	0,13	0,21	<0,01	0,02
N-urético, mg/dL	13,20	12,45	12,45	0,39	0,30	<0,01	0,20
CCS, mil/mL	104,65	120,26	107,23	-	-	-	-
Log CCS, mil/mL	1,82	1,92	1,85	0,06	0,48	0,02	0,21
<i>Produção</i>							
Gordura, kg	1,25	1,28	1,31	0,05	0,73	<0,01	0,09
Proteína, kg	1,19 ^{ab}	1,26 ^a	1,15 ^b	0,03	0,03	<0,01	0,24
Caseína, kg	0,91	0,94	0,90	0,04	0,66	<0,01	0,45
Lactose, kg	1,65 ^b	1,76 ^a	1,64 ^b	0,04	0,03	<0,01	0,79
Extrato seco desengordurado, kg	3,19 ^{ab}	3,39 ^a	3,15 ^b	0,07	0,04	<0,01	0,66
Sólidos totais, kg	4,42	4,67	4,44	0,12	0,27	<0,01	0,73

^{a, b} Letras indicam que as médias diferem (Tukey; $\alpha = 0,05$)

Na avaliação da qualidade sensorial do leite, todas as dietas resultaram em alíquotas de leite bem aceitas (escore médio > 6,6). Todos os atributos foram similares entre os tratamentos, exceto a impressão global, melhorada discretamente pelos tratamentos etanol e ácido acético (Tabela 47). Ao contrário dos resultados encontrados por Randby et al. (1999), o consumo de etanol não diminuiu a qualidade organoléptica do leite a médio/longo prazo. Naquele trabalho, o tamanho do período experimental (9 d) pode ter limitado à adaptação dos sistemas enzimáticos capazes de metabolizar etanol. Além disso, as rações continham ingredientes fermentados (silagem de capim, silagem de cevada), com potencial para alteração dos resultados. Mais pesquisas são necessárias para comum acordo dos efeitos do etanol na qualidade do leite.

Tabela 47 - Análise sensorial do leite produzido por vacas suplementadas com etanol ou ácido acético

	Controle	Etanol	Ác. acético	EPM	P
Aparência	7,35	7,45	7,50	-	-
Aparência transformada ¹	27,90	28,60	28,77	1,28	0,88
Aroma	6,65	7,78	6,86	-	-
Aroma transformada ¹	21,88	24,80	25,50	1,38	0,15
Sabor	7,13	7,36	7,43	-	-
Sabor transformada ¹	26,15	27,90	28,43	1,23	0,40
Impressão global	7,28	7,48	7,56	-	-
Impressão global transformada ¹	25,81 ^b	28,94 ^a	30,12 ^a	1,13	0,02

^{a, b} Letras indicam que as médias diferem (Tukey; $\alpha = 0,05$)

¹ Transformação Box-Cox

6.4 Conclusões

O etanol e o ácido acético contribuíram para o desempenho de vacas leiteiras e devem ser considerados no valor energético de ingredientes de rações. O valor de energia líquida de lactação do etanol não foi superior àquele da matéria seca da dieta controle.

A ingestão de etanol ou de ácido acético não afetou a composição química e a qualidade sensorial do leite, avaliado a médio/longo prazo.

Referências

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 13th ed. Washington: AOAC International, 1980. 1015p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington, 1990. v. 1, 1117p.

ATKINS, P.W. **Physical Chemistry**. 5th ed. Oxford University Press: Oxford, 1994. 1031p.

FORBES, J.M. **Voluntary food intake and diet selection in farm animals**. 2nd Ed. Wallingford, UK :CABI, , 2007. 453p.

FREITAS, A.W.P.; PEREIRA, J.C.; ROCHA, F.C.; COSTA, M.G; LEONEL, F.P.; RIBEIRO, M.D. Avaliação da qualidade nutricional da silagem de cana-de-açúcar com aditivos microbianos e enriquecida com resíduo da colheita de soja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.35, p.38-47, 2006.

HUTCHINSON, K.J.; WILKINS, R.J. The voluntary intake of silage by sheep II. The effects of acetate on silage intake. **The Journal of Agriculture Science**, London, v. 77, 539-543, 1971.

KRIZSAN, S. J.; RANDBY, A. T.; WESTAD, F. The effect of acetic acid, caproic acid and tryptamine on voluntary intake of grass silage by growing cattle. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM FORAGE CONSERVATION, 12., 2006 Brno, Czech Republic, **Proceedings...** Brno, Czech Republic, 2006, p. 143-145.

KUNG JÚNIOR, L.; GRIEVE, D.B.; THOMAS, J.W.; HUBER, J.T. Added ammonia or microbial inocula for fermentation and nitrogenous compounds of alfalfa ensiled at various percents of dry matter. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, p. 299-306, 1984.

LEONARDI, C.; ARMENTANO, L.E. Effect of quantity, quality, and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 86, p. 557-564, 2003.

LEONARDI, C.; GIANNICO, F.; ARMENTANO, L.E. Effect of water addition on selective consumption (sorting) of dry diets by dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 88, p. 1043–1049, 2005.

LITTELL, R.C.; HENRY, P.R.; AMMERMAN, C.B. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 76, p. 1216-31, 1998.

MARI, L.J.; NUSSIO, L.G. O método Penn State Particle Size Separator para a predição do tamanho de partículas de silagens. 2002. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/bn/radarestecnicos>>. Acesso em: 21 jan 2007.

MAULFAIR, D.D.; ZANTON, G.I.; FUSTINI, M.; HEINRICHS, A.J. Effect of feed sorting on chewing behavior, production, and rumen fermentation in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 93, p. 4791–4803, 2010.

MCDONALD, P.; HENDERSON, N.; HERON, S. **The biochemistry of silage**. 2nd ed. Marlow:Chalcombe Publications, 1991. 340 p.

MITLOEHNER, F.M.; MALKINA, I.L.; KUMAR, A.; GREEN, P.G. Volatile organic compounds emitted from dairy silages and other feeds. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE PROCEEDINGS, 15., 2009. Madison. **Proceedings...** Madison, 2009. p. 15-26.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients Requirements of Dairy Cattle**. 7th rev. ed. Washington, DC: National Academy Press, 2001. 381 p.

PALMQUIST, D.L.; CONRAD, H.R. Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high grain or high fat diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, p. 1025-1030, 1971.

PRADHAM, K.; HEMKEN, R.W. Utilization of ethanol and its effect on fatty acid patterns in ruminants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 53, p. 1739-1746, 1970.

RANDBY, Å.T.; SELMER-OLSEN, I.; BAEVRE, L. Effect of ethanol in feed on milk flavor and chemical composition. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 82, p. 420-428, 1999.

RANDBY, A.T. Effect of propanol and dimethylsulphide in grass silage on organoleptic milk quality. **Journal of Animal and Feed Sciences**, Jabłonna, v. 16, Suppl. 1, p. 102–107, 2007.

RAUN, B.M.L.; KRISTENSEN, N.B. Metabolic effects of feeding ethanol or propanol to postpartum transition Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 94, p. 2566–2580, 2011.

RESENDE JÚNIOR, J.C.; PEREIRA, M.N.; BÔER, H.; TAMMINGA, S. Comparison of techniques to determine the clearance of ruminal volatile fatty acids. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 89, p. 3096-3106, 2006.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide**. Version 8.2. 5th ed. Cary: Statistical Analysis System Institute, 2001. 846p.

SCHMIDT, P.; NUSSIO, L.G.; SANTOS, M.C.; RIBEIRO, J.L.; ZOPOLLATTO, M.; PAZIANI, S.F.; MARI, L.J.; LOURES, D. R.S.; JUNQUEIRA, M.C. Comportamento ingestivo de bovinos alimentados com silagens de cana-de-açúcar inoculadas com doses de "*Lactobacillus buchneri*" NCIMB 40788. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004. Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, 2004. NR438.

SICILIANO-JONES, J.; MURPHY, M.R. Production of volatile fatty acids in the rumen and cecum-colon of steers as affected by forage:concentrate and forage physical form. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.72, p.485-492, 1989.

SPOELSTRA, S.F.; COURTIN, M.G.; van BEERS, J.A.C. Acetic acid bacteria can initiate aerobic deterioration of whole crop maize silage. **Journal of Agriculture Science**, London, v. 111, p. 127-132, 1988.

SUTTON, J. D.; DHANOA, M. S.; MORANT, S. V.; FRANCE, J.; NAPPER, D. J.; SCHULLER, E. Rates of production of acetate, propionate, and butyrate in the rumen of lactating dairy cows given normal and low-roughage diets. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 86, p. 3620–3633, 2003.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

WILDMAN, E. E.; JONES, G. M.; WAGNER, P. E.; BOMAN, R. L.; TROUTT Jr., H. F.; LESCH, T. N. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to standard production characteristics. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p. 495– 501, 1982.

WILES, P.G.; GRAY, I. K.; KISSLING, R.C. Routine analysis of protein by Kjeldahl and Dumas methods: review and interlaboratory study using dairy products. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 81, n. 3, p. 620-632, 1998.

ZOPOLLATTO, M.; DANIEL, J.L.P.; NUSSIO, L G. Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, p.170-189, 2009 (supl. especial).