MAURO SÉRGIO DA SILVA DIAS

**Efeitos da adição de ácidos orgânicos na dieta completa e frequência de
alimentação sobre o desempenho produtivo de vacas em lactação**

Pirassununga, SP

2020

MAURO SÉRGIO DA SILVA DIAS

Efeitos da adição de ácidos orgânicos na dieta completa e frequência de alimentação sobre o desempenho produtivo de vacas em lactação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Francisco Palma Rennó

De acordo:

Orientador

São Paulo
2020

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3948
FMVZ

Dias, Mauro Sérgio da Silva
Efeitos da adição de ácidos orgânicos na dieta completa e frequência de
alimentação sobre o desempenho produtivo de vacas em lactação / Mauro Sérgio da
Silva Dias. – 2020.
76 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga,
2020.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.
Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.
Orientador: Prof. Dr. Francisco Palma Rennó.

1. Ácido propiônico. 2. Produção de leite. 3. Temperatura de cocho. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da adição de ácidos orgânicos na dieta completa e frequência de alimentação sobre desempenho produtivo de vacas em lactação", protocolada sob o CEUA nº 9187220119 (ID 006257), sob a responsabilidade de **Francisco Palma Rennó e equipe; Mauro Sergio da Silva Dias** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 07/03/2019.

We certify that the proposal "Effects of the addition of organic acids in the complete diet and food frequency on production performance of lactation cows", utilizing 24 Bovines (24 females), protocol number CEUA 9187220119 (ID 006257), under the responsibility of **Francisco Palma Rennó and team; Mauro Sergio da Silva Dias** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/07/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2019** a **06/2019**

Área: **Nutrição E Produção Animal**

Origem: **Animais provenientes de outros projetos**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 7 anos**

N: **24**

Linagem: **Raça Holandesa**

Peso: **500 a 800 kg**

Local do experimento: Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite - Campus USP Fernando Costa

São Paulo, 13 de janeiro de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenador
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: DIAS, Mauro Sérgio da Silva

Título: Efeitos da adição de ácidos orgânicos na dieta completa e frequência de alimentação sobre o desempenho produtivo de vacas em lactação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha falecida avó, Maria Odeana de Souza Dias.

Aos meus pais Maria José da Silva Dias e Benedito Sérgio de Souza Dias e ao meu avô Ivo de Souza Dias.

Ao LPBL que permitiu que de alguma forma eu fizesse parte dele, permitiu ser minha casa nesse tempo, e também por acreditar que eu pudesse retribuir de alguma forma.

Dedico este trabalho a eles como uma forma de gratidão e por tudo que fizeram por mim.

AGRADECIMENTO

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus que me deu condições para que eu pudesse realizar este trabalho.

À minha família, que sempre me apoiou em todas as minhas decisões. Meus pais Maria e Benedito que sempre foram a minha sustentação e minha base de tudo. Aos meus primos Luciana, Ricardo, Camila e Gabriela pelo apoio e companheirismo.

Ao Professor Francisco Palma Rennó, que apesar de todas turbulências que a vida nos traz se tornou meu grande amigo e um segundo pai durante esse tempo. Por ter acreditado no meu trabalho e em minha dedicação desde o estágio extracurricular em 2016, e no ano seguinte concedido projeto de iniciação científica e posteriormente mestrado. Uma pessoa extraordinária que esteve sempre presente, instruindo, ensinando, cobrando, inclusive nos momentos de “tomar duas”, e, além disso, por ter acreditado no meu trabalho, e que eu tinha algo a acrescentar no LPBL, proporcionando um vasto crescimento, tanto intelectual, pessoal e profissional. E além de tudo me proporcionou a realização de um sonho.

Aos colegas de pós-graduação Alanne Tenório Nunes, Guilherme Gomes da Silva, Tássia Barrera de Paula e Silva, Lucas Ghedin Ghizzi, Nathália Trevisan Scognamilio Grigoletto, Paulo César Vittorazzi Júnior, Rodrigo Garavaglia Chesini, Milena Bugoni e Althieres José Furtado, pessoas que de alguma forma contribuíram para minha formação, transmitindo ensinamentos, dando conselhos, orientações e principalmente presentes nos momentos mais difíceis e de coletas.

Aos colegas de trabalho, Tiago Del Valle, Elissandra Maiara, Júlia Avansi Marques, Larissa Schneider Gheller e Rafael Barletta, que foram pessoas que me ajudaram muito, principalmente no início do mestrado.

Aos colegas de Pirassununga Igor Motta, Victor Hugo, Rafael Teixeira, Jesus Leonardo, Vicente Buarque, Nathália Marques, “Lampião”, Sebastião Correia, Marcos Mello (“Sar”), “Du Português” e Ramon.

Aos funcionários do LPBL, Diogo, Lucas, Dênis e Carlos Schmidt e funcionários da empresa terceirizada que se tornaram muito amigos e sem eles também não seria possível a conclusão do projeto.

Aos alunos de iniciação científica Lucas Yudi, Luís Guilherme e Paula Curti. Todos os estagiários que de alguma forma contribuíram com este trabalho, tanto na fase

experimental como na fase de análises laboratoriais. Agradeço em especial as estagiárias Camila Schubert, Cláudia Ribeiro, Naiara Souza, Tamires Nunes, Daniela Dantas e o estagiário Natan Terassi, oportunidade em que acompanharam o andamento do experimento e me ajudaram muito nesta fase, principalmente nas coletas, e realização de misturas de cocho.

Ao LPBL por fornecer todas as condições para a condução do projeto, condições estruturais e financeiras.

Ao Departamento de Produção e Nutrição Animal e ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal, pelas oportunidades e conhecimentos adquiridos.

À CAPES, pois o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 (número do processo: 88882.376647/2019-01) pela bolsa de mestrado concedida.

À ALLTECH por confiar no nosso trabalho. Agradeço à Alltech, em especial ao Gerente Nacional da Alltech Winston Giardini, Dr. Luiz Fernando Costa e Silva e Msc. Daniel Navarro Lobato pelo fornecimento do produto e o suporte geral para o experimento.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e à Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realizar este sonho.

Agradeço a todos de coração!

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.”

Albert Einstein

RESUMO

DIAS, M. S. S. Efeitos da adição de ácidos orgânicos na dieta completa e frequência de alimentação sobre o desempenho produtivo de vacas em lactação. [Effects of organic acids in total mixed ration and feeding frequency on productive performance of dairy cows]. 2020. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2020.

O objetivo do presente estudo foi determinar os efeitos da adição de ácidos orgânicos (AO; Mold-Zap®) na dieta total e da frequência de fornecimento da dieta total para vacas leiteiras em lactação sobre o consumo e digestibilidade aparente total de matéria seca (MS) e nutrientes, índice de seleção de partículas, comportamento alimentar, fermentação ruminal, produção e composição do leite, síntese de proteína microbiana, balanço de nitrogênio, concentração de metabólitos sanguíneos e temperatura da dieta total. A hipótese do presente estudo afirma que a adição de AO diretamente à dieta total, é capaz de minimizar sua deterioração, permitir a redução de frequência de fornecimento dos alimentos e influenciar positivamente o desempenho produtivo de vacas em lactação. Foram utilizadas 24 vacas da raça Holandesa em lactação, sendo 4 delas canuladas no rúmen, com 247 ± 109 dias em lactação, $672 \pm 71,6$ kg de peso corporal e $31,1 \pm 5,37$ kg de produção diária de leite ao início do experimento, as quais foram distribuídas em quadrados Latinos 4 x 4, balanceados e contemporâneos, em arranjo fatorial 2 x 2 e atribuídas aleatoriamente aos seguintes tratamentos: 1) controle 1 (C1x), dieta basal, ofertada uma vez ao dia, pela manhã; 2) AO1x, dieta basal associada aos AO, ofertada uma vez ao dia, pela manhã; 3) controle 2 (C2x), dieta basal, ofertada duas vezes ao dia, pela manhã e no início da tarde; e 4) AO2x, dieta basal associada aos AO, ofertada duas vezes ao dia, pela manhã e no início da tarde. Cada período experimental teve duração de 21 dias, sendo 14 dias destinados à adaptação aos tratamentos e 7 dias às coletas de dados e mensuração de variáveis. Não foi observado efeito dos AO sobre o consumo e digestibilidade aparente total da MS e nutrientes. Vacas alimentadas duas vezes por dia selecionaram mais partículas menores que 4 mm ($P = 0,012$). A adição de AO na dieta total diminuiu o tempo em que os animais permaneceram em pé ($P = 0,019$) e reduziu o tempo de ócio ($P = 0,045$). Os animais alimentados uma vez por dia passaram mais tempo bebendo água ($P = 0,021$). Além disso, a adição de AO ou a frequência de alimentação não afetaram o nitrogênio ureico e a glicose sérica, bem como a variação na ingestão de nitrogênio e nitrogênio fecal e urinário, embora o uso de AO tenha melhorado o nitrogênio do leite e afetado a síntese de alantoína do leite ($P \leq 0,033$), sem afetar a síntese de

proteína microbiana. A adição de AO melhorou a produção de leite, proteína e lactose ($P \leq 0,034$), e gerou tendência ao aumento do leite corrigido para gordura ($P = 0,064$), além de manter a temperatura da dieta total estável por mais tempo em relação à dieta total que não recebeu adição de AO ($P = 0,07$). Dessa forma, a utilização de AO na dieta total de vacas em lactação resultou em melhor desempenho produtivo.

Palavras-chave: Ácido propiônico. Produção de leite. Temperatura de cocho.

ABSTRACT

DIAS, M. S. S. Effects of organic acids in total mixed ration and feeding frequency on productive performance of dairy cows. [Efeitos da adição de ácidos orgânicos na dieta completa e frequência de alimentação sobre o desempenho produtivo de vacas em lactação]. 2020. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2020.

The aim of the present study was to determine the effects of adding organic acids (OA; Mold-Zap®) on the total diet and the frequency of supply of the total diet to lactating dairy cows on intake and total apparent digestibility of dry matter (DM) and nutrients, sorting index, feeding behavior, ruminal fermentation, milk yield and composition, microbial protein synthesis, nitrogen balance, concentration of blood metabolites and total diet temperature. The hypothesis of the present study states that the addition of AO directly to the total diet is able to minimize its deterioration, allow the reduction of food supply frequency and positively influence the productive performance of lactating cows. 24 lactating Holstein cows were used, 4 of them cannulated in the rumen, with 247 ± 109 days in milk, 672 ± 71.6 kg of body weight and 31.1 ± 5.37 kg of daily milk yield at the beginning of the experiment, which were distributed in 4 x 4 Latin squares, balanced and contemporary, in a 2 x 2 factorial arrangement and randomly assigned to the following treatments: 1) control 1 (C1x), basal diet, offered once a day, in the morning ; 2) OA1x, basal diet associated with OA, offered once a day, in the morning; 3) control 2 (C2x), basal diet, offered twice a day, in the morning and early afternoon; and 4) OA2x, a basal diet associated with OA, offered twice a day, in the morning and early afternoon. Each experimental period lasted 21 days, 14 days for adaptation to treatments and 7 days for sampling. There was no effect of OA on intake and total apparent digestibility of DM and nutrients. Cows fed twice a day selected more particles smaller than 4 mm ($P = 0.012$). The addition of OA to the total diet decreased the time that the animals remained standing ($P = 0.019$) and reduced the leisure time ($P = 0.045$). Animals fed once a day spent more time drinking water ($P = 0.021$). Besides that, the addition of OA or the frequency of feeding did not affect urea nitrogen and serum glucose, as well as the variation in nitrogen and fecal and urinary nitrogen intake, although the use of OA improved the nitrogen of milk and affected the synthesis of milk allantoin ($P \leq 0.033$), without affecting microbial protein synthesis. The addition of OA improved milk, protein and lactose yield ($P \leq 0.034$), and led to a tendency to increase the fat-corrected milk yield ($P = 0.064$), in addition to keeping the temperature of the total diet stable for longer than the total diet

that received no addition of OA ($P = 0.07$). Thus, the use of OA in the total diet of lactating cows resulted in a better productive performance.

Keywords: Propionic acid. Milk yield. Trough temperature.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química dos ingredientes utilizados na dieta experimental.....	36
Tabela 2 - Ingredientes e composição química da dieta experimental.....	38
Tabela 3 - Consumo e digestibilidade aparente total da MS e nutrientes de vacas em lactação alimentadas com adição de AO na dieta total	48
Tabela 4 - Comportamento alimentar de vacas em lactação alimentadas com a adição de AO na dieta total	49
Tabela 5 - Índice de seleção de partículas de vacas em lactação alimentadas com adição de AO na dieta total	50
Tabela 6 - pH ruminal, concentração de N-NH ₃ e perfil de AGCC de vacas em lactação alimentadas com a adição de AO na dieta total	51
Tabela 7 - Síntese de proteína microbiana de vacas em lactação alimentadas com a adição de AO na dieta total	52
Tabela 8 - Balanço de nitrogênio de vacas em lactação alimentadas com a adição de AO na dieta total.....	53
Tabela 9 - Metabólitos sanguíneos de vacas em lactação alimentadas com a adição de AO na dieta total.....	54
Tabela 10 - Produção e composição do leite e eficiência produtiva de vacas em lactação alimentadas com a adição de AO na dieta total.....	55

LISTA DE ABREVIACÕES

AO	Ácidos orgânicos
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
CMS	Consumo de matéria seca
CNF	Carboidratos não-fibrosos
C1x	Controle 1 trato
C2x	Controle 2 tratos
DEL	Dias em lactação
DP	Derivados de purina
EA	Estabilidade aeróbica
EE	Extrato etéreo
FDA	Fibra insolúvel em detergente ácido
FDN	Fibra insolúvel em detergente neutro
FDNi	Fibra indigestível em detergente neutro
FF	Forragem fresca
MN	Matéria natural
MO	Matéria orgânica
MS	Matéria seca
AO 1x	Ácidos Orgânicos (Mold-Zap [®]) 1 trato
AO 2x	Ácidos Orgânicos (Mold-Zap [®]) 2 tratos
N-NH ₃	Nitrogênio amoniacal
PB	Proteína bruta

PC	Peso corporal
PL	Produção de leite
PLCG	Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	HIPÓTESE	20
3	OBJETIVOS	21
4	REVISÃO DE LITERATURA	22
4.1	DIETA TOTAL.....	24
4.2	FREQUÊNCIA DE ALIMENTAÇÃO.....	27
4.3	ÁCIDOS ORGÂNICOS	30
4.4	DIETA TOTAL <i>vs</i> FREQUÊNCIA DE ALIMENTAÇÃO <i>vs</i> ÁCIDOS ORGÂNICOS.....	33
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
5.1	LOCAL E ANIMAIS	35
5.2	DIETA E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	36
5.3	CONSUMO E DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL DA MATÉRIA SECA E NUTRIENTES.....	39
5.4	COMPORTAMENTO ALIMENTAR.....	41
5.5	ÍNDICE DE SELEÇÃO DE PARTÍCULAS	41
5.6	FERMENTAÇÃO RUMINAL	42
5.7	SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA E BALANÇO DE NITROGÊNIO.....	43
5.8	METABÓLITOS SANGUÍNEOS	44
5.9	PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE	45
5.10	TEMPERATURA DA DIETA TOTAL	45
5.11	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	46
6	RESULTADOS.....	47
6.1	CONSUMO E DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL DA MATÉRIA SECA E NUTRIENTES.....	47
6.2	COMPORTAMENTO ALIMENTAR.....	49

6.3	ÍNDICE DE SELEÇÃO DE PARTÍCULAS	50
6.4	FERMENTAÇÃO RUMINAL	50
6.5	SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA	52
6.6	BALANÇO DE NITROGÊNIO	53
6.7	METABÓLITOS SANGUÍNEOS	53
6.8	PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE	54
6.9	TEMPERATURA DA DIETA TOTAL	56
7	DISCUSSÃO	57
8	CONCLUSÃO	62
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1 INTRODUÇÃO

Para o aumento da produtividade animal, é essencial a utilização de novas tecnologias alimentares, a fim de melhorar e garantir a qualidade do alimento oferecido aos animais, uma vez que o desempenho produtivo está diretamente relacionado a sua qualidade (BERNARDES et al., 2012, ASHBELL et al. 2002). Durante muitos anos a alimentação de vacas leiteiras se baseou no fornecimento apenas de volumoso, sem haver preocupação ou conhecimento sobre dietas nutricionalmente equilibradas e exigências nutricionais dos animais (COPPOCK et al., 1981).

O sistema de produção de vacas leiteiras confinadas está cada vez mais comum na pecuária leiteira, principalmente pela necessidade de aumento da produtividade em pequenas áreas. Além disso, a modernização da atividade leiteira exige que os produtores se mantenham atualizados. As instalações do sistema de confinamento permitem uma maior produção, alimentação adequada e principalmente o bem estar animal. Apesar dos investimentos serem maiores do que na criação a pasto, a produção do rebanho promove um retorno rápido ao produtor (ALVIM et al., 1997).

No momento do fornecimento do alimento aos animais há exposição da silagem ao ambiente e oxigênio, aumentando a susceptibilidade por deterioração aeróbica (BORREANI e TABACCO, 2017) podendo estender esse efeito deteriorante para a dieta total, comprometendo a qualidade dos alimentos. A proliferação microbiana na dieta total promove deterioração dos nutrientes, aquecimento do alimento diminuindo sua qualidade e o desempenho produtivo de vacas leiteiras (SEPPÄLÄ et al., 2013).

Por outro lado, o processo de preparação da dieta total antes de ser oferecida aos animais requer um trabalho adicional; portanto, opções viáveis para reduzir esse trabalho podem ser úteis. O fornecimento da dieta total em esquemas de alimentação convencionais em fazendas de vacas leiteiras baseiam-se em administração da dieta total em esquemas de alimentação na maioria das operações leiteiras duas vezes por dia (2x); no entanto, muitos agricultores optam por alimentar suas vacas apenas uma vez por dia para minimizar o custo da mão-de-obra (Mattachini et al., 2019).

Como os custos de alimentação geralmente representam 50% ou mais do custo total da produção leiteira (Bath, 1985), qualquer alternativa para reduzir os custos de alimentação e

aumentar a eficiência da utilização dos alimentos na produção de leite podem contribuir com o retorno econômico da atividade leiteira.

Sendo que ao aumentar a frequência de fornecimento da dieta total para vacas leiteiras pode-se aumentar a produção de leite resultando em menos problemas de saúde dos animais (NRC, 2001), tendo como desvantagem um alto custo com mão-de-obra operacional.

Recentemente, alguns estudos foram publicados relatando o uso de aditivos de ácidos orgânicos (AO) na dieta total de vacas leiteiras, com o objetivo principal de aumentar a preservação dos alimentos durante o dia, reduzir as perdas dos nutrientes e minimizar a deterioração dos alimentos, além de aumentar a estabilidade aeróbica (EA) dos alimentos (SANTOS et al., 2019; GHELLER et al., 2020). Produtos à base de ácido propiônico são utilizados na dieta total por possuírem características de inibição da ação de microrganismos indesejáveis na dieta total diminuindo a deterioração dos alimentos.

Portanto, a possibilidade de fornecer um alimento mais fresco durante o dia com a adição de AO à dieta total possibilita a redução da frequência de fornecimento da dieta total, diminuindo custos e aumentando o desempenho animal.

2 HIPÓTESE

A utilização de ácidos orgânicos à base de ácido propiônico (Mold-Zap®, Alltech® Inc., Nicholasville, KY, USA), adicionados diretamente à dieta total, é capaz de minimizar a deterioração dos alimentos e permitir a redução de frequência de fornecimento da dieta total, e influenciar positivamente o desempenho produtivo de vacas leiteiras em lactação.

3 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da adição de AO (Mold-Zap®) na dieta total e da frequência de fornecimento da dieta total para vacas holandesas em lactação sobre o consumo, digestibilidade aparente total da MS e nutrientes, índice de seleção de partículas, comportamento alimentar, fermentação ruminal, produção e composição do leite, síntese de proteína microbiana, balanço de nitrogênio, concentrações de metabólitos sanguíneos e temperatura da dieta total.

4 REVISÃO DE LITERATURA

A produção de silagem de milho é o processo que compreende 4 fases: imediatamente após a colheita, em que ainda há presença de oxigênio junto ao volumoso a ser ensilado; fermentação no interior do silo; estabilidade da silagem e armazenamento no silo; e, por último, abertura do silo, fase em que há exposição da silagem ao ambiente, oxigênio e umidade, para o fornecimento aos animais (WILKINSON e DAVIES, 2013).

Podem haver interferências na MS da silagem e no teor dos nutrientes durante cada uma dessas etapas do processo de ensilagem, reduzindo a qualidade do produto fornecido. Dentre os principais estágios em que ocorrem as perdas de nutrientes estão: o momento da colheita em campo, a fase de fermentação da silagem, a produção de efluentes e a exposição da silagem ao oxigênio durante o armazenamento e retirada do silo (BORREANI e TABACCO, 2017).

A produção de silagem é o fator chave no sistema de produção com bovinos, visto que ao realizar corretamente a produção e o fornecimento deste volumoso aos animais, evitam-se déficit na qualidade da silagem produzida, preservando sua qualidade nutricional e permitindo melhor desempenho dos animais (CHEN et al., 2017).

Dessa forma, após a abertura do silo e exposição da silagem ao oxigênio, temos como resultado a proliferação de microrganismos na silagem. Essa proliferação é uma das principais causas de deterioração e perdas da matéria ensilada e de nutrientes, bem como de variação da estabilidade aeróbica da silagem, comprometendo a qualidade do alimento ofertado aos animais (DANNER et al., 2003; GHELLER et al., 2020). Como a produtividade animal está diretamente relacionada à qualidade do alimento fornecido (BERNARDES et al., 2012), ao serem reduzidas perdas nutricionais ocasionadas pela proliferação de microrganismos e consequente deterioração dos alimentos, pode-se permitir aumento da eficiência produtiva de vacas leiteiras (ASHBELL et al., 2002).

O processo de deterioração pode ocorrer antes ou depois do momento da abertura do silo. Antes mesmo de sua abertura, a deterioração do silo pode ocorrer por falhas em processos anteriores, incluindo produção, compactação ou até mesmo vedação. Por outro lado, quando esses processos são bem realizados, preserva-se a matéria ensilada devido à anaerobiose e à proliferação de bactérias ácido-láticas. A produção de ácido láctico leva à queda de pH e inibição da ação de outros microrganismos na massa ensilada, evitando a deterioração (WEINBERG et al., 2010).

Sendo assim, a redução imediata do pH no interior do silo preserva os nutrientes da matéria ensilada através da inibição da proliferação dos microrganismos indesejáveis, como do gênero *Clostridium* (DANNER et al., 2003; FINNERAN et al., 2010). Tais microrganismos não formam apenas ácido butírico no processo de ensilagem, mas também são responsáveis pela degradação de proteínas em amônia, resultando em aumento do pH no interior do silo (PAHLOW et al., 2003), o que favorece a atividade aeróbica de microrganismos oportunistas, como fungos e bactérias. Dessa forma, agrava-se ainda mais a deterioração da massa ensilada, causando grandes perdas do valor nutricional (SCHMIDT e KUNG, 2010).

Toda silagem que é exposta ao ar pode entrar em processo de deterioração devido à atividade de bactérias aeróbicas, o que poderia influenciar negativamente a qualidade da silagem. Como todo processo de ensilagem possui algumas perdas inevitáveis, produzir forragem de qualidade e evitar ao máximo as perdas nutricionais do volumoso é um processo desafiador o que revela necessidade de boas práticas na produção do volumoso para reduzir a deterioração da matéria ensilada e permitir o fornecimento de alimento de qualidade aos animais (WEINBERG et al., 2010; TABACCO et al., 2011).

No início da produção de silagem, antes que o processo fermentativo se inicie, o oxigênio retido junto à forragem no interior do silo permite que ocorram processos químicos que consomem os nutrientes da forragem, resultando em produção de água, dióxido de carbono, calor e amônia (MCALLISTER e HRISTOV, 2000). A proliferação dos microrganismos e fermentação da matéria ensilada pode ser influenciada por diversos fatores (BORREANI et al., 2018). A associação da proliferação microbiana ao clima local também pode favorecer o aquecimento da silagem, intensificando o processo de deterioração. Além disso, fatores de interferência no pH do meio, presença de oxigênio e teor de umidade podem favorecer multiplicação microbiana e provocar aumento da temperatura do alimento (ASHBELL et al., 2002; ADESOGAN e NEWMAN, 2014; GHELLER et al., 2020).

Quando há contato da silagem com oxigênio e exposição ao ambiente e umidade, aumenta-se a susceptibilidade à deterioração. Os microrganismos presentes na silagem que estavam inativos, devido à anaerobiose e acidificação do processo fermentativo da silagem, entram em contato com o oxigênio e começam sua multiplicação (BORREANI et al., 2018). O efeito deteriorante ocasionado na silagem antes do fornecimento aos animais, além de promover redução do valor nutricional, também pode reduzir o teor de MS (GERLACH et al., 2013).

Este efeito deteriorante pode ocorrer majoritariamente pelo desenvolvimento de bactérias e leveduras que metabolizam o ácido láctico presente na silagem e são submetidas e expostas

ao ambiente com elevada temperatura, tendo como consequência perda da EA (WILKINSON e DAVIES, 2013). Essas condições são frequentemente comuns em países tropicais, principalmente quando a silagem é posteriormente misturada ao concentrado, o que pode elevar o teor de substrato para os microrganismos fazendo com que se intensifique o processo deteriorante (HAN et al., 2015).

4.1 DIETA TOTAL

Mudanças ocorreram ao longo do tempo, onde em épocas quentes do ano os animais eram alimentados somente com forragem e pastagem devido à sua abundância, sem nenhum tipo de concentrado ou tipo de dieta total, mas em épocas frias do ano, devido à escassez de volumoso, iniciou-se o fornecimento de pequena fração de alimentos concentrados aos animais. Nessas épocas, era fornecido feno ou silagem como fonte de volumoso e, ao fornecer a fração de concentrado na dieta, notava-se a melhora do desempenho produtivo desses animais (SCHINGOETHE, 2017).

Estudos relacionados à dieta total foram sendo desenvolvidos e notou-se a necessidade da suplementação de concentrado para vacas leiteiras, de maneira a atender às exigências nutricionais e melhorar a produtividade desses animais (EASTRIDGE, 2006).

No entanto, o fornecimento excessivo de alimentos concentrados para vacas em lactação pode causar alguns transtornos à saúde do trato digestório. Além disso, desbalanço da dieta por alto teor de concentrado e baixos teores de fibra pode ocasionar doenças metabólicas, resultando em queda na produção de gordura do leite (SCHINGOETHE, 2017).

De acordo com Coppock et al. (1981), o termo TMR (*Total Mixed Ration*), também conhecido como dieta total, é definido como mistura composta de todos ingredientes da dieta, incluindo o núcleo mineral, constituída por forragem e alimentos concentrados. Desde que a mistura e homogeneização dos ingredientes ocorram de maneira adequada, forma-se alimento único a ser fornecido aos animais, o que dificulta a seleção dos ingredientes pelos animais (AMARAL-PHILLIPS et al., 2002). Segundo NRC, (2001) o objetivo da utilização da dieta total é promover a oportunidade para as vacas consumirem a quantidade de alimento determinada na formulação da dieta.

Sendo assim, ao utilizar dieta total para vacas em lactação alimentadas *ad libitum*, é possível melhorar o desempenho reprodutivo (AMARAL-PHILLIPS et al., 2002), além de minimizar distúrbios digestivos que poderiam ocorrer com alto consumo de concentrado, como

a acidose ruminal, e posterior evolução do quadro, como por exemplo acidose metabólica ou até mesmo quadros de laminite. Isso é possível pois a dieta total impede a maior disponibilidade de alimentos altamente fermentáveis no rúmen e quedas bruscas no pH ruminal, ou ausência de nutrientes por baixa ingestão (DEVRIES et al., 2005).

Portanto, a mistura realizada com volumoso dificulta a seleção do alimento pelos animais e permite o consumo uniforme dos alimentos (COPPOCK, 1977). Sendo assim, o animal se alimenta com a mesma proporção de volumoso e concentrado, o que garante a ingestão homogênea de nutrientes presentes na dieta total, resultando em maior produtividade (SNOWDON, 1991).

A dieta total pode proporcionar maior consumo de matéria seca (CMS) e maior valor nutricional (DEVRIES et al., 2005). Coppock (1977) descreve que, além do aumento do CMS, esta forma de apresentação da dieta está relacionada com aumento na PL. No entanto, para o ideal fornecimento da dieta total, é importante certificar-se de que haja distribuição homogênea do alimento pelo cocho, diminuindo assim a seleção de alimentos pelos animais (SCHINGOETHE, 2017).

As exigências nutricionais dos animais podem ser efetivamente supridas pela alimentação tanto na forma de dieta total como na forma de ingredientes individuais (NRC, 2001). No entanto, a dieta total permite a combinação de todos os ingredientes juntos formando uma dieta total baseado na quantidade prescrita de cada um deles. O sistema de alimentação *ad libitum* na forma de dieta total tem como objetivo tornar a fermentação ruminal mais uniforme aproveitando melhor os nutrientes em relação quando são fornecidos ingredientes separados (COPPOCK et al., 1981; NRC, 2001) minimizando a ocorrência de transtornos digestivos, situação a qual os animais poderão se alimentar várias vezes ao longo do dia, evitando longos períodos de alimentação e ingestão de grandes quantidades promovendo boa saúde do trato gastrointestinal (TGI) e do animal (HERNANDEZ-URDANETA et al., 1976; KEADY et al., 2001; KEUNEN et al., 2002; DEVRIES et al., 2005).

White et al. (2002) avaliaram o desempenho total da lactação de vacas leiteiras em dois diferentes sistemas de alimentação, pastagem e confinamento, e observou que as vacas alimentadas à pasto produziram 11,1% menos leite em relação às vacas confinadas que receberam dieta total. Resultados semelhantes foram relatados por Rust et al. (1995) e Kolver e Muller (1998), que observaram que vacas alimentadas com dieta total em confinamento produziam mais leite em relação às vacas alimentadas à pasto.

Fontaneli et al. (2005) relataram um aumento de 19% na PL dos animais que recebiam dieta total e eram confinados em relação aos animais que eram alimentados na forma de pastejo (29,8 vs. 25,1 kg leite/dia). Mendoza et al. (2017) utilizaram a adição de forragem fresca (FF) na dieta dos animais e perceberam interesse pelo alimento em vacas leiteiras. Pastorini et al. (2019) utilizaram doze vacas em lactação e observaram os efeitos da alimentação de vacas leiteiras com níveis crescentes de FF sobre o CMS. O estudo consistiu de três tratamentos, sendo: 100% dieta total, 75% dieta total +25% FF e 50% dieta total + 50% FF. Desta forma, os animais que receberam a maior inclusão de dieta total foram que tiveram o maior CMS, sendo que estes animais foram os que produziram 8,5% a mais de leite sobre os animais de menor inclusão de dieta total.

Em um estudo comparativo de Bargo et al. (2002) foram utilizadas quarenta e cinco vacas da raça holandesa de início e média lactação, sendo realizada comparação de três sistemas de alimentação combinando pastagem e dieta total. Os três tratamentos foram: pastagem + concentrado; pastagem + fornecimento parcial de dieta total; e fornecimento apenas de dieta total. Foi observado maior CMS e maior PL para vacas alimentadas apenas com dieta total em comparação às vacas que tiveram acesso a pastagem, 26,7 kg/d vs. 23,4 kg/d e 38,1 vs. 30,2 kg leite/dia, respectivamente. Resultado semelhante foi observado por Tucker et al. (2001), que compararam a pastagem e dieta total e observaram que o CMS de vacas alimentadas com dieta total variou de 18,7 a 21,5 kg comparadas ao grupo pastagem que variou entre 16,2 a 17,2 kg. Nesse estudo também foi observado efeito benéfico na PL dos animais que receberam dieta total, a qual variou de 22,5 a 27,2 kg/dia, e houve diminuição da PL das vacas em pastagem, a qual variou de 26,6 para 15,9 kg/dia ao longo do tempo.

No entanto, embora a utilização de dieta total forneça alguns benefícios já descritos, especialmente por promover melhor desempenho produtivo dos animais, deve-se considerar alguns entraves na sua utilização. Rossow e Aly (2013) relataram que pode existir três dietas dentro de uma fazenda: a dieta formulada pelo nutricionista, baseada na composição química dos ingredientes disponíveis e dados gerais do rebanho; a dieta fornecida, em que os ingredientes são carregados no vagão, misturados e distribuído no cocho para os animais; e a dieta consumida pelas vacas.

Outro importante fator a ser considerado é o cuidado com tempo de mistura da dieta total pelo vagão, pois misturar a dieta total em tempo excessivo pode reduzir o tamanho da partícula da fibra presente na dieta total, e aumentar a ocorrência de distúrbios metabólicos (HEINRICHS et al., 1999).

Leonardi e Armentano (2003) ressaltaram que a dieta total consumida pelas vacas leiteiras no cocho pode não apresentar a mesma composição nutritiva da formulada e/ou fornecida, o que pode ser considerado a desvantagem da utilização da dieta total. Se cada etapa de preparação da dieta total não seguir todos os procedimentos corretamente, o resultado será uma dieta total de baixa qualidade, que impede a observação da resposta esperada em relação à produtividade das vacas (SOVA et al., 2013).

Além disso, Mikus (2012) destaca a variabilidade existente na produção da dieta total, resultado da variabilidade de nutrientes, deterioração dos nutrientes que compõem a dieta total, condição de equipamentos de mistura e ordem de colocação e mistura dos ingredientes no vagão. A variação na composição da dieta total pode variar também em relação à MS, o que depende principalmente do volumoso utilizado (MCBETH et al., 2013).

Diante dos fatores expostos, Stone (2008) relata que sempre devem ser realizadas medidas preventivas para reduzir a variabilidade da dieta total ofertada, seja ela através de realização de análises regulares dos alimentos que compõem a dieta total ou de treinamento adequado dos profissionais que são responsáveis pelo preparo e fornecimento da dieta total aos animais, garantindo assim a produtividade dos animais (SOVA et al., 2014).

4.2 FREQUÊNCIA DE ALIMENTAÇÃO

Um importante fator na produção leiteira a ser levado em consideração é a mão de obra operacional e os custos associados à alimentação de vacas leiteiras, a qual constitui fração importante do total de custos variáveis da produção (SHAVER, 2002). Sendo assim, a gestão prudente dos custos da alimentação pode gerar impacto significativo sobre a rentabilidade e sustentabilidade do sistema de produção (WHITE et al., 2002). Atualmente os sistemas de produção leiteira baseiam-se em horários convencionais de fornecimento da dieta total, a qual é fornecida geralmente duas ou três vezes ao dia, devido à ocorrência de deterioração da dieta total se fornecida somente uma vez ao dia. No entanto, a fim de se reduzir custos trabalhistas muitos produtores optam por alimentar os animais somente uma vez por dia (DEVRIES et al., 2005; LEONARDI et al., 2005).

Realizar alimentação somente uma vez ao dia para vacas em lactação pode resultar em distúrbios metabólicos dos animais (SHAVER, 2002) devido ao consumo de alimentos potencialmente deteriorados (KUNG JR et al., 2003). Sugere-se realizar aumento da frequência de alimentação ao longo do dia utilizando a dieta total, dessa maneira há um estímulo para que

os animais se alimentem mais vezes durante o dia minimizando problemas de saúde aumentando a PL (NRC, 2001). Devries et al. (2005) relatam que o fornecimento da dieta total mais vezes para os animais promove um estímulo de consumo, aumentando a atividade alimentar. Gibson (1981) relata que a alteração de um ou dois tratos por dia para quatro por dia aumenta o ganho médio diário da vaca em 16% e aumentou o consumo de alimentos em 19%.

Além disso, o fornecimento da dieta total somente uma vez ao dia pode fazer com que aumente a competição pelo alimento entre animais dispostos em lotes, causando inibição do consumo de animais subordinados, fazendo com que esses animais alterem seu tempo e comportamento de alimentação para evitar interações agressivas (MILLER e WOOD-GUSH, 1991).

O fornecimento de dieta total de 1 a 2 vezes por dia ainda é amplamente discutido, sendo um fator que desencadeia a geração de novas pesquisas a fim de determinar a melhor indicação da frequência de alimentação, pois se sabe que o fornecimento de dieta total fresca pode ter maior influência na estimulação da atividade alimentar de vacas leiteiras (DEVRIES e VON KEYSERLINGK, 2005; KING et al., 2016b). Em função disso, pesquisas estão sendo realizadas para avaliar diferenças na produtividade dos animais em relação a diferentes frequências de fornecimento da dieta total.

Alternativamente, pensando na prevenção da ocorrência de acidose ruminal aguda ou subaguda e outros tipos de problemas metabólicos, devemos fazer com que a chegada dos nutrientes no rúmen do animal ocorra de maneira uniforme ao longo do dia, o que seria possível a realização do aumento da frequência de alimentação associada a dieta total (FRENCH e KENNELLY, 1990).

Ainda, há questões em discussão relacionadas a frequência de fornecimento da dieta total e a interferência ambiental sobre a dieta total disponível no cocho dos animais ao longo do dia. Outro fator diz respeito aos animais alocados em lotes onde há competição pelo alimento fornecido, então aumentando a frequência de fornecimento da dieta total seria medida de obter alimento fresco e a vontade no cocho ao longo do dia possibilitando alimentação espontânea dos animais sem a ocorrência de interações agressivas (MENDONÇA et al., 2004). Além disso, essa discussão estende-se sobre considerações na escolha de um sistema de alimentação que devem incluir instalações habitacionais, necessidade de equipamento, tamanho de rebanho, disponibilidade de mão de obra e custos (NRC, 2001).

Os animais dominantes se alimentam tentando selecionar preferencialmente o concentrado da dieta deixando de consumir partículas maiores, como por exemplo de fibra fisicamente

efetiva, resultando em dieta desequilibrada e de pior qualidade nutricional para outros animais que posteriormente se alimentarão após os animais dominantes se alimentarem (LEONARDI e ARMENTANO, 2007; HOSSEINKHANI et al. 2008), o que pode interferir na produção de sólidos do leite e na PL das vacas (MILLER-CUSHON e DEVRIES, 2017).

Crossley et al. (2018) utilizaram em seu estudo duas frequências de fornecimento da dieta total: frequência de fornecimento baixa, que consistiu no fornecimento em duas vezes ao dia, 08h30 e 15h45; e frequência de fornecimento alta, que consistiu em seis vezes ao dia, distribuídos em intervalos de 2h entre as ordenhas 08h30, 10h30, 12h30, 15h45, 17h45 e 21h00. No entanto, concluíram que as vacas que receberam seis alimentações ao dia apresentaram menor tempo de alimentação contínua e aumento no CMS em relação aos animais que receberam somente duas alimentações ao dia. Além disso, observaram tendência para aumento da ruminação e aumento significativo para aumento da PL e teor de gordura do leite dos animais que receberam seis alimentações ao dia.

O estudo de Devries et al. (2005) comparou várias frequências de alimentação ao longo do dia para vacas em lactação em dois experimentos. No experimento 1, os tratamentos consistiam em: 1) fornecimento do alimento 1x ao dia (às 05h30) e 2) fornecimento do alimento 2x ao dia (às 05h30 e 15h15). As vacas alimentadas 2x ao dia aumentaram o tempo de alimentação em relação aos animais que receberam alimentação somente 1x ao dia. No entanto, não encontraram efeito sobre o CMS dos animais ($24,6 \pm 0,7$ vs. $24,1 \pm 0,7$ kg/d). Apesar de concluírem que as vacas que receberam alimentação 2x ao dia apresentaram maior atividade alimentar, observaram que as vacas que receberam alimentação somente 1x ao dia demoraram mais tempo para se deitar após o retorno das ordenhas inferindo que tais animais obtiveram uma melhor alimentação ao longo do dia.

No experimento 2, os tratamentos foram: 1) fornecimento do alimento 2x ao dia (às 05h30 e 15h15) e 2) fornecimento do alimento 4x ao dia (às 05h30, 11h00, 15h15 e 22h30). O tempo de alimentação diária dos animais que receberam alimentação 4x ao dia foi maior em relação aos animais que receberam alimentação 2x ao dia. Assim como no experimento 1, não foi encontrado diferença no CMS dos animais alimentados 2x ou 4x ao dia ($22,9 \pm 0,4$ vs. $22,2 \pm 0,4$ kg/d).

Hart et al (2014) avaliaram o efeito da frequência de fornecimento da dieta total sobre os padrões de comportamento e produtividade de vacas leiteiras. A PL de cada animal foi registrada e o comportamento alimentar foi monitorado. Os dados de comportamento alimentar foram obtidos através de cada visita do animal ao cocho de alimentos e registrado o tempo de

alimentação do animal, quantidade de alimento ingerido através da pesagem do alimento presente no cocho bem como os dados de ruminação diária dos animais. Os tratamentos consistiram no fornecimento da dieta total em: (1) somente 1x ao dia (14h00), (2) 2x ao dia (14h00 e 22h00), e (3) 3x ao dia (14h00, 22h00, e 06h00). Observaram como resultado que o CMS variou diante da frequência de fornecimento do alimento, tendo um maior CMS dos animais alimentados 3x ao dia (27,8 kg/d), em comparação com os animais alimentados 2 x/d e 1 x/d.

Devries et al. (2009) observaram que ao ofertar a dieta total apenas uma vez, os animais podem perder o interesse em se alimentar, mas também observaram que quando os animais retornam da ordenha há estímulo pela atividade alimentar. Além disso, somente pelo fato de realizar qualquer procedimento no cocho dos animais, como passar empurrando o alimento com algum tipo de maquinário ocorre estímulo para a alimentação (MCCOY et al, 1966).

No entanto, o fato de ofertar dieta total somente uma vez ao dia, causa uma exposição prolongada do alimento ao ambiente que está presente no cocho em contato com oxigênio, umidade e saliva dos animais que estão se alimentando. Tais condições são consideradas propícias para ação dos microrganismos presentes na dieta total, além da presença de substrato para utilizar em favor de sua multiplicação, causando processo de deterioração da dieta total e dos nutrientes presentes, fazendo com que os animais se alimentem de alimento deteriorado e de má qualidade nutricional (DEVRIES et al., 2003a; GHELLER et al., 2020).

O que justifica a realização de pesquisas para encontrar alternativas ou aditivos para serem utilizados junto a dieta total quando se reduz a frequência de alimentação e tem como objetivo inibir a multiplicação microbiana diminuindo o processo de deterioração da dieta total quando exposta ao longo do dia no cocho garantindo que o animal tenha acesso a alimento de qualidade (DEVRIES e KEYSERLINGK, 2005).

4.3 ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os AO são utilizados tanto na produção animal quanto na produção de alimentos para seres humanos. A produção de tais alimentos tem como objetivo preservar o alimento e aumentar seu tempo de vida útil, através da preservação de características organolépticas. Atuam principalmente sobre alimentos fermentados, protegendo os alimentos contra a multiplicação microbiana e fúngica, o que justifica seu uso como aditivo para os alimentos assim como para silagens (HAQUE et al., 2009). O objetivo de acidificar os alimentos com os

AO é fazer com que haja inibição da ação de microrganismos, evitando assim a deterioração dos alimentos.

São adicionados às forragens ensiladas para prevenir ou reduzir o crescimento de microrganismos indesejáveis presentes na matéria ensilada e, assim, melhorar a fermentação da silagem prevenindo o processo de deterioração (KLEINSCHMIT e KUNG, 2006; PEDROSO et al., 2010).

Os AO são compostos orgânicos com propriedades ácidas caracterizadas por grupo carboxila ($-\text{COOH}$), que em sua estrutura química é composta de carbono. Os AO podem ser classificados em grupos de acordo com a sua estrutura química. Portanto, a classificação pode ser feita com base no tipo de cadeia de carbono (alifático, alicíclico, aromático e heterocíclico); no tipo de insaturação (saturada e insaturada); e no número de grupos funcionais (monocarboxílico, dicarboxílico; QUITMANN et al., 2014). Os AO possuem fortes propriedades antimicrobianas e antifúngicas, principalmente os ácidos propiônico, benzóico e sórbico. Esses AO têm sido amplamente utilizados para melhorar a EA da silagem (KLEINSCHMIT et al., 2005).

Os AO por sua vez atuam de forma a inibir a ação do microrganismo no alimento, ou até levá-lo à morte. Ao entrar em contato com o microrganismo no alimento, os AO atravessam a sua membrana celular na forma não dissociada e, no citoplasma, liberam hidrogênio promovendo redução do pH citoplasmático (HAQUE et al., 2009). Para que haja homeostase, a célula gasta energia em forma de ATP, o que reduz a disponibilidade de energia para seu crescimento, fazendo com que a célula pare de crescer, reduza de tamanho ou morra (LAMBERT e STRATFORD, 1999).

Pensando nesta hipótese, um dos principais aditivos utilizados devido à sua ausência de toxicidade para os ruminantes, além da grande disponibilidade do mercado, são os inoculantes bacterianos. O objetivo de utilizar tais inoculantes como aditivos nas silagens é fazer com que haja rápida produção de ácidos, principalmente ácido lático, promovendo queda do pH da massa ensilada, o que resulta na inibição da ação de bactérias indesejáveis. Com isso, torna-se o processo fermentativo mais eficiente, tendo por finalidade diminuir as perdas da silagem por deterioração e obter um alimento de melhor qualidade nutricional (DRIEHUIS et al., 2001; KUNG JR et al., 2003).

Inoculantes bacterianos homofermentativos utilizam os hidratos de carbono solúveis presentes na matéria ensilada durante o processo fermentativo resultando em água e AO,

particularmente ácido láctico, que acidifica rapidamente a silagem e inibe o crescimento e multiplicação de bactérias indesejáveis (ZOPOLLATTO et al., 2009).

Kung e Muck (1997) observaram resultados de estudos realizados com o uso de inoculantes homofermentativos entre os anos de 1990 a 1995, e através da análise dos 221 experimentos realizados, observaram que em 60% dos casos houve diminuição do pH e maior predisposição a fermentação láctica. Além disso, dos estudos avaliados, 47% destes tiveram aumento significativo na PL, também uma melhor produtividade e ganho de peso dos animais em 53% dos casos, e melhora no CMS e digestibilidade da MS.

Um estudo realizado por Rotz e Muck (1994) revelou uma melhora da fermentação das silagens de milho em 40%, além de melhorar a fermentação da silagem de alfafa em 75% e das silagens de gramíneas em 71%. Como principais resultados dos estudos avaliados que obtiveram melhor fermentação das silagens, observaram melhor produtividade dos animais em ganho de peso, ingestão de MS e PL.

Os inoculantes heterofermentativos, por sua vez, compreendem as bactérias que fermentam os carboidratos solúveis e dão origem ao ácido láctico, juntamente com outros compostos como o dióxido de carbono, ácido propiônico, ácido acético e etanol, que compõem os produtos finais da fermentação e possuem a propriedade antifúngica. Com isso, inibem o crescimento e deterioração dos alimentos pelos fungos (HUISDEN et al., 2009; SUCU et al., 2011).

Esses tipos de inoculantes bacterianos são utilizados no momento da ensilagem da forragem, levando a um bom processo fermentativo da silagem trazendo resultados positivos sobre a fermentação, o que leva a produto final de melhor qualidade (KUNG e MUCK, 1997; RODRIGUES et al., 2002). Diante disso, mesmo com a utilização de inoculantes no momento da ensilagem, outro fator predisponente de deterioração da silagem é a deterioração aeróbia, que ocorre após a abertura do silo (GIMENES et al., 2006).

Ademais, estudos estão sendo realizados com a adição de AO na dieta total para que ocorra a prevenção da deterioração da silagem até o momento da alimentação dos animais, e para que haja melhoria da EA, evitando o fornecimento de alimentos deteriorados e, portanto, de melhor qualidade nutricional (KUNG et al. 1998). Desta maneira, pode-se garantir que os animais tenham acesso a alimentos de qualidade, com menores perdas de nutrientes e de suas características organolépticas, favorecendo o consumo e melhorando a produtividade e o desempenho animal (MCCOY et al, 1994; KUNG et al., 2018).

Tal deterioração ocorre em situações em que as silagens são expostas ao ar. Após a abertura do silo, os microrganismos oportunistas iniciam atividade metabólica, produzindo calor e consumindo os nutrientes que foram preservados durante a fermentação pela presença de bactérias lácticas, e que podem ser degradadas quando o silo é aberto, expondo até o fornecimento aos animais, favorecendo que haja quebra da EA mais rapidamente (WOOLFORD, 1990; KUNG JR, 2001; TAYLOR et al., 2002; DANNER et al., 2003). Essa variação é de grande importância pois a exposição da silagem ao oxigênio pode tornar o ambiente propício para que leveduras que metabolizam o ácido láctico iniciam o processo de deterioração primária da silagem, resultando em dióxido de carbono e água (WOOLFORD, 1990), e trazer consequências como perdas da matéria seca ensilada e de nutrientes, e potencial desenvolvimento de fungos produtores de micotoxinas, que podem representar riscos à saúde dos animais (BRODERICK e KANG, 1980; DRIEHUIS e OUDE ELFERINK, 2000).

Kung et al. (1998) relatam que vários conservantes químicos têm sido utilizados para prevenir a deterioração de silagens quando são expostas ao oxigênio, e assegurar EA de silagens. Além disso, relataram que dentre os ácidos graxos de cadeia curta o ácido propiônico é o possui maior atividade antibacteriana e antimicótica. Seus estudos confirmam os efeitos benéficos da adição de AO na silagem, promovendo a redução da proliferação de microrganismos, melhora da EA da silagem e diminuição na produção de toxinas (KUNG et al., 2003).

Já no estudo de Han et al. (2015), foi utilizado o ácido propiônico como aditivo em diferentes silagens, pois relataram que sua presença na matéria ensilada tem a capacidade de inibir certos tipos de leveduras que consomem o ácido láctico presente na silagem, evitando sua deterioração.

4.4 DIETA TOTAL vs FREQUÊNCIA DE ALIMENTAÇÃO vs ÁCIDOS ORGÂNICOS

A utilização de aditivos a base de ácidos orgânicos na dieta total ou na produção de silagem, tem como objetivo inibir a proliferação microbiana indesejável e assegurar a estabilidade aeróbica da silagem, preservando o valor nutricional da forragem por impedir a ocorrência de deterioração do alimento (QUEIROZ et al., 2013).

Apesar da dieta total ser descrita como um alimento completo e ter a capacidade de ser fornecida aos animais como uma fonte única de alimentação, após sua obtenção e contínua exposição ao ambiente (oxigênio, umidade e saliva dos animais no cocho), ocorre sua

deterioração. Além disso, após misturar a silagem ao concentrado, aumentam os níveis de substrato para utilização pelos microrganismos indesejáveis, potencializando o processo de deterioração da dieta total e diminuindo os nutrientes que poderiam ser aproveitados pelos microrganismos ruminais (AMARAL-PHILLIPS et al., 2002).

Associando a utilização da dieta total com estratégias de alimentação obtemos vantagens, a principal delas é a redução de custos de produção com a redução da frequência de alimentação (GRETER, 2013), redução de mão de obra e utilização de maquinários (PAZDIORA et al., 2011), além de aumentar a eficiência de alimentação dos animais (HOFFMAN et al., 2007). Diante disso, a redução da frequência de alimentação faz com que a dieta total fique exposta ao ambiente por mais tempo estando propensa ao processo de deterioração (KITTS et al., 2011). Relacionado a este processo, Kung et al. (1998) descrevem a associação da utilização de AO no alimento como uma forma de proporcionar a diminuição da sua deterioração e permitir a redução da frequência de fornecimento do alimento sem diminuição da produtividade.

Mills e Kung (2002) relataram que a deterioração do alimento ocasionada por microrganismos indesejáveis ocasiona baixa digestibilidade da MS, devido à degradação dos nutrientes solúveis prontamente disponíveis. Kung et al. (2018) comprovaram que presença de concentrações de ácido acético na silagem pode ter efeito benéfico, pois inibe a ação de leveduras e possui fortes características antifúngicas, resultando em maior estabilidade aeróbica quando a silagem é exposta ao ambiente. Nessas condições, se houver baixas concentrações dos ácidos, a silagem torna-se instável à presença de oxigênio e susceptível à deterioração, o que é agravado quando o alimento é fornecido somente uma vez ao dia, sem algum tipo de aditivo que previna a deterioração e assegure a preservação dos nutrientes até o momento do consumo pelos animais.

Ademais, quando se reduz a frequência de fornecimento do alimento e o mantém por mais tempo no cocho sem a utilização de aditivo que possa prevenir a ação de microrganismos, aumenta-se a susceptibilidade à deterioração e perda de qualidade (HOFFMAN e OCKER, 1997). Além da perda econômica causada pela deterioração do alimento, animais que fazem a ingestão de alimento deteriorado diminuem a eficiência de utilização dos nutrientes que estão consumindo, o que leva à queda da produtividade dos animais e perdas econômicas (WHITLOCK et al, 2000). Sendo assim, faz-se necessário um planejamento da frequência de fornecimento do alimento para os animais, o que envolve os horários ideais de fornecimento, planejamento de retirada da silagem do silo e mistura da silagem com os outros ingredientes da dieta no vagão misturador (KUNG, 2005). Através do uso de aditivos para controlar a

proliferação de microrganismos na dieta total e prevenir a deterioração, ou do aumento da frequência de fornecimento do alimento aos animais a fim de evitar tempo excessivo de exposição ao ambiente, é possível promover melhor produtividade dos animais e redução de custos da fazenda.

Hart et al. (2014) afirmam que realizar frequência de fornecimento do alimento de 2 a 3 vezes ao dia é o ideal na produção leiteira, pois quando há manipulação à frente do cocho dos animais, ocorre um estímulo para alimentação, principalmente quando há o fornecimento do alimento fresco várias vezes ao dia. DEVRIES et al. (2005) relatam que a frequência de fornecimento do alimento para as vacas influencia no comportamento alimentar, saúde metabólica e produtividade. Além disso, preparar a dieta total e fornecer pequenas quantidades várias vezes ao dia é uma estratégia de fornecimento de alimento de alta qualidade nutricional (DEVRIES et al., 2003a), de forma a assegurar que o alimento tenha o menor tempo de exposição ao ambiente diminuindo a deterioração e a quebra da EA (KUNG, 2005).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 LOCAL E ANIMAIS

O experimento foi conduzido de outubro a dezembro de 2018, nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL), pertencente ao Departamento de Nutrição e Produção Animal, da Universidade de São Paulo, Campus USP “Fernando Costa”, Pirassununga, Brasil. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (protocolo número 9187220119).

Foram utilizadas 24 vacas da raça Holandesa em lactação, sendo 4 delas canuladas no rúmen, com 247 ± 109 (média $\pm$ desvio padrão) dias em lactação (DEL), $672 \pm 71,6$ kg de peso corporal (PC), e $31,1 \pm 5,37$ kg de produção diária de leite (PL). As vacas foram alojadas em estábulo tipo “free-stall”, em baias individuais com $17,5 \text{ m}^2$, contendo cama de areia, ventilação forçada e livre acesso a água e alimentos. A temperatura diária do galpão experimental, umidade relativa do ar e índice de temperatura-umidade foram $26,1 \pm 4,8$ °C, $75,0 \pm 16,39$ % e $72,7 \pm 5,31$, respectivamente durante o período experimental.

5.2 DIETA E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A composição química dos ingredientes utilizados na dieta experimental está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição química dos ingredientes utilizados na dieta experimental

Item	Ingredientes				
	Milho moído	Farelo de soja	Grão de soja	Polpa Cítrica	Farelo de soja Bypass ¹
<i>Composição química, g/kg MS</i>					
Matéria seca (%MN)	87,79	88,31	90,11	89,68	88,81
Matéria orgânica	98,11	93,47	94,80	92,30	93,30
Carboidratos-não-fibrosos ²	72,60	31,06	9,92	46,65	22,47
Amido	71,77	4,45	4,40	8,19	4,58
Fibra em detergente ácido	4,45	11,02	18,90	22,66	13,96
Fibra em detergente neutro	14,74	19,50	37,91	31,01	32,07
Lignina	1,03	0,52	3,93	2,71	0,89
Proteína insolúvel em detergente neutro	2,46	4,84	12,37	2,21	14,09
Proteína insolúvel em detergente ácido	0,66	1,75	2,67	2,33	4,84
Proteína bruta	9,33	46,31	39,11	14,73	50,30
Extrato etéreo	4,90	1,45	20,23	2,12	2,56
Nutrientes digestíveis totais ³	87,11	80,29	91,71	70,62	74,27
Energia líquida de lactação (Mcal/kg MS) ⁴	2,01	1,80	2,13	1,61	1,70

¹Farelo de soja Bypass (Soypass®, Cargill, Uberlândia, Brasil).

²Estimado segundo Hall (2000).

³Estimado de acordo com NRC (2001).

⁴De acordo com Weiss et al. (1992).

Fonte: Dias (2020).

A dieta experimental utilizada foi formulada de acordo com as recomendações do NRC (2001), na proporção volumoso:concentrado de 48:52 para vacas em lactação, com 52 meses

de idade, 620 kg de peso corporal, 3,5% de gordura no leite, 220 dias em lactação, 33 kg/d de produção diária de leite e 3,3% de proteína no leite.

A dieta total foi preparada individualmente e fornecida manualmente uma ou duas vezes ao dia, de acordo com o tratamento definido, somente às 07h00 (AO1x ou C1x), ou às 07h00 e às 13h00 (AO2x ou C2x). A dieta total foi ofertada e misturada manualmente, e, da mesma maneira foram adicionados os AO (Mold-Zap[®]), nos tratamentos (AO1x) e (AO2x) e a água destilada nos tratamentos (C1x) e (C2x) e misturados manualmente.

Foi utilizado o delineamento experimental em quadrados Latinos, balanceados e contemporâneos. De acordo com a PL, DEL e parição, as vacas foram distribuídas em 6 quadrados Latino 4 x 4, seguindo esquema fatorial 2 x 2 e atribuídas aleatoriamente a um dos tratamentos, sendo: 1) controle 1 (C1x), dieta basal, ofertada uma vez ao dia, pela manhã (7h00); 2) AO (Mold-Zap[®]) 1, (AO1x), dieta basal associada aos AO (Mold-Zap[®]), ofertada uma vez ao dia, pela manhã (7h00); 3) controle 2 (C2x), dieta basal, ofertada duas vezes ao dia, pela manhã (7h00) e no início da tarde (13h00); e 4) AO (Mold-Zap[®]) 2, (AO2x), dieta basal associada aos AO (Mold-Zap[®]), ofertada duas vezes ao dia, pela manhã (7h00) e no início da tarde (13h00).

Os AO (Mold-Zap[®]) foram previamente diluídos em 10% de água destilada diariamente nos tratamentos (AO1x) e (AO2x), na dose de 500 mL da solução de AO (Mold-Zap[®]) a 10% para cada 100 kg de matéria natural (MN) ofertada. Já os tratamentos (C1x) e (C2x) receberam solução placebo de água destilada equivalente ao volume do aditivo ofertado. Os AO (Mold-Zap[®]) foram adicionados de forma manual diretamente na dieta total ofertada presente dentro do cocho dos animais, imediatamente antes da entrada dos animais dentro da baia para se alimentar. O aditivo utilizado apresenta em sua composição o ácido propiônico (55%) e o hidróxido de amônia (12%) como ingredientes ativos. Cada período experimental teve duração de 21 dias, sendo 14 dias destinados à adaptação aos tratamentos e 7 dias às coletas de dados e amostras. Além disso, foi realizada uma mistura da dieta total presente no cocho de forma manual todos os dias no início da tarde, às 13h00, (mesmo para as vacas dos tratamentos que eram ofertados uma única vez ao dia), e no final da tarde, às 17h00. Todos os animais foram ordenhados mecanicamente às 06h00 e às 16h00 diariamente. Na Tabela 2, estão caracterizados os ingredientes e a composição química da dieta experimental utilizada no experimento.

Tabela 2 – Ingredientes e composição química da dieta experimental

Item	Silagem de Milho	Concentrado	Dieta Experimental
<i>Ingredientes, g/kg MS</i>			
Silagem de milho ¹	1000		480
Milho moído		352	218
Farelo de soja, 46% PB		265,7	146
Grão de soja cru integral		124,4	47,0
Polpa cítrica		157,6	62,1
Farelo de soja Bypass ²		40,8	17,9
Premix mineral ³		24,8	12,9
Bicarbonato de sódio		15,8	7,0
Calcário		14,0	7,0
Sal		5,0	2,0
<i>Composição química, g/kg MS</i>			
Matéria seca (% MN)	303,4	888,5	460,8
Matéria orgânica	957,0	895,1	924,8
Carboidratos-não-fibrosos	371,5	412,3	392,7
Fibra em detergente neutro	492,0	227,9	354,7
Amido	292,2	312,8	302,9
Fibra em detergente ácido	308,5	109,9	205,2
Proteína bruta	84,6	254,7	173,0
Extrato etéreo	21,3	50,6	36,6
Lignina	58,9	14,5	35,8
Energia líquida de lactação (Mcal/Kg MS)	1,44	1,76	1,61
Proteína insolúvel em detergente neutro, %PB	12,4	50,46	32,2
Proteína insolúvel em detergente ácido, %PB	9,65	16,0	12,9

¹Composição bromatológica média durante período experimental: 30,34 g/kg MS, 8,46 g/kg PB, 2,13 g/kg EE, 49,20 g/kg FDN, 30,85 g/kg FDA, 37,15 g/kg CNF e 62,36 g/kg de NDT.

²Farelo de soja Bypass (Soypass®, Cargill, Uberlândia, Brasil).

³Cada kg continha: 235 g de Ca, 60 g de P, 20 g de Mg, 70 g de Na, 20 g S, 15 mg de Co, 700 mg de Cu, 10 mg de Cr, 40 mg de I, 600 mg de Fl, 1600 mg de Mn, 20 mg de Se, 2500 mg de Zn, 200000 UI de Vitamina A, 50000 UI de Vitamina D3, e 1500 UI de Vitamina E.

*Separador de partículas (g/kg MN): > 19 mm: 155,86; 19 – 8 mm: 325,68; 8 – 4 mm: 180,78; < 4 mm: 337,68.

Fonte: Dias (2020).

As análises bromatológicas e de composição do leite foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do LPBL. As demais análises foram realizadas nas dependências do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal (LBFA) do VNP e no Laboratório de Nutrição e Reprodução Animal (LNRA), da Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP). O consumo de matéria seca (CMS) foi registrado e a oferta ajustada diariamente visando manter a porcentagem de sobras entre 5 e 10% da quantidade total de MN ofertada.

5.3 CONSUMO E DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL DA MATÉRIA SECA E NUTRIENTES

O consumo de matéria seca e nutrientes foi obtido pela diferença entre o fornecimento de MS e nutrientes e a quantidade destes presentes nas sobras. Nos últimos sete dias de cada período experimental, foram coletadas amostras diárias da silagem de milho e das e sobras individuais, que foram congeladas para posteriores análises bromatológicas como amostra composta animal/período. Durante este período também foram coletadas amostras dos ingredientes utilizados na preparação do concentrado na fábrica de ração durante a preparação em cada período de coleta (milho moído, farelo de soja, grão de soja, soypass, polpa cítrica e núcleo mineral).

A digestibilidade aparente total da MS e dos nutrientes e a quantidade total de MS fecal excretada foram estimadas pela concentração de fibra insolúvel em detergente neutro indigestível (FDNi). Amostras de fezes foram coletadas diretamente do reto das vacas a cada 9 horas nos dias 17º, 18º e 19º de cada período experimental, totalizando 8 amostras de fezes por vaca/período, sendo acondicionadas em sacos plásticos, congeladas a -20°C, com o objetivo de, ao final de cada período de coleta, obter única amostra composta por animal por período formando um *pool* representativo por um intervalo de 3 horas em período de 24 horas para retirar o efeito da variação diária na excreção.

As amostras de alimentos, sobras e fezes foram secas em estufa de ventilação forçada, à 55°C, por 72 horas, e processadas em moinhos de facas (MA340, Marconi, Piracicaba, Brasil) em peneiras com poros de 1 mm e 2 mm. Amostras com tamanho de 1 mm foram analisadas quanto ao teor de matéria seca (método 930.15; AOAC, 2000), proteína bruta ($N \times 6,25$; Kjeldahl método 984.13; AOAC, 2000), extrato etéreo (método 920.39; AOAC, 2000), fibra insolúvel em detergente ácido e lignina (método 973.18; AOAC, 2000), cinzas (método 942.05;

AOAC, 2000) e fibra insolúvel em detergente neutro usando alfa-amilase (UNDERSANDER et al., 1992) sem a adição de sulfito de sódio (analisador de fibra TE-149, Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil). Amostras de alimentos foram analisadas também quanto ao teor de amido através de degradação enzimática (Amyloglucosidase®, Novozymes, Curitiba, PR, Brasil) e determinadas em espectrofotômetro semiautomático (SBA-200, CELM®, São Caetano do Sul, SP, Brasil), de acordo com Hendrix (1993).

Para determinação da quantidade total de MS fecal excretada e da digestibilidade aparente total da MS e dos nutrientes, utilizou-se o FDNi como indicador interno. Para obtenção deste, as amostras moídas em peneira com poro de 2 mm foram utilizadas 4 repetições de cada amostra e foram acondicionadas em sacos de tecido não tecido com dimensões de 5 × 5 cm (TNT; CASALI et al. (2008)), e incubadas no rúmen de duas vacas holandesas no período seco durante 288 horas, segundo Huhtanen et al., (1994). Após o período de incubação, as amostras foram lavadas em água corrente fria e posteriormente analisadas quanto ao seu teor de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN), conforme descrito anteriormente. Assim, foi obtido o teor de FDNi e calculada a excreção fecal (EF) através da equação:

$$EF \left(\frac{\text{kg}}{\text{dia}} \right) = \frac{\text{FDNi ingerido} \left(\frac{\text{g}}{\text{dia}} \right)}{\text{FDNi excretado} \left(\frac{\text{g}}{\text{kg}} \right)}$$

A digestibilidade da MS e de cada nutriente foi calculada a partir da ingestão do nutriente, concentração do mesmo nas fezes e excreção fecal e, segundo as fórmulas:

$$\text{Digestibilidade MS (\%)} = 100 - \left[100 \times \left(\frac{\% \text{ FDNi ingerido}}{\% \text{ FDNi nas fezes}} \right) \right]$$

$$\begin{aligned} \text{Digestibilidade nutriente (\%)} = 100 - & \left[100 \times \left(\frac{\% \text{ consumo de FDNi}}{\% \text{ FDNi nas fezes}} \right) \right] \\ & \times \left(\frac{\% \text{ nutriente nas fezes}}{\% \text{ consumo de nutrientes}} \right) \end{aligned}$$

Os nutrientes digestíveis totais (NDT) da dieta foram calculados de acordo com as equações do NRC (2001), pela fórmula:

$$\text{NDT}_{1X}(\text{g/kg}) = \text{dvCNF} + \text{dvPB} + (\text{dvAG} \times 2,25) + \text{dvFDN},$$

sendo dv = digestibilidade verdadeira dos nutrientes; CNF = carboidratos não-fibrosos; PB = proteína bruta; AG = ácidos graxos; FDN = fibra em detergente neutro.

A energia líquida de lactação (EL_L , Mcal/kg MS) foi calculada de acordo com Weiss et al. (1992), sem correção para o fator de processamento para a correção da estimativa da digestibilidade dos CNF, por meio da fórmula:

$$EL_L \text{ (Mcal/kg)} = (0,245 \times NDT_{1X}) - 0,12$$

Os CNF foram calculados de acordo com Hall (2000):

$$CNF(\%) = 100 - [(PB - PB \text{ da ureia}) + ureia + FDN + EE + cinzas]$$

5.4 COMPORTAMENTO ALIMENTAR

Os dados de comportamento alimentar foram coletados das 06h00 do 14º até as 06h00 do 16º dia de cada período experimental. Os animais foram observados durante 48 horas, em intervalos de 5 minutos, utilizando-se cronômetros digitais. No período noturno foi mantida baixa intensidade luminosa dentro da instalação para que os observadores pudessem visualizar os animais nas baias, sem interferir no comportamento natural dos animais. Dentre as atividades que foram observadas estão: períodos de alimentação; animal deitado ou em pé; e períodos de ingestão de água (SILVA et al., 2016). A ruminação (minutos por dia) foi registrada automaticamente por colares acoplados aos animais (HealthyCow 24® Solution, SCR Allflex, Netanya, Israel). A partir destes dados, foram calculados os índices de ruminação, ócio [24h – (consumo + alimentação + ordenha)], e mastigação (ruminação + alimentação).

5.5 ÍNDICE DE SELEÇÃO DE PARTÍCULAS

Amostras de dieta total foram coletadas nos dias 16º e 17º de cada período experimental, enquanto as de sobras foram coletadas ao 17º e 18º dia de cada período experimental para a distribuição do tamanho de partículas usando sistema separador de partículas com peneiras estratificadoras (Penn State Particle Separator – Nasco, Fort Atkinson, WI, USA), composto por quatro peneiras (P1 = retenção de partículas maiores do que 19 mm; P2 = retenção de partículas entre 19 e 8 mm; P3 = retenção de partículas entre 8 e 4 mm e P4 = com fundo fechado, a qual retém partículas com diâmetro inferiores a 4 mm), como descrito por Kononoff et al. (2003). Foi calculado o índice de seleção de partículas de acordo com Silveira et al. (2007), sendo que o consumo efetuado pelos animais correspondentes a cada peneira (P1 a P4) foi expresso pela porcentagem do consumo total predito, através das fórmulas:

$$\begin{aligned}\text{Consumo esperado } \left(\frac{\text{kg}}{\text{dia}}\right) &= \text{consumo } \left(\frac{\text{kg MN}}{\text{dia}}\right) * P_{\text{dieta total}} \left(\frac{\text{kg}}{\text{kg}}\right) \\ \text{Consumo observado } \left(\frac{\text{kg}}{\text{d}}\right) &= \left[\text{oferta } \left(\frac{\text{kg}}{\text{d}}\right) * P_{\text{TMR}} \left(\frac{\text{kg}}{\text{kg}}\right)\right] - \left[\text{sobras } \left(\frac{\text{kg}}{\text{d}}\right) * P_{\text{Sobras}} \left(\frac{\text{kg}}{\text{kg}}\right)\right] \\ \text{Índice de seleção} &= \frac{\text{consumo observado } \left(\frac{\text{kg}}{\text{d}}\right)}{\text{consumo esperado } \left(\frac{\text{kg}}{\text{d}}\right)}\end{aligned}$$

onde, $P_{\text{dieta total}}$ é o tamanho de partícula da dieta total, e P_{Sobras} é o tamanho de partícula das sobras. O índice de seleção igual a 1 significa ausência de seleção, quando < 1 indica seleção contrária ao tamanho de partícula e se > 1 , mostra que vacas preferiram tamanho específico de partícula.

5.6 FERMENTAÇÃO RUMINAL

No 20º dia de cada período experimental, amostras de conteúdo ruminal das quatro vacas canuladas foram coletadas de cinco pontos distintos do rúmen, nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, e 16 horas em relação a alimentação matinal. Em cada coleta o conteúdo ruminal (aproximadamente 250 mL) obtido foi filtrado através de pano dessorador e, homogeneizado para obtenção do líquido ruminal (aproximadamente 50 mL) que foi imediatamente submetido à avaliação de pH em pHâmetro digital (MB-10, Marte Científica®, Santa Rita do Sapucaí, Brasil). E uma alíquota de cada tempo foi congelada para posterior análise de N-NH₃ e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).

Previamente as amostras de líquido ruminal (aproximadamente 50 mL) foram centrifugadas a $3,000 \times g$ por 15 min à temperatura ambiente e 1800 µL do sobrenadante foram pipetados em *eppendorf* juntamente com 100 µL de ácido orto-fosfórico a 1M para determinação de AGCC. Outros 900 µL do sobrenadante de cada uma das amostras foram pipetados juntamente com 400 µL de ácido sulfúrico (1N) para determinação do nitrogênio amoniacal (N-NH₃). As amostras foram congeladas para análises posteriores.

Para as análises de AGCC, as amostras foram injetadas automaticamente pelo sistema injetor, 1 µL em cromatógrafo gasoso (CG HP 7890A; Injetor HP 7683B, Agilent Technologies) equipado com coluna capilar HP-FFAP (1909F-112; 25 m; 0,32 mm; 0,5 µm; JeW Agilent Technologies). O gás de arraste utilizado foi o H₂, mantido em fluxo de 31,35 mL/min. A temperatura do injetor e detector foi de 260°C. O tempo total da análise cromatográfica foi de 16,5 minutos, dividido em três rampas de aquecimento: 80°C (1min),

120°C (20°C/min; 3min) e 205°C (10°C/min; 2 min) (FERREIRA et al.,2016). A concentração dos AGCC (mM) foi determinada com base em uma curva de calibração externa (FERREIRA et al., 2016). A concentração dos AGCC (mM) foi determinada com base em uma curva de calibração externa.

O N-NH₃ foi determinado pelo método de ácido salicílico. Foram adicionados às amostras previamente preparadas com ácido sulfúrico a 1N, 400 µL de tungstato de sódio a 10% e posteriormente as amostras foram centrifugadas a 1,200 × g durante 15 minutos. Em seguida, foram pipetados 5 µL do sobrenadante em microplaca e adicionados 100 µL do reagente de trabalho (ácido salicílico – obtido no kit Bioclin[®], ref. K047, Belo Horizonte, MG, Brasil, com ausência da enzima urease), e em seguida a microplaca foi colocada em banho maria a 37 °C durante 5 minutos. Logo após, foram adicionados 100 µL do reagente oxidante (hipoclorito de sódio – obtido no kit Bioclin[®], ref. K047). Novamente, a microplaca foi colocada em banho maria a 37 °C durante 5 minutos, adquirindo a coloração verde. Após isso, foi realizada a leitura em leitor de microplacas (Biochrom Asys UVM 340 Microplate Reader, Biochrom[®], Cambridge, RU) em absorvância de 540 nm. Os resultados obtidos foram utilizados em equação de regressão para calcular a concentração de N-NH₃.

5.7 SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA E BALANÇO DE NITROGÊNIO

A estimativa da síntese de proteína microbiana foi mensurada a partir da quantificação dos derivados de purinas na urina e no leite, de acordo com metodologia descrita por Chen e Gomes (1992), considerando-se a absorção de purinas a partir da fórmula sugerida por Gonzalez-Ronquillo et al. (2003).

Amostras de urina (100 mL) foram obtidas de todas as vacas, de 9 em 9 horas, do 17º ao 19º dia de cada período experimental, após micção estimulada por massagem na vulva, totalizando 8 amostras de urina por vaca por período, de modo a formar um único *pool* representativo de 24h, retirando o efeito da variação diária na excreção urinária. Imediatamente após a coleta, a urina foi diluída, retirando-se alíquotas de 10 mL que foram diluídas em 40 mL de ácido sulfúrico a 0,036N, para evitar destruição bacteriana dos derivados de purinas (DP) e a precipitação do ácido úrico, sendo então congeladas para posteriores análises dos teores de creatinina, ácido úrico, alantoína e N total.

O volume total de urina foi estimado de acordo com Chizzotti et al. (2008), e a concentração de N na urina será determinada de acordo com AOAC (método 984.13, AOAC,

2000), sendo sua excreção urinária diária estimada a partir da concentração urinária de creatinina, considerando uma excreção diária de 0,212 mmol de creatinina por kg de peso corporal (CHIZZOTTI, 2004). A excreção total de derivados de purinas foi calculada pela soma das quantidades molares de alantoína e ácido úrico na urina e de alantoína no leite. As concentrações de creatinina e ácido úrico foram determinadas com kits comerciais (Bioclin® Belo Horizonte, MG, Brasil, ref K067 e ref K139 respectivamente) através de reação enzimática colorimétrica cinética em analisador bioquímico automático (SBA 200, CELM®).

Os DP absorvidos foram calculados segundo a equação:

$$DP \text{ absorvidos} = \frac{(DP - 0,385 * PC^{0,75})}{0,84}$$

Em que DP é a soma de derivados excretados, $0,512 \times PC^{0,75}$ representa a excreção endógena de DP e 0,84 a recuperação de DP absorvidos (GONZALEZ-RONQUILLO et al., 2003).

A síntese de N microbiano ruminal foi calculada usando a equação de Valadares et al. (1999).

$$N \text{ microbiano} = \frac{(70 * DP \text{ absorvidos})}{(0,83 * 0,134 * 1000)}$$

considerando 70 como a concentração de N nos DP (mg/mol), 0,134 a razão entre os DP pelo N microbiano, e 0,83 a digestibilidade intestinal das purinas.

O balanço de compostos nitrogenados foi calculado a partir da diferença entre o consumo de N (consumo PB/6,25) e o total de nitrogênio excretado no leite (PB leite/6,38), urina (método 984.13; AOAC, 2000) e fezes (excreção fecal $\times$ teor de N).

5.8 METABÓLITOS SANGUÍNEOS

No 16º dia de cada período experimental, foram realizadas coletas de amostras de sangue (10 mL), por punção dos vasos coccígeos, em tubos vacuolizados, 4 horas após a alimentação matinal. As amostras foram centrifugadas a $2,000 \times g$ por 15 minutos e o soro congelado. Foram realizadas análises de glicose e ureia através de kits de bioquímica colorimétrica (glicose: cat. n. K-082; ureia: cat. n. K-056; Bioclin®). As leituras foram realizadas em equipamento bioquímico semi-automático (SBA 200, CELM®).

5.9 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

As vacas foram ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia, às 06h00 e às 16h00, sendo a produção de cada ordenha mensurada e registrada eletronicamente (Alpro[®], DeLaval, Tumba, Sweden), durante todo o período experimental, e a produção média considerada apenas dos últimos sete dias de cada período.

Amostras de leite (300 mL) foram coletadas de acordo com a PL de cada ordenha durante os dias 16, 17 e 18 de cada período experimental. As amostras de leite foram analisadas imediatamente para as concentrações de gordura, proteína e lactose por metodologia infravermelha (Lactoscan[®], Entelbra, Londrina, PR, Brasil). Enquanto que a produção de leite foi corrigida para 3,5 % de gordura (PLCG) de acordo com Sklan et al. (1992):

$$PLC \left(\frac{kg}{dia} \right) = (0,432 + 0,1625 * \text{gordura no leite} \left(\frac{g}{100g} \right)) * PL \text{ diária}$$

Amostras de leite coletadas no 16º dia de cada período experimental foram desproteinizadas com ácido tricloroacético (5 mL de ácido tricloroacético 25%, em 10 mL de leite) de acordo com Broderick e Clayton (1997), filtradas em papel filtro e posteriormente congeladas. Essas amostras foram descongeladas e analisadas quanto ao teor de ureia utilizando kits colorimétricos de bioquímica (ureia: cat. n. K-056; Bioclin[®], Belo Horizonte, Brasil), sendo as leituras realizadas em espectrofotômetro semiautomático (SBA 200, CELM, São Caetano do Sul, Brasil), e quanto ao teor de alantoína, sendo a leitura realizada em leitor de microplaca (Biochrom Asys Microplate Reader, Biochrom[®], Cambridge, RU).

5.10 TEMPERATURA DA DIETA TOTAL

Da mesma dieta total fornecida às vacas foi separada uma fração e colocada em cochos móveis (n = 2 por tratamento por dia). A dieta total foi colocada nos cochos móveis no mesmo horário de alimentação dos animais, de acordo com o tratamento. Para os animais que receberam alimentação somente uma vez ao dia (07h00) foi fornecido 4 kg de MS e para os animais que receberam alimentação duas vezes ao dia (07h00 e 13h00) foi fornecido 2 kg de MS a cada fornecimento e os AO foram adicionados a dieta total como descrito anteriormente. Os *data loggers* (TagTemp Stick, Novus, Canoas, RS, Brasil) foram programados para registrar a temperatura do alimento a cada 2 horas durante 24 horas. Este procedimento foi repetido por dois dias consecutivos em cada período experimental onde foi realizada a avaliação da

temperatura dos cochos e a média dos dois dias foi utilizada para posteriores análises estatísticas. Os cochos utilizados para medir a temperatura da dieta total permaneceram sob o mesmo ambiente em que as vacas foram alimentadas e a temperatura ambiente foi monitorada a cada hora durante o período experimental ($26,1 \pm 4,8$ °C).

5.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados foram analisados utilizando o PROC MIXED do SAS 9.4 (SAS Institute, Cary, NC), de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijklm} = \mu + Q_i + a_{j:i} + P_k + MZ_l + F_m + MZ_l \times F_m + e_{ijklm}$$

Com: $a_{j:i} \approx N(0, \sigma_a^2)$ e $e_{ijkl} \approx N(0, \sigma_e^2)$; em que: Y_{ijklm} é o valor observado da variável dependente; μ é a média geral; Q_i é o efeito fixo de quadrado/grupo ($i = 1$ à 6); $a_{j:i}$ é o efeito aleatório de animal dentro de cada quadrado latino ($j = 1$ à 24); P_k é o efeito fixo do período experimental ($k = 1$ à 4); MZ_l é o efeito fixo da adição de Mold-Zap® ($l = 1$ e 2); F_m é o efeito fixo da frequência de alimentação ($m = 1$ e 2); $MZ_l \times F_m$ é a interação entre os efeitos da adição de Mold-Zap® e da frequência de alimentação; e_{ijklm} é o erro experimental; N indica distribuição normal (Gaussiana); σ_a^2 é a variância associada ao efeito aleatório de animal; e σ_e^2 é a variância residual.

Os dados de fermentação ruminal foram analisados de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + P_i + MZ_j + F_k + MZ_j \times F_k + \omega_{ijkl} + H_l + H_l \times MZ_j + H_l \times F_k + H_l \times MZ_j \times F_k + e_{ijkl}$$

Considerando: $a_{j:i} \approx N(0, \sigma_a^2)$, $\omega_{ijkl} \approx N(0, \sigma_\omega^2)$, e $e_{ijkl} \approx MVN(0, R)$; em que: Y_{ijkl} é o valor observado da variável resposta; μ é a média geral; P_i é o efeito fixo do período experimental ($i = 1$ à 4); MZ_j é o efeito fixo da adição de Mold-Zap® ($j = 1$ e 2); F_k é o efeito fixo da frequência de alimentação ($k = 1$ e 2); $MZ_j \times F_k$ é a interação entre os efeitos da adição de Mold-Zap® e da frequência de alimentação; ω_{ijkl} é o erro experimental das parcelas (animal em cada período experimental); H_l é o efeito fixo do tempo de coleta ($l = 1$ a 9); $H_l \times MZ_j$, $H_l \times F_k$ e $H_l \times MZ_j \times F_k$ são efeitos de interação entre os efeitos principais previamente definidos; σ_a^2 é a variância associada ao efeito aleatório de animal; e_{ijkl} é o erro experimental; N indica distribuição normal (Gaussiana); σ_ω^2 é a variância residual associada aos animais em cada período de avaliação; MVN

indica multivariada com distribuição normal; e R é uma matriz de variância e covariância devido às medidas repetidas no tempo. Foram avaliadas as matrizes: CS, CSH, AR, ARH, TOEP, TOEPH, UN e ANTE. As interações entre os efeitos da adição de Mold-Zap® e frequência de alimentação foram desmembradas utilizando o teste de diferença ínima significativa de Fisher (LSD).

Os dados de temperatura da dieta total no cocho foram analisados de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + F_j + MZ_k + \omega_{ijk} + C_l (X_{ijk} - X^-) + H_l + F_j \times H_{jl} + M \times H_{kl} + T \times M \times H_{jkl} + e_{ijkl}$$

Considerando: $\omega_{ijk} \approx N(0, \sigma_\omega^2)$, e $e_{ijkl} \approx MVN(0, R)$; em que: Y_{ijkl} é o valor observado da variável resposta; μ é a média geral; B_i é o efeito fixo de cocho ($i = 1$ a 16); F_j é o efeito fixo da frequência de alimentação ($j = 1$ a 2); MZ_k é o efeito fixo de Mold-Zap®; ω_{ijk} é o erro residual associado à unidade experimental; C_l é o efeito fixo do coeficiente de regressão; X_{ijk} é a medida covariável para cocho; X^- é a média geral das medidas covariáveis; H_l é o efeito fixo do tempo de amostragem ($l = 1$ a 12); $T \times H_{jl}$, $M \times H_{kl}$ e $T \times M \times H_{jkl}$ são as interações duplas e tripla entre frequência de alimentação, Mold-Zap® e tempo; σ_ω^2 é a variação residual associada ao cocho de alimentação em cada tempo de amostragem; e_{ijkl} é o erro experimental. N e MVN foram descritos anteriormente. As seguintes matrizes de variância-covariância foram avaliadas: CS, CSH, AR, ARH, TOEP, TOEPH, UN e ANTE. A matriz foi selecionada com base no critério baiano, utilizando o menor valor. Para todas as análises, foi considerado nível de significância de $P \leq 0,05$ e tendência foi declarada para $0,05 \leq P \leq 0,10$.

6 RESULTADOS

6.1 CONSUMO E DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL DA MATÉRIA SECA E NUTRIENTES

Não foi observado efeito sobre a ingestão de MS e nutrientes e digestibilidade aparente total da MS de vacas leiteiras alimentadas com adição de AO na dieta total ($P > 0,05$). Por outro lado, conforme descrito na Tabela 3, houve tendência no aumento do coeficiente de digestibilidade de FDN das vacas alimentadas duas vezes ao dia ($P = 0,075$).

Tabela 3 - Consumo e digestibilidade aparente total da MS e nutrientes de vacas em lactação alimentadas com adição de AO na dieta total

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	P ³		
	1x		2x			AO	F. A.	Int.
	AO-	AO+	AO-	AO+				
<i>Consumo (kg/d)</i>								
Matéria seca	25,96	26,45	25,76	26,03	0,652	0,168	0,258	0,689
Matéria orgânica	23,96	23,97	23,56	23,55	0,615	0,986	0,251	0,983
Fibra em detergente neutro	8,47	8,48	8,38	8,37	0,229	0,971	0,474	0,934
Proteína bruta	4,59	4,61	4,50	4,50	0,119	0,954	0,119	0,944
Extrato etéreo	0,99	1,00	0,98	0,98	0,024	0,932	0,137	0,829
<i>Consumo (%PC)</i>								
Matéria seca	3,85	3,86	3,77	3,78	0,104	0,922	0,172	0,975
Fibra em detergente neutro	1,26	1,26	1,24	1,24	0,035	0,985	0,319	0,967
<i>Coeficiente de digestibilidade (%)</i>								
Matéria seca	64,89	65,82	66,04	65,85	0,849	0,409	0,607	0,434
Matéria orgânica	66,82	67,62	68,04	67,39	0,932	0,922	0,536	0,360
Fibra em detergente neutro	34,27	36,84	38,83	37,32	1,475	0,708	0,075	0,146
Proteína bruta	76,14	75,97	77,47	76,51	1,540	0,621	0,409	0,729
Extrato etéreo	83,71	83,58	84,64	84,03	1,066	0,636	0,380	0,762

¹Alimentação 1x: vacas alimentadas apenas uma vez por dia às 07h00; Alimentação 2x: vacas alimentadas duas vezes por dia às 07h00 e 13h00; AO-: ausência de ácidos orgânicos na dieta; AO+: adição de ácidos orgânicos (Mold-Zap[®]) na dieta.

²Erro padrão da média.

³AO: efeito dos ácidos orgânicos; F.A.: efeito da frequência de alimentação; Int.: interação entre ácidos orgânicos e frequência de alimentação.

Fonte: Dias (2020).

6.2 COMPORTAMENTO ALIMENTAR

A adição de AO na dieta total de vacas leiteiras, (Tabela 4), causou diminuição no tempo em que esses animais permaneceram em pé ($P = 0,019$) e tendência a aumentar o tempo (min/dia) desses animais bebendo água ($P = 0,053$) e comendo ($P = 0,095$).

Tabela 4 - Comportamento alimentar de vacas em lactação alimentadas com a adição de AO na dieta total

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	P ³		
	1x		2x			AO	F. A.	Int.
	AO-	AO+	AO-	AO+				
<i>Atividades (min/dia)</i>								
Água	34,79	41,79	30,43	33,78	3,09	0,053	0,021	0,489
Comendo	303,4	320,6	304,9	317,9	11,5	0,095	0,951	0,814
Deitada	782,3	794,9	792,9	834,0	28,1	0,227	0,262	0,520
Em pé	316,8	280,5	311,6	251,4	24,8	0,019	0,396	0,551
Ruminando	503,0	485,0	495,0	464,1	15,2	0,057	0,256	0,610
Ócio	955,4	927,8	957,3	945,0	11,9	0,045	0,332	0,432
Mastigação	806,1	805,5	799,9	782,0	19,6	0,486	0,266	0,515
<i>Atividades min/kg consumo de FDN</i>								
Comendo	36,6	38,5	37,6	39,5	1,87	0,146	0,425	0,981
Ruminando	60,7	59,1	61,8	57,7	2,61	0,127	0,918	0,510
Mastigação	97,3	97,6	99,4	97,2	3,87	0,672	0,713	0,576

¹Alimentação 1x: vacas alimentadas apenas uma vez por dia às 07h00; Alimentação 2x: vacas alimentadas duas vezes por dia às 07h00 e 13h00; AO-: ausência de ácidos orgânicos na dieta; AO+: adição de ácidos orgânicos (Mold-Zap®) na dieta.

²Erro padrão da média.

³AO: efeito dos ácidos orgânicos; F.A.: efeito da frequência de alimentação; Int.: interação entre ácidos orgânicos e frequência de alimentação.

Fonte: Dias (2020).

Além disso, as vacas alimentadas com AO apresentaram menor tempo (min/dia) de ócio ($P = 0,045$) e tendência a diminuir o tempo (min/dia) de ruminação ($P = 0,057$; Tabela 4). Ao mesmo tempo, os animais alimentados uma vez por dia passaram mais tempo (min/dia) bebendo

água ($P = 0,021$). Não foi observado efeito ($P > 0,05$) da utilização de AO ou pela frequência da alimentação no tempo (min/dia) ao comer, ruminar e mastigar por kg de ingestão de FDN.

6.3 ÍNDICE DE SELEÇÃO DE PARTÍCULAS

Foi observado efeito da frequência de alimentação sobre o índice de seleção de partículas das vacas (Tabela 5), em que as vacas alimentadas duas vezes por dia selecionaram mais partículas menores que 4 mm ($P = 0,012$). Além disso, os animais que receberam adição de AO na dieta total tenderam a selecionar menos partículas menores que 4 mm ($P = 0,096$). Contudo, houve tendência a aumentar a seleção de partículas entre 8 e 19 mm das vacas alimentadas somente uma vez por dia ($P = 0,055$).

Tabela 5 - Índice de seleção de partículas de vacas em lactação alimentadas com adição de AO na dieta total

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	<i>P</i> ³		
	1x		2x			AO	F. A.	Int.
	AO-	AO+	AO-	AO+				
<i>Consumo (kg/d)</i>								
>19 mm	0,978	0,973	0,968	0,964	0,011	0,597	0,287	0,939
19 – 8 mm	1,002	1,007	0,993	1,000	0,005	0,144	0,055	0,788
8 – 4 mm	0,996	1,000	0,999	0,999	0,003	0,469	0,787	0,456
< 4 mm	1,013	0,995	1,022	1,019	0,006	0,096	0,012	0,248

¹Alimentação 1x: vacas alimentadas apenas uma vez por dia às 07h00; Alimentação 2x: vacas alimentadas duas vezes por dia às 07h00 e 13h00; AO-: ausência de ácidos orgânicos na dieta; AO+: adição de ácidos orgânicos (Mold-Zap[®]) na dieta.

²Erro padrão da média.

³AO: efeito dos ácidos orgânicos; F.A.: efeito da frequência de alimentação; Int.: interação entre ácidos orgânicos e frequência de alimentação.

Fonte: Dias (2020).

6.4 FERMENTAÇÃO RUMINAL

O uso de AO na dieta de vacas leiteiras e a frequência de alimentação não influenciaram o pH ruminal, a concentração de N-NH₃ e a produção de AGCC ($P > 0,05$; Tabela 6).

Tabela 6 - pH ruminal, concentração de N-NH₃ e perfil de AGCC de vacas em lactação alimentadas com a adição de AO na dieta total

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	P ³		
	1x		2x			AO	F. A.	Int.
	AO-	AO+	AO-	AO+				
pH	5,97	5,81	5,84	5,82	0,106	0,155	0,334	0,225
N-NH ₃ (mg/dL)	19,48	21,37	22,53	21,67	2,15	0,793	0,396	0,483
AGCC ⁴ (mmol/L)								
Acetato	64,44	63,34	64,03	65,13	1,20	0,995	0,524	0,318
Propionato	19,66	20,40	19,53	18,76	0,75	0,985	0,234	0,307
Butirato	12,02	12,39	12,51	12,13	0,99	0,997	0,908	0,718
AGCR ⁵	3,95	3,87	3,93	3,98	0,15	0,883	0,712	0,603
Total AGCC	96,13	96,13	96,07	96,02	0,13	0,838	0,458	0,844
AGCC (%)								
Acetato	67,04	65,89	66,65	67,82	0,009	0,990	0,432	0,254
Propionato	20,45	21,22	20,33	19,54	0,007	0,989	0,283	0,351
Butirato	12,51	12,89	13,02	12,64	0,005	0,998	0,729	0,332
AGCR	4,11	4,03	4,09	4,14	0,001	0,875	0,640	0,541
A:P ⁶	3,31	3,17	3,31	3,49	0,18	0,869	0,308	0,319

¹Alimentação 1x: vacas alimentadas apenas uma vez por dia às 07h00; Alimentação 2x: vacas alimentadas duas vezes por dia às 07h00 e 13h00; AO-: ausência de ácidos orgânicos na dieta; AO+: adição de ácidos orgânicos (Mold-Zap[®]) na dieta.

²Erro padrão da média.

³AO: efeito dos ácidos orgânicos; F.A.: efeito da frequência de alimentação; Int.: interação entre ácidos orgânicos e frequência de alimentação.

⁴AGCC: Ácidos graxos de cadeia curta.

⁵Ácidos graxos de cadeia ramificada.

⁶A:P: Relação acetato:propionato.

Fonte: Dias (2020).

Da mesma forma, não foi observado efeito dos AO ou da frequência de alimentação no perfil de AGCC, bem como na razão acetato:propionato ($P > 0,05$; Tabela 6).

6.5 SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA

A adição de AO na dieta de vacas leiteiras teve efeito na síntese de alantoína do leite ($P = 0,024$), e no geral não afetou a síntese de proteína microbiana ($P > 0,05$; Tabela 7).

Tabela 7 - Síntese de proteína microbiana de vacas em lactação alimentadas com a adição de AO na dieta total

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	<i>P</i> ³		
	1x		2x			AO	F. A.	Int.
	AO-	AO+	AO-	AO+				
<i>Excreção (mmol/d)</i>								
Alantoína no leite	120,41	101,86	127,61	92,29	16,02	0,024	0,919	0,474
Alantoína na urina	142,93	160,62	162,19	171,25	15,25	0,374	0,320	0,773
Ácido úrico na urina	101,96	95,61	99,10	123,16	13,01	0,351	0,194	0,111
Derivados purina	364,58	358,09	388,92	380,48	19,98	0,689	0,213	0,958
Síntese de proteína microbiana (kg/d)	1,66	1,62	1,79	1,80	0,11	0,863	0,128	0,835
Eficiência ⁴	0,107	0,106	0,114	0,114	0,007	0,983	0,259	0,909

¹Alimentação 1x: vacas alimentadas apenas uma vez por dia às 07h00; Alimentação 2x: vacas alimentadas duas vezes por dia às 07h00 e 13h00; AO-: ausência de ácidos orgânicos na dieta; AO+: adição de ácidos orgânicos (Mold-Zap[®]) na dieta.

²Erro padrão da média.

³AO: efeito dos ácidos orgânicos; F.A.: efeito da frequência de alimentação; Int.: interação entre ácidos orgânicos e frequência de alimentação.

⁴Síntese de proteína microbiana (kg/d)/consumo de matéria orgânica digestível (kg/d).

Fonte: Dias (2020).

6.6 BALANÇO DE NITROGÊNIO

Conforme representado na Tabela 8, não foi observado efeito dos AO e diferentes frequências de alimentação sobre a variação na ingestão de nitrogênio e nitrogênio fecal e urinário ($P > 0,05$), embora o uso de AO tenha melhorado o nitrogênio do leite ($P = 0,033$). Além disso, não foi observado efeito dos AO ou da frequência de alimentação sobre o balanço de nitrogênio ($P > 0,05$).

Tabela 8 - Balanço de nitrogênio de vacas em lactação alimentadas com a adição de AO na dieta total

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	<i>P</i> ³		
	1x		2x			AO	F. A.	Int.
	AO-	AO+	AO-	AO+				
<i>N (g/dia)</i>								
Consumo	735,6	737,6	720,6	720,1	19,1	0,942	0,116	0,903
Fezes	249,2	246,3	245,2	241,2	12,7	0,679	0,584	0,943
Urina	333,6	274,1	288,6	273,2	26,3	0,150	0,376	0,395
Leite	150,2	153,3	151,5	152,5	4,24	0,033	0,801	0,281
Balanço (g/d consumo N)	29,46	63,92	35,31	53,24	26,32	0,919	0,273	0,729

¹Alimentação 1x: vacas alimentadas apenas uma vez por dia às 07h00; Alimentação 2x: vacas alimentadas duas vezes por dia às 07h00 e 13h00; AO-: ausência de ácidos orgânicos na dieta; AO+: adição de ácidos orgânicos (Mold-Zap®) na dieta.

²Erro padrão da média.

³AO: efeito dos ácidos orgânicos; F.A.: efeito da frequência de alimentação; Int.: interação entre ácidos orgânicos e frequência de alimentação.

Fonte: Dias (2020).

6.7 METABÓLITOS SANGUÍNEOS

Não foram observados efeitos da adição de AO ou da frequência de alimentação sobre nitrogênio ureico e da glicose sérica ($P > 0,05$; Tabela 9).

Tabela 9 - Metabólitos sanguíneos de vacas em lactação alimentadas com a adição de AO na dieta total

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	P ³		
	1x		2x			AO	F. A.	Int.
	AO-	AO+	AO-	AO+				
Metabólitos sanguíneos (mg/dL)								
Glicose	72,36	76,63	76,09	74,43	1,93	0,473	0,674	0,107
Ureia	33,54	35,03	34,86	35,41	1,01	0,320	0,409	0,649

¹Alimentação 1x: vacas alimentadas apenas uma vez por dia às 07h00; Alimentação 2x: vacas alimentadas duas vezes por dia às 07h00 e 13h00; AO-: ausência de ácidos orgânicos na dieta; AO+: adição de ácidos orgânicos (Mold-Zap[®]) na dieta.

²Erro padrão da média.

³AO: efeito dos ácidos orgânicos; F.A.: efeito da frequência de alimentação; Int.: interação entre ácidos orgânicos e frequência de alimentação.

Fonte: Dias (2020).

6.8 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

A adição de AO melhorou a PL ($P = 0,003$) e a produção de proteína ($P = 0,026$) e lactose ($P = 0,034$) no leite. Além disso, houve tendência ao aumento do leite corrigido para gordura ($P = 0,064$) em vacas alimentadas com AO. Observou-se tendência à interação entre AO e da frequência de alimentação no teor de lactose ($P = 0,056$) e proteína ($P = 0,096$) do leite. Não foram observados efeitos dos AO ou da frequência de alimentação sobre o nitrogênio uréico do leite ($P > 0,05$).

No entanto, de acordo com a Tabela 10, o uso de AO não apresentou efeito na produção de gordura e no teor de gordura do leite ($P > 0,05$). Da mesma forma, não foi observado efeito sobre a eficiência produtiva ($P > 0,05$).

Tabela 10 - Produção e composição do leite e eficiência produtiva de vacas em lactação alimentadas com a adição de AO na dieta total

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	P ³		
	1x		2x			AO	F. A.	Int.
	AO-	AO+	AO-	AO+				
<i>Produção de leite, kg/d</i>	28,64	29,26	28,58	29,05	0,729	0,003	0,453	0,656
PLCG 3.5% ⁴	29,40	30,18	29,80	30,03	0,949	0,064	0,658	0,302
Gordura	1,04	1,08	1,07	1,07	0,044	0,242	0,428	0,292
Proteína	0,96	0,98	0,96	0,97	0,027	0,026	0,932	0,269
Lactose	1,44	1,47	1,45	1,46	0,040	0,034	0,833	0,207
<i>Composição do leite, %</i>								
Gordura	3,64	3,70	3,74	3,68	0,115	0,945	0,342	0,210
Proteína	3,34	3,35	3,38	3,35	0,020	0,176	0,104	0,096
Lactose	5,01	5,02	5,07	5,02	0,031	0,164	0,129	0,056
NUL ⁵ , mg/dL	16,47	16,83	16,79	17,27	0,581	0,360	0,403	0,902
<i>Eficiência</i>								
Leite : CMS ⁶	1,11	1,12	1,12	1,13	0,038	0,757	0,571	0,989
PLCG 3,5% : CMS ⁷	1,14	1,15	1,16	1,16	0,036	0,750	0,201	0,509

¹Alimentação 1x: vacas alimentadas apenas uma vez por dia às 07h00; Alimentação 2x: vacas alimentadas duas vezes por dia às 07h00 e 13h00; AO-: ausência de ácidos orgânicos na dieta; AO+: adição de ácidos orgânicos (Mold-Zap®) na dieta.

²Erro padrão da média.

³AO: efeito dos ácidos orgânicos; F.A.: efeito da frequência de alimentação; Int.: interação entre ácidos orgânicos e frequência de alimentação.

⁴Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura.

⁵Nitrogênio ureico no leite.

⁶Relação entre produção de leite e consumo de matéria seca.

⁷Relação entre PLCG a 3,5% e consumo de matéria seca.

Fonte: Dias (2020).

6.9 TEMPERATURA DA DIETA TOTAL

A adição de AO na dieta total foi capaz de manter a temperatura da dieta total estável por mais tempo em relação à dieta total que não recebeu adição de AO (Figura 1). As duas dietas que receberam adição de AO tanto 1 ou 2 fornecimentos por dia apresentaram maior estabilidade aeróbica em relação as dietas que não receberam. Sendo que a dieta com presença de AO fornecida somente uma vez ao dia (07h00) resultou em maior aumento da temperatura em relação a dieta com adição de AO fornecida duas vezes ao dia (07h00 e 13h00). Logo, após o fornecimento da dieta e exposição ao ambiente ao longo do dia, houve quebra da EA mais rapidamente e aumento da temperatura dos tratamentos sem adição de AO tanto 1 ou 2 alimentações por dia, sendo que a temperatura no tratamento sem adição de AO fornecida duas vezes ao dia (07h00 e 13h00) foi maior em relação ao tratamento uma vez ao dia (07h00).

Figura 1 - Efeitos da adição de ácidos orgânicos (Mold-Zap®) e frequência de alimentação sobre a temperatura da dieta no cocho em 24 horas

C1: Controle sem adição de AO (Mold-Zap®) ofertada somente uma vez ao dia às 07h00; C2: Controle sem adição de AO (Mold-Zap®) ofertada duas vezes ao dia às 07h00 e 13h00; M1: Adição de AO (Mold-Zap®) ofertada somente uma vez ao dia 07h00; M2: Adição de AO (Mold-Zap®) ofertada duas vezes ao dia 07h00 e 13h00. Probabilidades (P): (Mold-Zap®): $P = 0,007$; Frequência de alimentação: $P = 0,914$; Tempo $P = 0,379$; (Mold-Zap®) vs Frequência de alimentação: $P = 0,110$; (Mold-Zap®) vs Tempo: $P = 0,048$; Frequência de alimentação vs Tempo: $P = 0,474$; (Mold-Zap®) vs Frequência de alimentação vs Tempo: $P = 0,350$. Fonte: Dias (2020).

7 DISCUSSÃO

Ao adicionar AO na dieta total, o CMS das vacas manteve-se o mesmo independente da frequência de alimentação. Tais resultados contrastam com o observado por Krizsan et al. (2012) e Daniel et al. (2013), os quais afirmam que os AO podem deprimir o CMS quando adicionados à dieta total.

A adição de AO à base de ácido propiônico além de preservar a dieta total ao longo do dia, não influenciou o CMS, sugerindo que o produto é um aditivo seguro para vacas leiteiras. Níveis mais altos de AO adicionados à silagem antes da alimentação podem reduzir o CMS

durante as primeiras semanas após o início do fornecimento, retornando aos níveis normais após quatro ou mais semanas (Daniel et al., 2013), o que não foi observado em nosso estudo. Semelhante aos nossos resultados, Kung et al. (1998) não encontraram efeito no CMS com adição de ácido propiônico na dieta total. Por outro lado, Gheller et al. (2020) encontraram um aumento no CMS de animais que receberam produtos à base de OA na dieta total, especificamente ácidos acético, fórmico e propiônico, o que foi associado a uma diminuição na concentração de compostos hipofágicos na dieta total e uma redução na temperatura da dieta total. O produto à base de AO testado nas condições de nosso experimento não afetou o CMS, embora a atividade alimentar tendeu a aumentar.

Além disso, Kertz et al. (1982) e Scherer et al. (2015) descrevem que a palatabilidade do alimento tem grande influência no consumo dos animais e pode ser influenciada negativamente pela presença de amônia e aminas biogênicas quando estão presentes no alimento em processo de deterioração. Contudo, o uso de aditivos na dieta total reduz o acúmulo de tais substâncias, mantendo o valor nutricional dos alimentos (OLIVEIRA et al., 2017), e o mesmo efeito pode ter sido demonstrado nas circunstâncias deste estudo, utilizando os aditivos na dieta total, associado ao aumento da frequência de alimentação, o que por sua vez estimula a maior ingestão de alimento no momento do fornecimento.

Embora não tenham sido observadas diferenças na ingestão e nem na digestibilidade aparente total da MS e nutrientes, a dieta total com adição de ácido propiônico melhorou o desempenho produtivo dos animais. Esse fato pode estar associado à maior qualidade dos alimentos, devido à menor taxa de deterioração dos nutrientes da dieta total, maior tempo de estabilidade aeróbica e menor aquecimento da dieta total (Santos et al., 2019). Considerando que as condições ambientais durante o período experimental foram indutoras de estresse térmico, a manutenção da qualidade da dieta total durante o dia teve um impacto marcante no desempenho das vacas leiteiras. Além dos efeitos preservativos causados pelos AO na dieta total, o AO pode ter uma ação ruminal e metabólica direta no organismo animal. A melhora no desempenho produtivo das vacas leiteiras pode estar associada à contribuição energética da AO, uma vez que a maior parte é absorvida pela mucosa intestinal por difusão passiva e utilizada na geração de ATP no ciclo do ácido cítrico (Sahoo e Jena, 2014). Além disso, parte dos AO reduzem as perdas de energia associadas à produção de metano, além de um aumento no fluxo de proteína na dieta para o intestino delgado (Castillo et al., 2004). Apesar desses mecanismos não terem sido comprovados por nosso estudo, acreditamos que eles possam merecer mais atenção em experimentos futuros.

Não foram detectadas diferenças para a maioria das variáveis avaliadas em relação à frequência de fornecimento de TMR. De acordo com Sova et al., 2013, a alimentação 2x ao dia em comparação com 1x ao dia em fazendas comerciais foi positivamente associada ao DMI e à produção de leite. Uma das razões que podem explicar parcialmente a falta de diferença em nosso estudo é que os animais costumavam ir ao cocho para comer às 13 horas, pois era a hora em que a TMR era fornecida para animais tratados duas vezes por dia. Resultados semelhantes foram encontrados por Pazdiora et al. (2011), onde avaliaram 1 a 3 frequências de oferta de TMR por dia para vacas e novilhas leiteiras e não encontraram diferenças significativas, alegando que uma redução no fornecimento de TMR para animais pode ser feita, a fim de diminuir os custos operacionais das mãos dos trabalhos agrícolas. Benchaar et al., 2020, ao variar a frequência de alimentação, também não encontraram diferenças no consumo, digestibilidade total do trato, desempenho e parâmetros ruminais de vacas leiteiras.

A adição de AO na dieta total de vacas leiteiras diminuiu o tempo (min/dia) em que esses animais permaneceram em pé. Por outro lado, vacas alimentadas com AO apresentaram menor tempo (min/dia) de ócio e uma tendência a diminuir o tempo (min/dia) de ruminação diária, o que está relacionado com o aumento do tempo em que as vacas passaram se alimentando, selecionando alimentos e bebendo água (GHELLER et al., 2020).

As vacas alimentadas com 1x por dia preferiam partículas entre 8 e 19 mm e evitavam partículas menores que 4 mm, o que indica que os animais selecionaram mais silagem do que as partículas concentradas em comparação com as vacas alimentadas com 2x por dia. Curiosamente, Sova et al., 2013 relatam que a alimentação de vacas 2x dia aumenta a ingestão de partículas longas (> 19 mm) em relação à alimentação 1x por dia. Além disso, a tendência de maior digestibilidade do FDN para vacas alimentadas 2x ao dia está principalmente associada ao potencial de melhorar a atividade enzimática no intestino e aumentar a digestibilidade pós-uminal, aumentando a frequência da alimentação (Shabi et al., 1999).

Foi observado efeito da frequência de alimentação sobre o índice de seleção de partículas da dieta de vacas leiteiras, em que as vacas alimentadas duas vezes ao dia selecionaram mais partículas menores que 4 mm. Este fato pode estar relacionado ao maior tempo em que estes animais passaram no cocho selecionando partículas menores, (concentrado) pois havia o estímulo de duas alimentações adicionado ao estímulo da mistura da dieta total ao final do dia.

Tal fato concorda com o descrito por Devries et al. (2005), que relataram que o fornecimento da dieta total para os animais promove estímulo de consumo aumentando a atividade alimentar. Da mesma forma, Pazdiora et al. (2011) testaram diferentes frequências de

fornecimento de volumoso e concentrado para vacas leiteiras e novilhas, e observaram um aumento da ingestão do alimento no momento do consumo, embora o CMS ao longo do dia não tenha resultado em efeito significativo das frequências de fornecimento. Sendo assim, a seleção de partículas menores que 4 mm da dieta total pode estar associada à diminuição da ingestão de partículas de fibra fisicamente efetiva e, conseqüentemente, ao estímulo de ruminação desses animais (ZEBELI et al., 2006), conforme observado no presente estudo.

Além disso, a adição de AO não influenciaram os parâmetros ruminais ou síntese de proteína microbiana. Gheller et al., 2020 relatam um aumento na concentração ruminal de ácido propiônico, ao alimentar as vacas com produtos à base de ácido propiônico, juntamente com uma diminuição na razão acetato:propionato, enquanto não foram detectadas diferenças no nitrogênio microbiano. Alterações no ambiente ruminal, como menor produção de metano, adaptação da microbiota ruminal e queda no pH ruminal quando grandes quantidades de AO são fornecidas, são resultados esperados na literatura (Newbold e Rode, 2006). No entanto, a dose dos AO adicionada a dieta total no presente estudo foi baixa e não obteve alterações no ambiente ruminal, portanto o nitrogênio microbiano não foi afetado, assim como os parâmetros de fermentação ruminal. Isso também explica em parte porque o conteúdo de gordura do leite não foi modificado pela inclusão de AO na dieta total, uma vez que provavelmente o processo de bio-hidrogenação ruminal e a produção de AGCC também não foram afetados (Harvatine, 2016). Além disso, French e Kennelly (1990) demonstraram que a maior frequência de alimentação durante o dia aumenta a relação acetato:propionato. Esses autores observaram que vacas alimentadas com 12 porções iguais de concentrado distribuídas em intervalos de 2h apresentaram elevação do pH ruminal e maior relação acetato:propionato, associada com maior porcentagem de gordura do leite quando comparado com os animais que receberam a ração dividida em apenas duas porções iguais durante o dia. Tais resultados sugerem que quando há maior frequência de fornecimento do alimento sua ingestão é constante, bem como a chegada do alimento e dos nutrientes ao rúmen, evitando quedas bruscas do pH ruminal. Além disso, a maior frequência de alimentação pode resultar em maiores níveis de acetato em relação ao propionato, elevando as concentrações de gordura do leite. Ademais, aumento da frequência de alimentação pode controlar as concentrações de propionato ruminal e insulina plasmática, inibindo a depressão da gordura do leite.

Ademais, a adição de AO e a frequência de alimentação não gerou efeitos sobre a concentração sérica de glicose e ureia, concordando com Gheller et al., 2020. Além disso, tais resultados se assemelham com estudo de Daniel et al. (2013) que avaliaram a adição de ácido

acético na dieta total, e se depararam com resultados parecidos na utilização de AO durante o processo de ensilagem.

Através da melhora e preservação da qualidade alimentar os animais tiveram como consequência aumento da PL de forma similar a Gheller et al. (2020). Houve tendência ao aumento da PLCG 3,5% das vacas alimentadas com AO, porque segundo Khan et al. (2015), o leve aumento no CMS e, consequentemente, no consumo de energia pode ter influenciado positivamente a PLCG 3,5%. Os teores de proteína e lactose do leite aumentaram com a adição de AO na dieta total, influenciada pelo aumento da produção de leite. Como os AO tiveram a capacidade de preservar os nutrientes da dieta total, são esperados aumentos na proteína metabolizável e energia para a síntese do leite, uma vez que os AO impedem a proteólise, a desaminação e a descarboxilação de aminoácidos durante a exposição ao ar dos alimentos (Daniel et al., 2016; Oliveira et al., 2017).

A adição de AO na dieta total de vacas leiteiras ocasiona a inibição da multiplicação de microrganismos, evitando o processo de deterioração, o que preserva seus nutrientes por mais tempo (OLIVEIRA et al., 2017), através da redução do pH da dieta total (Daniel et al., 2013). Além disso, a adição de AO na dieta total aumenta a estabilidade aeróbica durante o dia (GHELLER et al., 2020) e reduz a temperatura da dieta total após 24 horas no cocho (KUNG et al., 1998). A adição de AO na dieta total foi capaz de manter a temperatura da dieta total estável por mais tempo em relação à dieta total que não recebeu adição de AO. Tal resultado é explicado pela diminuição da ação de microrganismos na dieta total, em decorrência da presença de AO, uma vez que a presença de AO na dieta total inibe a ação de bactérias e, principalmente, de fungos e leveduras que deterioram o alimento. Estudo de Oliveira et al. (2017) demonstrou que a utilização de aditivos durante o processo de ensilagem reduz a multiplicação microbiana, mantendo o valor nutricional da silagem evitando perdas nutricionais.

Embora a temperatura ambiente tenha diminuído ao longo do dia, a temperatura da dieta total nos tratamentos sem adição de AO aumentou constantemente, e nos tratamentos que receberam os AO a temperatura manteve-se estável ou foi reduzida. Tais resultados concordam com o que foi relatado por Kung Júnior (2009), o qual afirma que a utilização destes aditivos possui a capacidade de inibir a multiplicação microbiana e resulta em melhora da estabilidade aeróbica. Auerbach et al. (2012) afirmaram que a atividade e multiplicação microbiana indesejável, sejam capazes de aumentar sua temperatura e diminuir a quantidade de nutrientes presentes no alimento comprometendo a qualidade da dieta total que será fornecida aos animais.

Acontece proliferação indesejável de microrganismos, aumento da temperatura, quebra da estabilidade aeróbica e diminuição da matéria seca por perdas de nutrientes por kg/MS. Além disso, se a forragem utilizada apresenta alto teor proteico, isso pode ocasionar proteólise resultando em altas concentrações de amônia-N e formação de aminas biogênicas fazendo com que haja a possibilidade de inibição do CMS (SCHERER et al., 2015). Também, a deterioração de alimentos pode estar associada com o desenvolvimento de *Clostridium* e leveduras que formam etanol em excesso, outro fator que pode causar interferências negativas no CMS dos animais (DRIEHUIS, 2013).

8 CONCLUSÃO

A adição de AO (Mold-Zap®) à base de ácido propiônico na dieta total de vacas leiteiras em lactação aumentou a produção de leite, produção de sólidos do leite e a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura. Além disso, impediu o aumento da temperatura da dieta total ao longo do dia no cocho. Contudo a frequência de fornecimento dos alimentos não afetou a maioria das variáveis avaliadas e permitiu a redução da frequência do fornecimento dos alimentos sem interferir no desempenho produtivo de vacas em lactação tornando uma opção viável para otimizar o desempenho de vacas leiteiras.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADESOGAN, A. T.; NEWMAN, Y. C. Silage harvesting, storing and feeding. IFAS Extension, University of Florida, Gainesville. Accessed May 19, 2017. <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/AG/AG18000.pdf>. 2014.

ALLEN, M. S. Relationship Between Fermentation Acid Production in the Rumen and the Requirement for Physically Effective Fiber. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1447–1462, 1997.

ALVIM, M. J.; VILELA, D.; LOPES, R. S. Efeitos de dois níveis de concentrado sobre a produção de leite de vacas da raça holandesa em pastagem de coast-cross (*Cynodon dactylon* (L.) Pers). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 26, p. 967–975, 1997.

AMARAL-PHILLIPS, D. M.; BICUDO, J. R.; TURNER, L. W. Feeding Your Dairy Cows a Total Mixed Ration: Getting Started. Bulletin ID-141A. Cooperative Extension service, College of agriculture, University of Kentucky, Lexington, US. 2002. 4p.

AOAC-ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 17. ed. Arlington: AOAC, p. 1298, 2000.

ASHBELL, G. et al. The effects of temperature on the aerobic stability of wheat and corn silages. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 261–263, 2002.

AUERBACH, H.; WEISS, K.; NADEAU, E. Benefits of using silage additives. In: 1st Int. Silage Summit, 2012, Leipzig, Saxony, Germany. **Proceedings**. Worthington, UK: ed. Anytime Publishing Services, p. 75–144, 2012.

BARGO, F. et al. Performance of High Producing Dairy Cows with Three Different Feeding Systems Combining Pasture and Total Mixed Rations. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 11, p. 2948–2963, 2002.

BATH, D. L. Nutritional requirements and economics of lowering feed costs. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 1579–1584, 1985.

BENCHAAR, C.; HASSANAT, F. Frequency of diet delivery to dairy cows: Effect on nutrient digestion, rumen fermentation, methane production, nitrogen utilization, and milk production. **Journal of Dairy Science**, *In Press*. 2020.

BERNARDES, T. F. **Levantamento das práticas de produção e uso de silagens em fazendas leiteiras no Brasil**. Universidade Federal de Lavras, Lavras (E-book), 2012. 17 p. Disponível em: <<http://www.ufla.br/dcom/wp-content/uploads/2012/03/EBOOK-SILAGEM1.pdf>> Acesso em: 16 de março de 2020.

BORREANI, G. et al. Factors affecting dry matter and quality losses in silages. Silage review. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 3952–3979, 2018.

BORREANI, G.; TABACCO, E. Plastics in animal production. In a Guide to the Manufacture, Performance, and Potential of Plastics in Agriculture. M. Orzolek, ed. **Elsevier**, Amsterdam, the Netherlands. p. 145–185, 2017.

BRODERICK, G. A.; CLAYTON, M. K. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n.11, p. 2964–2971, 1997.

BRODERICK, G. A.; KANG, J. H. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid in vitro media. **Journal of Dairy Science**, v. 63, p. 64-75, 1980.

CASALI, A. O. et al. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos in situ. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.2, p.335–342, 2008.

CASTILLO, C. et al. Organic acids as a substitute for monensin in diets for beef cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v. 115, p. 101–116, 2004.

CHEN, L. et al. Effect of lactic acid bacteria and propionic acid on conservation characteristics, aerobic stability and in vitro gas production kinetics and digestibility of whole-crop corn based total mixed ration silage. **Journal of Integrative Agriculture**, v.16, n.7, p.1592–1600, 2017.

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 research unit**. Bucksburn, Aberdeen:Rowett Research Institute. 1992, 22p.

CHIZZOTTI, M. L. Avaliação da casca de algodão para novilhos de origem leiteira e determinação da excreção de creatinina e produção de proteína microbiana em novilhas e vacas leiteiras. **Dissertação** (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, MG:UFV. 2004, 132 p.

CHIZZOTTI, M. L. et al. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. **Livestock Production Science**, v. 113, p. 218–225, 2008.

COPPOCK, C. E. Feeding Methods and Grouping Systems. **Journal of Dairy Science**, v. 60, n. 8, p. 1327–1336, 1977.

COPPOCK, C. E.; BATH, D. L.; HARRIS, B., JR. From Feeding to Feeding Systems. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 6, p. 1230–1249, 1981.

CROSSLEY, R. E.; HARLANDER-MATAUSCHEK, A.; DEVRIES, T. J. Mitigation of variability between competitively fed dairy cows through increased feed delivery frequency. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 518–529, 2018.

DANIEL, J. B. et al. Milk yield and milk composition responses to change in predicted net energy and metabolizable protein: a meta-analysis. **Animal**, v. 10, n. 12, p. 1975–1985, 2016.

DANIEL, J. L. P. et al. Performance of dairy cows fed high levels of acetic acid or ethanol. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 1, p. 398–406, 2013.

DANNER, H. et al. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 1, p. 562–567, 2003.

DEVRIES, T. J. et al. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: Feeding, ruminating, and lying behavior. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 5067–5078, 2009.

DEVRIES, T. J.; VON KEYSERLINGK, M. A. G. Time of feed delivery affects the feeding and lying patterns of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 625–631, 2005.

DEVRIES, T. J.; VON KEYSERLINGK, M. A. G.; BEAUCHEMIN, K. A. Diurnal feeding pattern of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 4079–4082, 2003a.

DEVRIES, T. J.; VON KEYSERLINGK, M. A. G.; BEAUCHEMIN, K. A. Frequency of feed delivery affects the behavior of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 10, p. 3553–3562, 2005.

DRIEHUIS, F. Silage and the safety and quality of dairy foods: a review. **Agricultural and Food Science**, v. 22, n. 1, p. 16–34, 2013.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. **The Veterinary quarterly**, v. 22, n. 4, p. 212–216, 2000.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; VAN WIKSELAAR, P. G. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, v. 56, n. 4, p. 330–343, 2001.

EASTRIDGE, M. L. Major advances in applied dairy cattle nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1311–1323, 2006.

FERLAND, M. C. et al. Effect of feeding system and grain source on lactation characteristics and milk components in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 1–14, 2018.

FERREIRA, E. M. et al. Nutrient digestibility and ruminal fatty acid metabolism in lambs supplemented with soybean oil partially replaced by fish oil blend. **Animal Feed Science and Technology**, v. 216, p. 30–39, 2016.

FINNERAN, E. et al. Simulation modelling of the cost of producing and utilising feeds for ruminants on Irish farms. **Journal of Farm Management**, v. 14, p. 95–116, 2010.

FONTANELI, R. S. et al. Performance of lactating dairy cows managed on pasture-based or in freestall barn-feeding systems. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 3, p. 1264–1276, 2005.

FREDEEN, A. H. Considerations on the nutritional modification of milk composition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 59, p. 185–197, 1996.

FRENCH, N.; KENNELLY, J. J. Effects of feeding frequency on ruminal parameters, plasma insulin, milk yield, and milk composition in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 1857–1863, 1990.

GERLACH, K. et al. Changes in maize silage fermentation products during aerobic deterioration and effects on dry matter intake by goats. **Agricultural and Food Science**, v. 22, n. 168–181, 2013.

GHELLER, L. S. et al. Effects of organic acid-based products added to total mixed ration on performance and ruminal fermentation of dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 261, p. 1803–1810, 2020.

GIBSON, J. P. The effects of feeding frequency on milk production of dairy cattle: an analysis of published results. **Animal Production Science**, v. 38, p. 181–189, 1984.

GIBSON, J. P. The effects of feeding frequency on the growth and efficiency of food utilization of ruminants: an analysis of published results. **Animal Production Science**, v. 32, p. 275–283, 1981.

GIMENES, A. L. G. et al. Composição química e estabilidade aeróbia em silagens de milho preparadas com inoculantes bacteriano e/ou enzimático. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. Maringá, v. 28, n. 2, p. 153–158, 2006.

GONZALEZ-RONQUILLO, M. et al. Purine Derivative Excretion in Dairy Cows: Endogenous Excretion and the Effect of Exogenous Nucleic Acid Supply. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 4, 2003, p. 1282-1291, 2003.

GRETER, A. M. et al. Short communication: effects of frequency of feed delivery and bunk space on the feeding behavior of limit-fed dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 1803–1810, 2013.

HALL, M. B. Neutral detergent-soluble carbohydrates. **Nutritional relevance and analysis**. Gainesville: University of Florida, 76 p., 2000.

HALMEMIES-BEAUCHET-FILLEAU, A. et al. Effect of forage conservation method on ruminal lipid metabolism and microbial ecology in lactating cows fed diets containing a 60:40 forage-to-concentrate ratio. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 4, p. 2428–2447, 2013.

HAN, L. Y. et al. Effect of two additives on the fermentation, in vitro digestibility and aerobic security of Sorghum–sudangrass hybrid silages. **Grass and Forage Science**, v. 70, p. 185–194, 2015.

HAQUE, M. N. et al. Propionic acid is an alternative to antibiotics in poultry diet. **Bangladesh Journal of Animal Science**, v. 38, n. 1-2, p. 115–122, 2009.

HARSHBARGER, K. E. Self-feeding a ground hay and grain ration to dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 35, p. 501, (Abstract), 1952.

HART, K. D. et al. Effect of frequency of feed delivery on the behavior and productivity of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 1713–1724, 2014.

HARVATINE, K. J. Managing milk fat depression. In Proc. Florida Ruminant Nutr. Symp. p. 64–77, 2016, <http://dairy.ifas.ufl.edu/rns/2016/7>.

HEINRICHS, A. J.; BUCKMASTER, D. R.; LAMMERS, B. P. Processing, mixing, and particle size reduction of forages for dairy cattle. **Journal Animal Science**, v. 77, p. 180–186, 1999.

HENDRIX, D. L. Rapid Extraction and Analysis of Nonstructural Carbohydrates in Plant Tissues. **Crop Science**, v. 33, n. 6, p. 1306–1311, 1993.

HERNANDEZ-URDANETA, A. et al. Changes in Forage-Concentrate Ratio of Complete Feeds for Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 59, n. 4, p. 695–707, 1976.

HOFFMAN, P. C.; OCKER, S. M. Quantification of milk yield losses associated with feeding aerobically unstable high moisture corn. **Journal of Dairy Science**, 80 (Suppl. 1):234, (Abstr.), 1997.

HOFFMAN, P. C.; SIMSON, C. R.; WATTIAUX, M. Limit feeding of gravid Holstein heifers: Effect on growth, manure nutrient excretion, and subsequent early lactation performance. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 946–954, 2007.

HOSSEINKHANI, A. et al. The effects of feed bunk competition on the feed sorting behavior of close-up dry cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 1115–1121, 2008.

HUHTANEN, P.; KAUSTELL, K.; JAAKKOLA, S. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, p. 211–227, 1994.

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, n. 5, p. 758–770, 2007.

HUISDEN, C. M. et al. Effect of applying molasses or inoculants containing homofermentative or heterofermentative bacteria at two rates on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 690–697, 2009.

KEADY, T. W. J. et al. Effect of Concentrate Feed Level in Late Gestation on Subsequent Milk Yield, Milk Composition, and Fertility of Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1468–1479, 2001.

KERTZ, A. F. et al. Factors influencing intake of high urea-containing rations by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 4, p. 587–604, 1982.

KEUNEN, J. E. et al. Effects of a subacute ruminal acidosis model on the diet selection of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 3304–3313, 2002.

KHAN, N. A. et al. Nutritive value of maize silage in relation to dairy cow performance and milk quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 2, p. 238–252, 2015.

KING, M. T. M.; CROSSLEY, R. E.; DEVRIES, T. J. Impact of timing of feed delivery on the behavior and productivity of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 1471–1482, 2016b.

KITTS, B. L. et al. Effect of the provision of a low-nutritive feedstuff on the behavior of dairy heifers fed a high-concentrate ration in a limited amount. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 940–950, 2011.

KLEINSCHMIT, D. H.; KUNG, JR. L. The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 10, p. 3999–4004, 2006.

KLEINSCHMIT, D. H.; SCHMIDT, R. J.; KUNG, JR. L. The effects of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 6, p. 2130–2139, 2005.

KOLVER, E. S.; MULLER, L. D. Performance and nutrient intake of high producing Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1403–1411, 1998.

KONONOFF, P. J.; HEINRICHS, A. J.; BUCKMASTER, D. R. Modification of the Penn State Particle Separator and the effects of moisture content on its measurements. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1858–1863, 2003.

KRIZSAN, S. J.; RANDBY, A. T.; WESTAD, F. Effect of acetic acid, caproic acid and tryptamine on voluntary intake of grass silage by growing cattle. **Grass and Forage Science**, v. 67, n. 3, p. 361–368, 2012.

KUNG, JR. L. Aerobic Stability of Silages. **Dairy Nutrition & Silagem Laboratory**. Department of Animal & Food Sciences, University of Delaware. 2005, 13 p.

KUNG, JR. L. et al. An evaluation of the effectiveness of a chemical additive based on sodium benzoate, potassium sorbate, and sodium nitrite on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 7, p. 5949–5960, 2018.

KUNG, JR. L. et al. The Effect of Preservatives Based on Propionic Acid on the Fermentation and Aerobic Stability of Corn Silage and a Total Mixed Ration. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 5, p. 1322–1330, 1998.

KUNG, JR. L. Potential factors that may limit the effectiveness of silage additives. XV International Silage Conference, Madison, WI. **Dairy Forage Research Center**, p. 37–45, 2009.

KUNG, JR. L. Silage fermentation and additives. In: **Science and technology in the feed industry**. Proc... Alltech's 17 th Annual Symposium. Ed. T.P. Lyons and K.A. Jacques. 2001.

KUNG, JR. L.; MUCK, R. E. Animal response to silage additives. Proceedings of the Silage: field to feedbunk. NRAES-99. **North American conference**, Hershey, Pennsylvania February, p. 11–13, 1997.

KUNG, JR. L.; STOKES, M. R.; LIN, C. J. Silage additives. 1.ed. Madison: American Society of Agronomy. **Silage science and technology**, v. 42, p. 305–360, 2003.

LAMBERT, R. J.; STRATFORD, M. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 1, p. 157–164, 1999.

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

LEONARDI, C.; ARMENTANO, L. E. Short communication: Feed selection by dairy cows fed individually in a tie-stall or as a group in a free-stall barn. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2386–2389, 2007.

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**, v. 88, p. 1043–1049, 2005.

MANTOVANI, H. C.; BENTO, C. B. P. Manipulação da Fermentação microbiana ruminal para máxima eficiência animal. II Simbov – II Simpósio Matogrossense de Bovinocultura de Corte. **Anais... II SIMBOV 2013**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. v. 2, p. 1–31, 2013.

MATTACHINI, G. et al. Effects of feeding frequency on the lying behavior of dairy cows in a loose housing with automatic feeding and milking system. **Animal**, v. 9, p. 121, 2019.

MCALLISTER, T. A.; HRISTOV, A. N. The fundamentals of making good quality silage - **Advanced Dairy Technology**, v. 12, p. 381–399, 2000.

MCBETH, L. R. et al. Effects of transient changes in silage dry matter concentration on lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 3924–3935, 2013.

MCCOY, G. C. et al. Complete feed rations for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 49, p. 1058–1063, 1966.

MCCOY, R. A. K. C. et al. Effect of mixing uniformity on broiler chick performance. **Poultry Science, Champaign**, v. 73, n. 3, p. 443–451, 1994.

MENDONÇA, S. S. et al. Comportamento ingestivo de vacas leiteiras alimentadas com dietas à base de cana de açúcar ou silagem de milho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 3, p. 723–728, 2004.

MENDOZA, A.; CAJARVILLE, C.; REPETTO, J. L. Behaviour of cows fed a total mixed ration with different access time to fresh forage. N. Z. **Journal Agricultural Research**, v. 61, p. 102–108, 2017.

MERTENS, D. R. Creating a System for Meeting the Fiber Requirements of Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1463–1481, 1997.

MIKUS, J. H. Diet consistency: Using TMR audits TM to deliver more from your feed, equipment, and people to the bottom line. in High Plains Dairy Conference Proceedings, Amarillo, TX. **Texas Animal Nutrition Council**, Dallas, p. 27–36, 2012.

MILLER, K.; WOOD-GUSH, D. G. M. Some effects of housing on the social behaviour of dairy cows. **Animal Production**, v. 53, p. 271–278, 1991.

MILLER-CUSHON, E. K.; DEVRIES, T. J. Feed sorting in dairy cattle: Causes, consequences, and management. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 4172–4183, 2017.

MILLS, J. A.; KUNG, JR. L.; The effect of delayed filling and application of a propionic acid-based additive on the fermentation of barley silage. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1969–1975, 2002.

MORIEL, P. et al. Method of propionic acid-based preservative addition and its effects on nutritive value and fermentation characteristics of wet brewers grains ensiled in the summertime. **The Professional Animal Scientist**, v. 32, p. 591–597, 2016.

MUCK, R. E. et al. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 3980–4000, 2018.

NAGEL, S. A.; BRODERICK, G. A. Effect of formic acid or formaldehyde treatment of alfalfa silage on nutrient utilization by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 1, p. 140–154, 1992.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7 ed. Washinton, D.C.: National Academic Press. p. 381, 2001.

NEWBOLD, C. J.; RODE, L. M. Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. **International Congress Series**, v. 1293, p. 138–147, 2006.

OLIVEIRA, A. S. et al. Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 6, p. 4587–4603, 2017.

PAHLOW, G. et al. Microbiology of ensiling. American Society of Agronomy, Madison, WI, in **Silage Science and Technology**, p. 31–95, 2003.

PALMQUIST, D. L.; BEAULIEU, A. D.; BARBANO, D. M. Adsa foundation symposium: milk fat synthesis and modification. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 1753–1771, 1993.

PASTORINI, M. et al. Productive performance and digestive response of dairy cows fed different diets combining a total mixed ration and fresh forage. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 5, p. 4118–4130, 2019.

PAZDIORA, R. D. et al. Efeitos da frequência de fornecimento do volumoso e concentrado no comportamento ingestivo de vacas e novilhas em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 10, p. 2244–2251, 2011.

PEDROSO, A. F. et al. Control of Escherichia coli O157:H7 in corn silage with or without various inoculants: efficacy and mode of action. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 3, p. 1098–1104, 2010.

QUITMANN, H.; FAN, R.; CZERMAK, P. Acidic organic compounds in beverage, food, and feed production. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 143, n., p. 91–141, 2014.

RODRIGUES, P. H. M. et al. Efeitos da adição de inoculantes microbianos sobre a composição bromatológica e perfil fermentativo da silagem de sorgo produzida em silos experimentais. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v. 31, n. 6, p. 2373–2379, 2002.

ROSSOW, H. A.; ALY, S. S. Variation in nutrients formulated and nutrients supplied on 5 California dairies. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 7371–7381, 2013.

ROTZ, C. A.; MUCK, R. E. Changes in Forage Quality during Harvest and Storage. In: Forage Quality, Evaluation, and Utilization, Eds. G. C. Fahey, Jr. et al. **American Society of Agronomy**, Madison, WI. p. 828–868, 1994.

RUST, J. W. et al. Intensive rotational grazing for dairy cattle feeding. **Am. Journal Alternative Agricultural**, v. 10, p. 147–151, 1995.

SAHOO, A.; JENA, B. Organic Acids as Rumen Modifiers. **International Journal of Science and Research**, v. 3, p. 2262–2266, 2014.

SANTOS, J. P. et al. Aerobic stability of total mixed ration with added microbial growth inhibitors. **Journal of Dairy Science**. v. 102 p. 204, (Abstract), 2019.

SAS Institute. 2011. SAS/STAT 9.4 User's Guide. No. Cary, NC. **SAS Institute Inc.**, Cary, NC.

SCHERER, R.; GERLACH, K.; SUDEKUM, K. H. Biogenic amines and gamma-amino butyric acid in silages: Formation, occurrence and influence on dry matter intake and ruminant production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 210, n., p. 1–16, 2015.

SCHINGOETHE, D. J. A 100-Year Review: Total mixed ration feeding of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10143–10150, 2017.

SCHMIDT, R. J.; KUNG, JR. L. The effects of *Lactobacillus buchneri* with or without a homolactic bacterium on the fermentation and aerobic stability of corn silages made at different locations. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 1616–1624, 2010.

SEPPÄLÄ, A. et al. Controlling aerobic stability of grass silage-based total mixed rations. **Animal Feed Science and Technology**, v. 179, p. 54–60, 2013.

SHABI, Z. et al. Effects of extrusion of grain and feeding frequency on rumen fermentation, nutrient digestibility and milk yield and composition in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p.1252–1260, 1999.

SHAVER, R. D. Rumen acidosis in dairy cattle: Bunk management considerations. University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada. **Advanced Dairy Technology**, v. 14, p. 241–249, 2002.

SHINGFIELD, K. J. et al. Dietary Fish Oil Supplements Modify Ruminal Biohydrogenation, Alter the Flow of Fatty Acids at the Omasum, and Induce Changes in the Ruminal Butyrovibrio Population in Lactating Cows. **The Journal of Nutrition**, v. 142, n. 8, p. 1437–48, 2012.

SILVA, T. H. et al. Effects of dietary fibrolytic enzymes on chewing time, ruminal fermentation, and performance of mid-lactating dairy cows. **Animal Feed Science Technology**, v. 221, p. 35–43, 2016.

SILVEIRA, C. et al. Selection of barley grain affects ruminal fermentation, starch digestibility, and productivity of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 6, p. 2860–2869, 2007.

SKLAN, D. et al. Fatty acids, calcium soaps of fatty acids, and cottonseeds fed to high yielding cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2463–2472, 1992.

SNOWDON, M. Total Mixed Rations for Dairy Cattle. Department of Agriculture, **Aquaculture and Fisheries**, v. 20, p. 2013, 1991.

SOVA, A. D. et al. Accuracy and precision of total mixed rations fed on commercial dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 1, p. 562–571, 2014.

SOVA, A. D. et al. Associations between herd-level feeding management practices, feed sorting, and milk production in free-stall dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 4759–4770, 2013.

STONE, B. Reducing the variation between formulated and consumed rations. **Advanced Dairy Technology**, v. 20, p. 145–162, 2008.

SUCU, E.; FILYA, I.; TURGUT, I. The effect of a formic acid-based preservative on structural carbohydrates and nutritive value of low dry matter sweet sorghum silages. **Macedonian Journal of Animal Science**, v. 1, n. 1, p. 129–134, 2011.

SUTTON, J. D. et al. Feeding frequency for lactating cows :effects on rumen fermentation and blood metabolites and hormones. **British Journal of nutrition**, v. 56, p. 181–192, 1986.

TABACCO, E. et al. Effect of *Lactobacillus buchneri* LN4637 and *Lactobacillus buchneri* LN40177 on the aerobic stability, fermentation products, and microbial populations of corn silage under farm conditions. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 5589–5598, 2011.

TAYLOR, C. C. et al. The effect of treating whole-plant barley with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1793–1800, 2002.

TUCKER, W.; RUDE, B.; WITTAYAKUN, S. Performance and Economics of Dairy Cows Fed a Corn Silage-Based Total Mixed Ration or Grazing Annual Ryegrass During Mid to Late Lactation 1. **The Professional Animal Scientist**, v. 17, n. 3, p. 195–201, 2001.

UNDERSANDER, D.; MERTENS, D. R.; THEIX, N. **Forage Analysis Procedure**. In: National Forage Testing Association, USA. Omaha: National Forage Testing Association. 1992, 139 p.

URRUTIA, N. et al. Effect of dietary supplementation of sodium acetate and calcium butyrate on milk fat synthesis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 6, p. 5172–5181, 2019.

VALADARES, R. F. D. et al. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2686–2696, 1999.

WANG, B. et al. An insufficient glucose supply causes reduced lactose synthesis in lactating dairy cows fed rice straw instead of alfalfa hay. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 11, p. 4771–4780, 2016.

WEINBERG, Z. G. et al. Effects of stage of maturity at harvest, wilting and LAB inoculant on aerobic stability of wheat silages. **Animal Feed Science Technology**, v. 158, p. 29–35, 2010.

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

WHITE, S. L. et al. Milk production and economic measures in confinement or pasture systems using seasonally calved Holstein and Jersey cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 1, p. 95–104, 2002.

WHITLOCK, L. A. et al. Effect of level of surface-spoiled silage on the nutritive value of corn silage diets. **Journal of Dairy Science**, 83 (Suppl. 1):110, (Abstr.), 2000.

WILKINSON, J. M.; DAVIES, D. R. The aerobic stability of silage: key findings and recent developments. **Grass and Forage Science**, v. 68, p. 1–19, 2013.

WOOLFORD, M. K. The detrimental effects of air on silage. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, n. 2, p. 101–116, 1990.

ZEBELI, Q. et al. Effects of physically effective fiber on digestive processes and milk fat content in early lactating dairy cows fed total mixed rations. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 2, p. 651–668, 2006.

ZHAO, F. Q. Biology of Glucose Transport in the Mammary Gland. **Springer Link**, v. 19, p. 3–17, 2014.

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**, v. 38, p. 170–189, 2009.