

Contribuições de compostos voláteis de silagens na produção animal†

João Luiz Pratti Daniel¹

Luiz Gustavo Nussio¹

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 bruta é preservada. 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. 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 (pka ~ 3,8) do que os AGV (pka ~ 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).

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 1 e 2). No caso da silagem de cana-de-açúcar, os alcoóis são os principais produtos de fermentação (Zopollatto et al., 2009) (Tabela 3). Esta rota se caracteriza por perda elevada de matéria seca, enquanto a energia bruta é preservada, devido ao alto valor calórico do produto final, o etanol. 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.

† Texto apresentado no II International Symposium on Forage Quality and Conservation, 2011, São Pedro/SP
¹ Departamento de Zootecnia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo

Tabela 1 – 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)

Tabela 2 – Aldeídos encontrados em silos de larga escala

Aldeído (mg/kg MN)	Silagem de milho (n = 8)			Silagem de gramínea (n = 13)		
	Média	Desvio	Varição	Média	Desvio	Varição
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)

Tabela 3 – 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. Métodos de determinação do teor de matéria seca de 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). A determinação do teor de matéria seca em estufas de ventilação forçada também gera erros em estudos de perdas de matéria seca durante o processo de conservação de silagens (Figura 1).

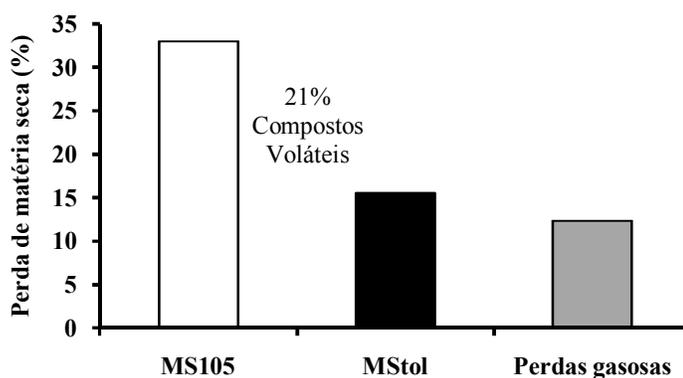


Figura 1 – Perdas de matéria seca e de gases em silagens de cana-de-açúcar não aditivadas. Os teores de matéria seca foram determinados por secagem em estufa (MS₁₀₅) ou destilação com tolueno (MS₁₀₁). Fonte: Daniel (2011).

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*. 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 poderia ser encontrada na fração água do destilado e aumentar seu volume, Perkins (1943) investigou este fato por meio de titulação com hidróxido de sódio, utilizando fenolftaleína 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. Além disso, 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 pode ser considerado mais adequado.

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 láctico 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.

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 (MS₁₀₀). A relação obtida entre os métodos foi descrita pela equação: % MS tolueno = 0,96 * MS₁₀₀ + 2,2 (r² = 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 saponificação² (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_{corrigida} = 1,011*MS₁₀₅ + 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 4). 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).

² 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).

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 4 – 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.

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 lático 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 5). 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 5 – Incidência, concentração e volatilidade de produtos de fermentação de silagens

	Silagem de milho			Silagem de capim		
	Incidência (%)	Conc. (g/g MN)	Volatilidade (%)	Incidência (%)	Conc. (g/g MN)	Volatilidade (%)
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. caprótico	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)

3. 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 têm importância nutricional significativa (Daniel et al., 2011a).

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 vapor³, que depende da temperatura do meio e do tipo

³ 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).

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.

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 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 $\cdot\text{OH}$; 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 (EPA⁴).

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 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.

⁴ Environmental Protection Agency – United States of America, www.epa.gov

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.

4. 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. 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.

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. Estas fontes de variação 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. 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. 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.

5. Utilização de ácidos orgânicos e etanol pelo animal

Embora parte dos produtos de fermentação de silagens possam ser perdidos, a fração consumida pelos animais têm importância nutricional significativa (Daniel et al., 2001a), já que possuem alto conteúdo energético por unidade de massa (Tabela 6).

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.

Tabela 6 – 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)

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 7). 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 7). 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. Em experimento recente realizado por Daniel (2011), a presença dos compostos voláteis da silagem de cana-de-açúcar, não deprimiu a síntese de proteína microbiana no rúmen e não alterou a eficiência de síntese por kg de NDT.

Tabela 7 – Alterações causadas pela adição de sacarose ou ácido láctico na ração

	Sacarose	Sac.+Ác. láctico	Ác. láctico	P 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)

O etanol, também encontrado em silagens (Morgan e Pereira, 1962; Zopollatto et al., 2009), é um composto com alto conteúdo energético (Tabela 6). 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 8).

Tabela 8 - Efeito do etanol nas produções de AGV e metano (in vitro)

	Etanol suplementado (mmol)	
	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†

† $P < 0,05$

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 9). 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). 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.

Tabela 9 – 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

Tendo em vista a conversão de etanol à acetato, a tabela 10 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.

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 microsomas, 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 acceptor de elétrons (Lieber e Abittan, 1999).

Tabela 10 - Conteúdo energético teórico de misturas de etanol e ácido acético absorvidas por ruminantes

<i>Etanol, %</i>	<i>100</i>	<i>75</i>	<i>50</i>	<i>25</i>	<i>0</i>
<i>Ác. acético, %</i>	<i>0</i>	<i>25</i>	<i>50</i>	<i>75</i>	<i>100</i>
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).

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 microssomais, 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.

6. Efeitos dos produtos de fermentação de silagens no consumo e no desempenho animal

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 na presente revisão.

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 Wixselaar, 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 láctico. 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. A manutenção do consumo de matéria seca com alteração do padrão ingestivo também foi verificado por Daniel (2011) em vacas leiteiras de alta produção (Figura 1). A recusa dos alimentos após o fornecimento matinal pode estar envolvida com a maior taxa de volatilização dos produtos de fermentação durante o dia do que no período noturno (Figura 2).

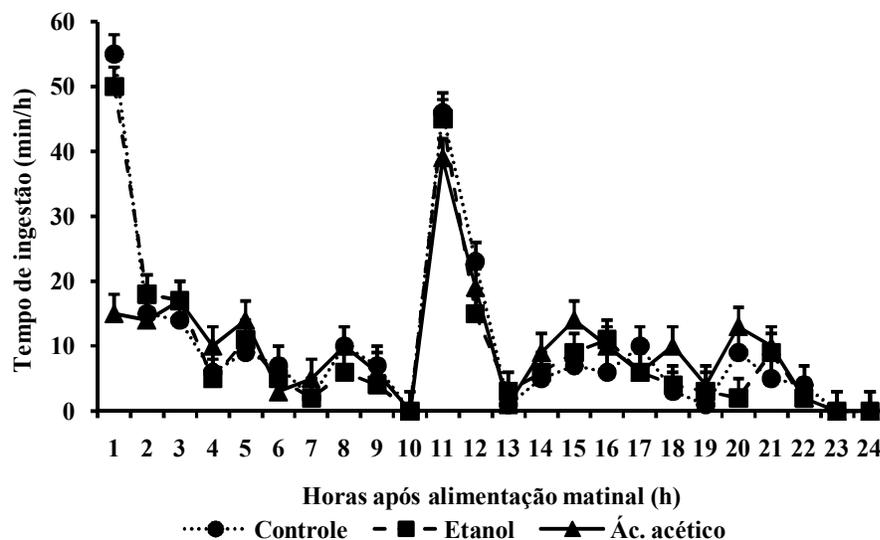


Figura 1 – Tempo de ingestão em cada hora do dia de vacas leiteiras suplementadas com etanol ou ácido acético ($P < 0,01$ para interação entre aditivo e hora). Fonte: Daniel (2011)

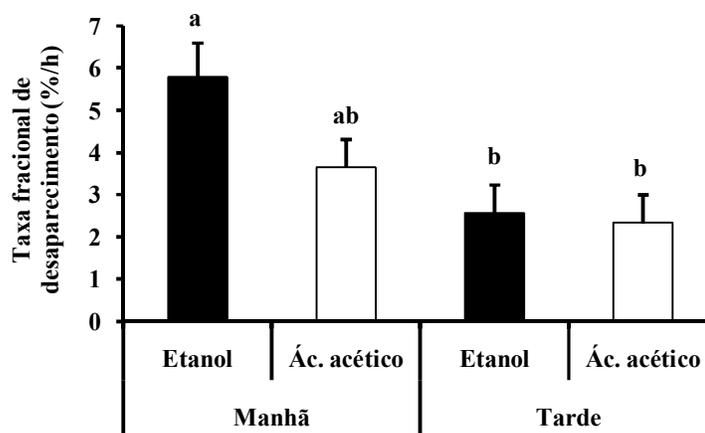


Figura 2 – Taxas fracionais de desaparecimento de etanol e ácido acético adicionados nas rações totais fornecidas de manhã ou no final da tarde (Tukey < 0,10). Fonte: Daniel (2011)

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, que compararam o valor nutricional do etanol ao do milho (Ham et al., 1994). 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 11). No experimento de

Daniel (2011) a eficiência energética de vacas suplementadas com etanol foi similar ao grupo controle (Figura 3). O valor de energia líquida de lactação (ELI) encontrado para o etanol foi próximo à 2,6 Mcal/kg. Em ambos os trabalhos, 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. Com o valor de ELI encontrado por Daniel (2011) pode-se especular que aproximadamente 90% do etanol foi convertido à acetato e corrobora com a ausência de etanol no sangue periférico. Do ponto de vista da conservação de forragens, foi possível estender o conhecimento tradicionalmente aceito a respeito da recuperação de energia pelas rotas metabólicas ocorridas no processo (Tabela 12).

Tabela 11 - 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).

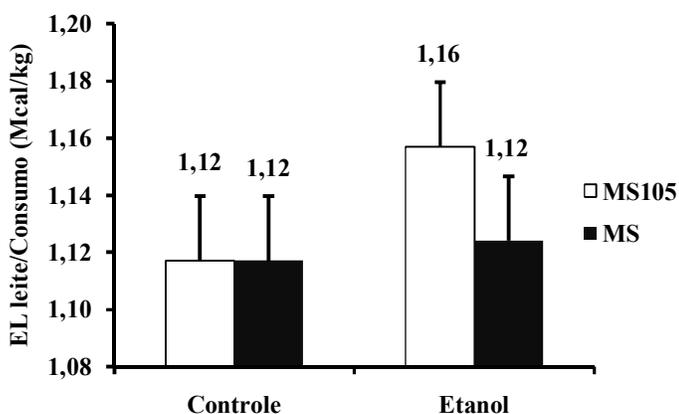


Figura 3 – Eficiência energética de vacas suplementadas com etanol. Fonte: Daniel (2011).

Tabela 12 – Recuperação de energia pela rota de fermentação alcoólica em silagens

		McDonald et al. (1991)	McDonald et al. (1991)	
Rota ¹	Produtos	Recuperação de MS (%)	Recuperação de EB ² (%)	Recuperação de ELI ³ (%)
Leveduras	Etanol e CO ₂	51	99	69 [†]

¹ Glicose foi considerada substrato; ² EB = energia bruta; ³ ELI = energia líquida de lactação

[†] Assumiu-se que 90% do etanol foi convertido à acetato. Calores de combustão considerados: glicose 676 kcal/mol, etanol 329 kcal/mol e ácido acético 222 kcal/mol

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. 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.

Daniel et al. (2011a) compararam o desempenho de vacas leiteiras de alta produção suplementadas com etanol ou ácido acético por sete semanas. O ácido acético reduziu ligeiramente o consumo de matéria seca sem alterar o desempenho. A suplementação com etanol aumentou a produção de leite e a produção de proteína do leite. Como o teor de gordura foi ligeiramente diminuído para o tratamento etanol (não significativo), a produção de leite corrigida para 3,5%Gordura não foi similar entre os tratamentos (Tabela 13). Ao contrário dos resultados obtidos por Randby et al. (1999), a qualidade sensorial do leite não foi afetada pelos tratamentos Daniel et al. (2011b), provavelmente pelo maior período experimental e possível adaptação dos animais ao etanol.

Tabela 13 – Desempenho de vacas leiteiras suplementadas com etanol ou ácido acético

Parâmetro	Controle	Etanol	Ác. acético	EPM	<i>P</i>
Consumo de matéria seca, 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
Gordura, %	3,55	3,37	3,69	0,11	0,12
Proteína, %	3,32	3,33	3,29	0,03	0,56
Gordura, kg	1,25	1,28	1,31	0,05	0,73
Proteína, kg	1,19 ^{ab}	1,26 ^a	1,15 ^b	0,03	0,03

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

Fonte: Daniel (2011)

7. Referências bibliográficas

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**, 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**, v. 80, p. 309-319, 1999.
- ANDREAE, M. O.; CRUTZEN, P. J. Atmospheric aerosols: biogeochemical sources and role in atmospheric chemistry. **Science**, v. 276, p. 1052-1058, 1997.
- ATKINS, P. W. **Physical Chemistry**. 5th ed. Oxford University Press: Oxford, 1994, 1031 p.
- BERGMAN, E. N. Energy contribution of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, v. 70, p. 567-590, 1990.
- BERNSTEIN, J. A.; ALEXIS, N.; BACCHUS, H.; BERNSTEIN, I. L.; FRITZ, P.; HORNER, E. ET AL.; LI, N; MASON, S et al. The health effects of nonindustrial indoor air pollution. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 121, p. 585–591, 2008.
- CAB (Commonwealth Agricultural Bureaux), 1961. Research Techniques in use at The Grassland Research Institute Hurley, Bull. 45. Farnham Royal, Reading. pp. 167.
- CALDWELL, D. R.; MURRAY, K. Some effects of ethyl alcohol on the growth of rumen bacteria. **Current Microbiology**, 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**, v. 23, p. 802-807, 1964.
- CHMELOVÁ, Š. Aldehydes in maize and grass silages. **14th International Symposium on Forage Conservation**, Brno, Czech Republic, p. 189-191, 2010
- CLYMER, J. **Heat of Combustion & Respiratory Quotient Calculation**. 2004 <<http://home.fuse.net/clymer/rq/>> Acessado em: 24/09/2008.
- 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**, 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**, v. 56, p. 1222-1235, 1983.
- DANIEL, J.L.P. **Contribuição da fração volátil no valor nutricional de silagens**. 2011. 160 p. Tese (Doutor em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- 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**, v. 94, E-Supplement 1, 2011a.
- DANIEL, J. L. P.; NUSSIO, L. G.; SPOTTO, M.H.F.; CARDOSO, T.L.; SÁ NETO, A.; ZOPOLLATTO, M. Long term ethanol or acetic acid supplementation do not impair sensory milk quality. **Journal of Dairy Science**, v. 94, E- Supplement 1, 2011b.
- DEMIGNÉ, C.; YACOUB, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C. Interactions between propionate and amino acid metabolism in isolated sheep hepatocytes. **British Journal of Nutrition**, v. 65, p. 301-317, 1991.
- 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**, 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. **J. Sci. Food Agric.**, 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**, v. 71, p. 115-123, 1991.
- FENTON, T. W.; FENTON, M.; MATHISON, G. W. Determination of water in fermented feeds by gas chromatography. **Can. J. Anim. Sci.**, 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**, v. 47, p. 1152-1156, 1978.
- FREITAS, A.W.P.; PEREIRA, J.C.; ROCHA, F.C. et al. 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**, v.35, n.1, p.38-47, 2006.
- GALLETTI, G. C.; PICCAGLIA, R. Water determination in silages by Karl Fisher titration. **J. Sci. Food Agri.** v. 43, p. 1, 1988.
- GLASS, R. Saponification reaction and determination of water. **Anal. Biochem.**, v. 37, p. 219-224, 1970.
- GOULD, J. **Supplemental ethanol for ruminants consuming forage-based diets.** M. S. Thesis, Univ. Wyoming. 2000. 83 p.
- HAIGH, P. M.; HOPKINS, J. R. Relationship between oven and toluene dry matter in grass silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 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 grain with soluble as a source of protein and energy for ruminants. **Journal of Animal Science**, 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**, 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**, 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**, v. 39, p. 1430-1437, 1956.
- HUHTANEN, P. New developments in the prediction of intake of silage based diets. **XIIIth International Silage Conference**, Scotland, p. 236-251, 2002.
- 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**, 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**, 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**, 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**, 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**, v. 77, 539-543, 1971.
- 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 Forage Sci.**, v. 61, p. 282–292, 2006.
- JAAKKOLA, S.; HUHTANEN, P. The effect of lactic acid on the microbial protein synthesis in the rumen of cattle. **AJAS.**, v. 2, p. 398-399, 1989.
- JEAN-BLAIN, C.; DURIX, A.; TRANCHANT, B. Kinetics of ethanol metabolism in sheep. **Reprod. Nutr. Dev.**, 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**, 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**, 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**, v. 90, p. 1364-1377, 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. **12th International Symposium Forage Conservation**. Brno, Czech Republic, 2006, p. 143-145.
- 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**, v. 85, p. 984-996, 2007.
- 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, 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**, v. 17, p. 365-379, 1999.
- MacLEOD, N. A.; ORSKOV, E. R. Absorption and utilization of volatile fatty acids in ruminants. **Can. J. Anim. Sci.**, v. 64 (Suppl.), p. 354-355, 1984.

- McDONALD, P.; DEWAR, W. A. Determination of dry matter and volatiles in silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 11, p. 566-570, 1960.
- McDONALD, P.; HENDERSON, N.; HERON, S. **The biochemistry of silage**. 2. ed. 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**, v. 17, p. 259-277, 2007.
- MERTENS, D. R. Regulation of forage intake. In: Fahey, G. C. Jr. (Ed.) **Forage Quality, Evaluation and Utilization**. American Society of Agronomy, Madison, WI, 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. **J. Sci. Food Agric.**, 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. **XVth International Silage Conference Proceedings**, Madison, Wisconsin, USA, p. 15-26, 2009.
- MOE, P.W.; FLATT, W.P.; TYRRELL, H.F. The net energy value of feeds for lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 55, p. 945-958, 1972.
- MONTES, F.; HAFNER, S.; ROTZ, C. A. Characterization and measurement of VOC emissions from silage. **XVth International Silage Conference Proceedings**, Madison, Wisconsin, USA, p. 273-274, 2009.
- MORGAN, M. E.; PEREIRA, R. L. Volatile constituents of grass and corn silage. I. Steam distillates. **Journal of Dairy Science**, v. 45, p. 457-466, 1962.
- MOOMAW, C.; HUNGATE, R. E. Ethanol conversion in the bovine rumen. **J. Bacteriol.**, v. 85, p. 721-7222, 1963.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients Requirements of Dairy Cattle**. 7th rev. ed. Washington, DC: National Academy Press, 2001. 381 p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Estimating mortality risk reduction and economic benefits from controlling ozone air pollution**. Washington, D.C.:National Academies Press, 2008. 226p.
- 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.
- 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**, v. 66, p. 357-367, 1998.
- 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**, 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**, 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.
- PETERS, J.P.; SHEN, R.Y.W.; CHESTER, S.T. Propionic acid disappearance from the foregut and small intestine of the beef steer. **J. Anim. Sci.**, v. 68, p. 3905-3913, 1990.
- PERKINS, A. E. Dry matter determination in green plant material and in silage. **Journal of Dairy Science**, v. 26, p. 545-551, 1943.
- 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**, 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**, v. 56, p. 405-411, 2001.
- PRADHAM, K.; HEMKEN, R. W. Utilization of ethanol and its effect on fatty acid patterns in ruminants. **J. Dairy Science**, v. 53, p. 1739-1746, 1970.
- 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**, v. 89, p. 3096-3106, 2006.
- RANDBY, Å.T.; SELMER-OLSEN, I.; BAEVRE, L. Effect of ethanol in feed on milk flavor and chemical composition. **J. Dairy Sci.**, v. 82, p. 420-428, 1999.
- RAUN, B. M. L.; KRISTENSEN, N. B. Portal absorption of ethanol and propanol in early lactating dairy cows. **XIth International Symposium on Ruminant Physiology**, Clermont-Ferrand, France, p. 338-339, 2009.
- 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**, v. 71, p.1803-1812, 1988.
- 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. **J. Dairy Sci.**, 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. **Anim. Prod.**, 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. **Am. J. Vet. Res.**, 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**. Elsevier Science Publishers Ltd, 1988. p. 185-215.
- 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. **J. Agric. Sci.**, 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**, v. 66, p. 115-127, 1998.
- STEWART, C. S.; BRYANT, M. P. The rumen bacteria. In: HOBSON, P. N. **The rumen microbial ecosystem**. Elsevier Science Publishers Ltd, 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**, 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. p. 49-51. In: **Forage Analysis Procedures**. National Forage Testing Association, Omaha, NE. 1993.
- 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**, 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. **XVth International Silage Conference Proceedings**, Madison, Wisconsin, USA, p. 33-34, 2009.
- 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. **XVth International Silage Conference Proceedings**, Madison, Wisconsin, USA, p. 483-484, 2009.
- 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**, 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. **J. Sci. Food Agri.**, 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**, 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. **R. Bras. Zootec.**, v. 38, p.170-189, 2009 (supl. especial).