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

**Tempo de armazenamento e manejo do painel no valor nutritivo de silagens
de milho**

Daniel Junges

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

**Piracicaba
2014**

Daniel Junges
Zootecnista

Tempo de armazenamento e manejo do painel no valor nutritivo de silagens de milho

Orientador:
Prof. Dr. **LUIZ GUSTAVO NUSSIO**

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

**Piracicaba
2014**

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

Junges, Daniel

Tempo de armazenamento e manejo do painel no valor nutritivo de silagens de milho / Daniel Junges. - - Piracicaba, 2014.
149 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Amido 2. Fibra em detergente neutro 3. Nitrogênio uréico leite 4. Estabilidade aeróbia 5. Prolamina 6. Topo vs. base I. Título

CDD 636.08552
J95t

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

*“Se tiver o hábito de fazer as coisas com alegria,
raramente encontrará situações difíceis”*

Baden Powell

*“...e assim a vida segue acontecendo nos detalhes,
nos desvios e nas surpresas...”*

Marta Medeiros

*A todos os integrantes do grupo de
Qualidade e Conservação de Forragens - QCF,
a cada um que ofereceu seu esforço, seu suor,
sua competência, seu tempo, sua alegria,
e uma parte da sua vida
transformada em amizade.*

DEDICO

*Nilo, Anastacia e Juarez,
meus queridos pai, mãe e irmão, exemplo
de família. Tudo o que sou hoje é
reflexo do caráter de vocês,
meu grande modelo.*

*Joane Eichler,
minha amada noiva,
inspiração e porto seguro,
que palavras usar para expressar todo
sentimento... sempre ao meu lado para essa
conquista. Te amo.*

A vocês, OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Talvez escrever essa tese, não tenha sido um desafio tão grande quanto agradecer de maneira plena, todas as pessoas as quais tive a oportunidade de conhecer, conviver e confirmar grandes amizades, foi um tempo onde a matemática não fechou, pois aprendi que ao dividir eu somei. Obrigado a todos com os quais eu pude dividir e somar muito como pessoa.

À Deus por acompanhar-me em todos os momentos de minha vida, por ter me dado uma família maravilhosa e por todos que colocastes em meu caminho...

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo e ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade de realizar o programa de doutoramento.

À coordenação do curso de pós-graduação em Ciência Animal e Pastagens, em especial ao Prof. Dr. Sila Carneiro da Silva, exemplo de entrega e dedicação.

Aos professores do curso de pós-graduação em Ciência Animal e Pastagens do Departamento de Zootecnia, cada um contribuiu com uma peça fundamental nessa obra.

Ao Prof. Dr. Patrick Schmidt, sem o qual não teria chegado até aqui. Sou eternamente agradecido.

Ao Prof. Dr. Luiz Gustavo Nussio, por me aceitar como orientado, pelos ensinamentos em todas as esferas possíveis, exemplo de profissional e munido de sabia destreza para gerenciar pessoas, sou muito agradecido. Levarei uma enorme bagagem de conhecimento e crescimento pessoal para a vida.

Aos inesquecíveis companheiros (as) do QCF: João Luiz Pratti Daniel, Rafael Camargo do Amaral, Maity Zopollatto, Adir de Sá Neto, Mateus Castilho Santos, Álvaro Wosniak Bispo, Letícia Custódio, Paula de Almeida Carvalho, Janaina Rosolem Lima, Greiciele Moraes, Cristiano Kleinshmitt, Maria Cecília Moraes Kleinshmitt com apenas alguns meses de vida, Maximiliano Henrique de Oliveira Pasetti, Edward Hernando Cabezas García, Janielen da Silva, João Pedro Pereira Winckler, Pedro Augusto Ribeiro Salvo, Juliana Fernandes. Aos estagiários (as), Bleine Bach, Fernando Jacovaci, Igor Freitas, Gustavo Vidotti Caldas Morone, João Marcos Meneghel de Moraes, Carol Picinini, Amanda, Cesar Augusto Figueiredo, Alsiane Capelesso, Juliane Taiz Calgaro, Dheyme Cristina Bolson, Caroline Nienow, Patrícia Eloísa Tormen, Luana Caroline Souza Rosa Araújo, Evandro Schonell, Carla Mariane Marassatto. Como agradecer a cada um ??? (foram tantos) que dividiram sua

paciência, ajuda, alegria e tristeza comigo. Posso garantir que de cada um de vocês levo muito. Pessoas somente são pessoas com outras pessoas. Muito obrigado!

Ao professor de língua inglesa Antônio Augusto Bianchi, entusiasta e ótimo profissional. Thank you very much !

A professora de língua alemã Jaqueline Pascholati Dalio, sempre dispondo de muita atenção e profissionalismo. Vielen Dank !

Aos companheiros de república, Carlos Eduardo Oltramari (Dudu), Gustavo Nápoles, Diego Pequeno (A Grande Família), bons tempos, obrigado pela parceria, conversas, discussões filosóficas e incentivos.

Aos funcionários, Laureano, Daiane, Juscelino, Émerson, Marco Penati, Wagner, Neco, Robson, Benedito, Natalino, Miranda, Afonso quanta peleia..., sempre encarada com muita boa vontade e bom humor, ao final sempre deu tudo certo. Obrigado pela disposição e ajuda em cada aperto resolvido. Devo muito.

As secretárias, Cláudia, Creide e Sandra, obrigado pela sua amizade e alegria.

As amizades realizadas durante o período que estive na ESALQ/USP, Steben Crestani, Eliana Geremia, Laíz Pamplona, Maicon Sbardella, Claiton Zotti, Maria Luiza Nunes, Lucas Chagas, Junior Issamu Yasuoka, Cléo Fialho, Pedro L. Monteiro Junior, Fernanda, L.M. Silva, Lilian E. T. Pereira, Carolina Guerra, Julia Segat, Amanda Lemes.

Ao técnico do laboratório de Bromatologia Carlos Cesar Alves, pela amizade, e ajuda nas análises de laboratório.

À Karime Pissinato e Erica Casarini Silva pelas conversas e pela ajuda na correria de papelada e eventos. Forte abraço.

À inesquecível Tânia Ferri (Taninha), obrigado por cuidar de mim, por todo seu carinho e amizade.

Ao CNPq e CAPES pela bolsa de estudo cedida.

À todos que de alguma forma participaram dessa etapa em minha vida.

Bom, parece de fato que a matemática ficou louca, foram tantas experiências divididas que resultaram uma grande soma.

Se ficou a saudade, é porque a fórmula estava certa.

MUITO OBRIGADO

BIOGRAFIA

DANIEL JUNGES, filho de Anastacia Schneider Junges e Nilo João Junges nasceu em Saudades, Estado de Santa Catarina, aos 12 de dezembro de 1982. Coursou o ensino fundamental no Colégio Estadual Rodrigues Alves, no município de Saudades, Estado de Santa Catarina.

Realizou o ensino médio na Escola Interna Rainha dos Apóstolos, onde foi Seminarista junto a Congregação São Vicente Pallotti, no município de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul durante o período de 1999 a 2003.

Em março de 2004, iniciou o curso de Zootecnia pela Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro Educacional do Oeste – UDESC/CEO, município de Chapecó, Estado de Santa Catarina, recebendo o título de bacharel em Zootecnia em dezembro de 2008.

Em março de 2009, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Departamento de Zootecnia do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná - UFPR, município de Curitiba, Estado do Paraná, recebendo o título de mestre em Ciências Veterinárias em dezembro de 2010.

Em fevereiro de 2011, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens em nível de doutorado do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo – ESALQ/USP, município de Piracicaba, Estado de São Paulo, que encerra em agosto de 2014 com a defesa do presente trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	17
LISTA DE FIGURAS	19
LISTA DE TABELAS	23
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	25
1 INTRODUÇÃO.....	27
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1 Silagem de milho e aditivos microbianos	31
2.2 Tempo de armazenamento e valor nutritivo de silagens.....	34
2.3 Tempo de armazenamento e estabilidade aeróbia	39
2.4 Silos de larga escala	42
2.5 Manutenção da anaerobiose	43
2.6 Instabilidade aeróbia e descarregamento da silagem	45
Referências	48
3 ALTERAÇÕES DE QUALIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO DE SILAGENS DE MILHO.....	56
Resumo	56
Abstract.....	57
3.1 Introdução	58
3.2 Material e Métodos	59
3.2.1 Local do Experimento.....	59
3.2.2 Ensilagem e tratamentos	60
3.2.3 Perda total de matéria seca durante o armazenamento	61
3.2.4 Produção de gases	61
3.2.5 Amostragens	62
3.2.6 Coleta de amostras na ensilagem e nas aberturas dos silos experimentais	62

3.2.7 Análise químico-bromatológica	63
3.2.8 Análise de pH e microbiologia	65
3.2.9 Ensaio de estabilidade aeróbia	66
3.2.10 Ensaio de degradabilidade <i>in situ</i>	66
3.2.11 Análises estatísticas	69
3.3 Resultados e Discussão	69
3.3.1 Características da planta de milho no momento da ensilagem	69
3.3.2 Características químico-bromatológicas das silagens	72
3.3.3 Produtos de fermentação e microbiologia	78
3.3.4 Perdas de matéria seca durante armazenagem	84
3.3.5 Estabilidade aeróbia	86
3.3.6 Degradabilidade ruminal do amido	93
3.3.7 Degradabilidade ruminal da fibra	97
3.3.8 Modelagem da degradabilidade da matéria seca <i>in situ</i> de silagem de milho	99
3.3.9 Correlações	101
3.10 Conclusões	107
Referências	109
4 EFEITO DA ESTRATÉGIA DE DESCARREGAMENTO NO VALOR NUTRITIVO DE SILAGEM DE MILHO PARA VACAS LEITEIRAS	117
Resumo	117
Abstract	118
4.1 Introdução	119
4.2 Material e Métodos	120
4.2.1 Local do Experimento	120
4.2.2 Ensilagem e tratamentos	120
4.2.3 Rações experimentais e manejo alimentar	121
4.2.4 Gradiente de temperatura no painel do silo	125

4.2.5 Animais e instalações experimentais	126
4.2.6 Produção e composição do leite.....	126
4.2.7 Digestibilidade aparente <i>in vivo</i>	127
4.2.8 Determinação de derivados de purinas	129
4.2.9 Análises estatísticas	129
4.3 Resultados e Discussão.....	129
4.4 Conclusão	140
4.5 Considerações finais	141
Referências.....	143

RESUMO

Tempo de armazenamento e manejo do painel no valor nutritivo de silagens de milho

No experimento I, objetivou-se avaliar os efeitos de aditivos microbianos e tempo de armazenamento na qualidade de silagens de milho. A cultura do milho foi ensilada sem aditivos (Controle) ou com inoculantes contendo bactérias lácticas homofermentativas (*Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici*) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas ou heterofermentativas (*Lactobacillus buchneri*) aplicados na dose 1×10^5 ufc/g. As silagens foram armazenadas em silos experimentais durante 3, 7, 15, 30, 60, 210, 390, 480 ou 570 dias. Foram avaliados: composição químico-bromatológica, produtos de fermentação, perfil microbiológico, perdas fermentativas, estabilidade aeróbia e degradabilidade ruminal *in situ*. Os inoculantes não afetaram a maior parte das variáveis estudadas. Entretanto, *L. buchneri* aumentou a concentração de ácido acético das silagens e diminuiu a deterioração aeróbia, confirmada pelo menor acúmulo térmico durante o ensaio de estabilidade aeróbia. O teor de carboidratos solúveis diminuiu ao longo do tempo de armazenamento, reflexo do metabolismo dos açúcares em produtos de fermentação. As concentrações da prolamina como esperado diminuíram e as concentrações de nitrogênio amoniacal e proteína solúvel aumentaram com os tempos de armazenagem prolongados, reflexo da ocorrência de proteólise na silagem de milho. O pH da silagem diminuiu rapidamente nos primeiros sete dias de armazenamentos mantendo-se estável para os demais tempos de estocagem, diferente do ocorrido para a concentração de ácido acético, que aumentou com o tempo de armazenamento. Verificou-se diminuição na contagem de bactérias lácticas e leveduras ao longo do armazenamento. A produção de gás e a perda de matéria seca aumentaram com o tempo de armazenamento. O tempo de armazenamento aumentou todas as variáveis de EA. Os ganhos mais significativos para a EA se deram até aproximadamente 60 dias de armazenamento. A degradação ruminal de amido e, conseqüentemente de MS, foi incrementada ao longo do armazenamento. No experimento II, objetivou-se avaliar o desempenho de vacas leiteiras em função da estratégia de descarregamento da silagem de milho em silo do tipo trincheira: silagem de milho oriunda da metade superior do silo (topo) ou silagem de milho oriunda da metade inferior do silo (base). Foram utilizadas 24 vacas alocadas em 12 blocos casualizados, com arranjo de reversão simples com períodos de 21 dias. Os animais foram alojados em confinamento *tie-stall*. As dietas foram iso-protéicas (16,5%) e iso-amiláceas (17,0%), com 60% de silagem de milho (% MS). O consumo de matéria seca, produção e composição do leite foram determinados entre os dias 15 e 21 de cada período experimental. Apesar da silagem oriunda da base do silo levar à maior digestibilidade da dieta e menor concentração de nitrogênio ureico do leite (8,95 e 11,35 mg/dL) não houve efeito da dieta no consumo de matéria seca nem na produção de leite. Sob condições ótimas de manejo, a estratégia de descarregamento da silagem de milho não afeta o desempenho de vacas leiteiras.

Palavras-chave: Digestibilidade; Nitrogênio ureico; Silagem base; Silagem topo; Temperatura

ABSTRACT

Storage period and face management on the nutritional value of corn silage

In the experiment I, the aim was to evaluate the effects of microbial additives and length of storage on the quality of corn silage. Whole-corn plants were ensiled without or with inoculants containing homofermentative (*Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* + cellulolytic and hemicellulolytic enzymes) or heterofermentative lactic acid bacteria (*Lactobacillus buchneri*) applied at 1×10^5 cfu/g. Treated forages were packed and stored in experimental silos for 3, 7, 15, 30, 60, 210, 390, 480, and 570 days. Samples were evaluated for chemical composition, fermentation end-products, microbial counts, fermentation losses, aerobic stability, and ruminal degradability *in situ*. Inoculants did not affect most of the variables studied. However, *L. buchneri* increased acetic acid concentration and decreased aerobic deterioration of silages, as indicated by the lower heat accumulation during the exposure to air. Soluble carbohydrates decreased across the storage period, reflecting the conversion of soluble sugars to fermentation end-products. Concentrations of prolamin decreased, whereas ammonia and soluble protein concentrations increased over the storage period, indicating the proteolysis. The silage pH declined rapidly in the first seven days of storage and remained stable for the remaining storage period, unlike for acetic acid concentration that increased with storage period. On the other hand, counts of lactic acid bacteria and yeasts decreased during the storage. Gas production and dry matter loss increased with the length of storage. The storage period increased all variables stability aerobic. Most of significant improvements in stability aerobic were observed during the first 60 days of storage. Ruminal degradability of starch and, consequently, dry matter increased along the storage. In the experiment II, the aim was to evaluate the influence of strategy of silage unload on the performance of dairy cows. Corn silage from a bunker silo was separated at unloading as silage from the upper half of the silo (top) or from the lower half of the silo (bottom) and used to compose total mixed rations fed to 24 lactating cows allocated in 12 randomized blocks, arranged in a cross-over design with 21 periods. Cows were housed in a tie-stall barn. All diets contained 60% of corn silage and were iso-nitrogen (16.5% CP) and iso-starch (17.0% of starch). Dry matter intake, milk yield and composition were determined from day 15 to 21 in each period. Although silage from bottom led to higher total tract DM digestibility and lower milk urea nitrogen concentration (8.95 vs. 11.35 mg/dL), most of evaluated variables were not affected by treatments. Under optimal silo management, the strategy used to unload corn silage does not affect the performance of dairy cows.

Keywords: Corn silage; Length of storage; Degradability; Milk urea nitrogen

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Efeito do tempo de armazenamento (t) na digestibilidade *in vitro*-7 h de amido (DigAmido), incluindo efeito aleatório de experimento. Se $t < 28,4$, então $\text{DigAmido} = 63,7 + 0,31 \times t$; se $t \geq 28,4$, $\text{DigAmido} = 72,5 + 0,028 \times (t - 28,4)$; $P < 0,01$; $R^2 = 0,68$; raiz do quadrado médio do erro (RQME) = 2,80.....36
- Figura 2 - Efeito do tempo de armazenamento (t) na digestibilidade *in vitro*-30 h de FDN (DigFDN), incluindo efeito aleatório de experimento. $\text{DigFDN} = 60,51 - 0,0059 \times t$; $P < 0,01$; $R^2 = 0,22$; RQME = 1,13.....37
- Figura 3 - Efeito do tempo de armazenamento (t) na estabilidade aeróbia (EA), incluindo efeito aleatório de experimento. Se $t < 110,1$, então, $\text{EA} = 93,1 - 0,41 \times (110,1 - t)$; se $t \geq 110,1$, $\text{EA} = 93,1$; $P < 0,01$; $R^2 = 0,35$; RQME = 12,942
- Figura 4 - Determinação da população de leveduras - LEV.....66
- Figura 5 - Determinação da população de bactérias ácido lácticas - BAL.....66
- Figura 6 - Animal utilizado para em saio de degradabilidade *in situ* e alocação dos macro-bags no conteúdo ruminal.....67
- Figura 7 - Confeção e preparo dos macro-bags para ensaio de degradabilidade *in situ*.....67
- Figura 8 - Teores de MS (A), amido (B), PB (C) e cinza (D) das silagens em diferentes tempos de armazenamento. Silagem Controle ($\square$); silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* (1×10^5 ufc/g MV) ($\blacktriangle$); silagem aditivada com *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* (1×10^5 ufc/g MV) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas ($\bullet$); EPM: erro padrão da média.....73
- Figura 9 - Teores de FDN (A), FDA (B), Lignina (C), Hemicelulose (D), das silagens em diferentes tempos de armazenamento. Silagem Controle ($\square$); silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* - (1×10^5 ufc/g MV) ($\blacktriangle$); silagem aditivada com *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* - (1×10^5 ufc/g MV) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas ($\bullet$); EPM – erro padrão da média.....74
- Figura 10 - Teores de CSE (A), N-NH₃ (B), proteína solúvel (C), prolamina (D) das silagens em diferentes tempos de armazenamento. Silagem Controle $\square$; silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* - (1×10^5 ufc/g MV) ($\blacktriangle$); silagem aditivada com

Lactobacillus plantarum + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* - (1×10^5 ufc/g MV) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (●); EPM – erro padrão da média 77

Figura 11 - Teores de ácido láctico (A), ácido acético (B), pH (C) das silagens em diferentes tempos de armazenamento. Silagem Controle (□); silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* - (1×10^5 ufc/g MV) (▲); silagem aditivada com *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* - (1×10^5 ufc/g MV) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (●) ; EPM – erro padrão da média 81

Figura 12 - Relação láctico:acético (A) e etanol (B), das silagens em diferentes tempos de armazenamento. Silagem Controle (□); silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* - (1×10^5 ufc/g MV) (▲); silagem aditivada com *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* - (1×10^5 ufc/g MV) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (●); EPM – erro padrão da média 82

Figura 13 - População de levedura (A) e bactéria láctica (B), das silagens em diferentes tempos de armazenamento. Silagem Controle (□); silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* - (1×10^5 ufc/g MV) (▲); silagem aditivada com *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* - (1×10^5 ufc/g MV) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (●); EPM – erro padrão da média 84

Figura 14 - Gás (A), recuperação de matéria seca (RECMS) (B) silagens em diferentes tempos de armazenamento. Silagem Controle (□); silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* - (1×10^5 ufc/g MV) (▲); silagem aditivada com *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* - (1×10^5 ufc/g MV) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (●); EPM – erro padrão da média 86

Figura 15 - Estabilidade aeróbia, (A); $\Sigma 5d$, (B) e $\Sigma 10d$, (C) das silagens em diferentes tempos de armazenamento. Silagem Controle (□); silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* - (1×10^5 ufc/g MV) (▲); silagem aditivada com *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* - (1×10^5 ufc/g MV) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (●); EPM – erro padrão da média..... 87

- Figura 16 - HTmax, (A) e Tmax (B) das silagens em diferentes tempos de armazenamento. Silagem Controle ($\square$); silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* - (1×10^5 ufc/g MV) ($\blacktriangle$); silagem aditivada com *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* - (1×10^5 ufc/g MV) ($\bullet$) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas; EPM – erro padrão da média..... 91
- Figura 17 - PMS-EA das silagens em diferentes tempos de armazenamento. Silagem Controle ($\square$); silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* - (1×10^5 ufc/g MV) ($\blacktriangle$); silagem aditivada com *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* - (1×10^5 ufc/g MV) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas ($\bullet$); EPM – erro padrão da média..... 92
- Figura 18 - DEG24-amido (A) e DEG48-amido (B), das silagens em diferentes tempos de armazenamento. Silagem Controle ($\square$); silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* - (1×10^5 ufc/g MV) ($\blacktriangle$); silagem aditivada com *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* - (1×10^5 ufc/g MV) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas ($\bullet$); EPM – erro padrão da média 94
- Figura 19 - DEG24-FDN (A) e DEG48-FDN (B) das silagens em diferentes tempos de armazenamento. Silagem Controle ($\square$); silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* - (1×10^5 ufc/g MV) ($\blacktriangle$); silagem aditivada com *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* - (1×10^5 ufc/g MV) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas ($\bullet$); EPM – erro padrão da média 98
- Figura 20 - Influência do tempo de armazenamento sobre a degradabilidade *in situ* da matéria seca (MS). Amostras frescas foram incubadas em macro-bag durante 24h (DEG24-MS) ou 48h (DEG48-MS). As linhas com traços e pontilhadas demonstram os valores previstos pelo modelo *broken-line* (quadrático, linear) ... 101
- Figura 21 - Correlação positiva entre nitrogênio amoniacal, N-total e degradabilidade do amido, % do amido após 24 h de incubação *in situ* (DEG24-amido): $y = 9,6$ Nitrogênio amoniacal + 31,2; RQME = 4,62 (A). Correlação positiva entre nitrogênio amoniacal, N-total e degradabilidade do amido, % do amido após 48 h de incubação *in situ* (DEG48-amido) : $y = - 4,4$ Nitrogênio amoniacal² + 30,1 Nitrogênio amoniacal + 45,2; RQME = 3,76 (B) 102

- Figura 22 - Correlação positiva entre proteína solúvel e degradabilidade do amido, % do amido após 24 h de incubação *in situ* (DEG24-amido) : $y = 0,74 \text{ Proteína solúvel} + 26,6$; RQME = 3,64 (A). Correlação positiva entre proteína solúvel e degradabilidade do amido, % do amido após 48 h de incubação *in situ* (DEG48-amido) : $y = - 0,04 \text{ Proteína solúvel}^2 + 3,8 \text{ Proteína solúvel} + 11,2$; RQME = 2,13 (B) 103
- Figura 23 - Correlação negativa entre prolamina, % MS e degradabilidade do amido, % do amido após 24 h de incubação *in situ* (DEG24-amido) : $y = 128,6 \text{ Prolamina}^2 - 369,3 \text{ Prolamina} + 307,2$; RQME = 7,84 (A). Correlação negativa entre prolamina, % MS e degradabilidade do amido, % do amido após 48 h de incubação *in situ* (DEG48-amido) : $y = 79,2 \text{ Prolamina}^2 - 242,7 \text{ Prolamina} + 261,2$; RQME = 3,63 (B)..... 105
- Figura 24 - Ilustração esquemática do silo trincheira com os tratamentos de silagem de milho... 121
- Figura 25 - Pontos de controle de temperatura com termômetro de bulbo, no painel do silo 126
- Figura 26 - Imagem térmica da face exposta do silo após descarregamento diário (o silo trincheira não apresentou áreas visivelmente degradadas), temperatura máxima (42,0 °C); temperatura mínima (27,0 °C); temperatura de referência (28,8 °C). Escala de temperatura (°C) está apresentada abaixo da imagem 135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados meteorológicos dos meses de dezembro de 2010 a março de 2011, referente aos meses de desenvolvimento da cultura de milho para ensilagem na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”-Esalq/USP, município de Piracicaba/SP	60
Tabela 2 - Composição bromatológica da planta de milho na ensilagem	64
Tabela 3 - Valores de probabilidade para efeitos de aditivo (A) e tempo de armazenamento (T) na composição química bromatológica	72
Tabela 4 - Valores de probabilidade para efeitos de aditivo (A) e tempo de armazenamento (T) nos produtos de fermentação e perfil microbiológico de silagens de milho ...	78
Tabela 5 - Valores de probabilidade para efeitos de aditivo (A) e tempo de armazenamento (T) na produção de gás e recuperação de matéria seca de silagens de milho	85
Tabela 6 - Valores de probabilidade para efeitos de aditivo (A) e tempo de armazenamento (T) na estabilidade aeróbia de silagens de milho.....	87
Tabela 7 - Valores de probabilidade para efeitos de aditivo (A) e tempo de armazenamento (T) na degradabilidade <i>in situ</i> amido 24h (DEG24-amido, % amido), degradabilidade <i>in situ</i> amido 48h (DEG48-amido, % amido) de silagens de milho.....	93
Tabela 8 - Valores de probabilidade para efeito de aditivo (A) e tempo de armazenamento (T) na degradabilidade <i>in situ</i> do FDN 24h, (DEG-FDN24h, % FDN), degradabilidade <i>in situ</i> FDN 48h, (DEG-FDN48h, % FDN) de silagens de milho.....	97
Tabela 9 - Critérios dos modelos não lineares utilizados na avaliação da degradabilidade da matéria seca em silagem de milho nos diferentes tempos de armazenamento	100
Tabela 10 - Composição bromatológica das silagens de milho.....	123
Tabela 11. Composição das rações experimentais	123
Tabela 12 - Produtos de fermentação das silagens de milho.....	124
Tabela 13 - Composição do leite e desempenho de vacas leiteiras alimentadas com silagem de milho proveniente dos tratamentos Topo ou Base armazenadas em silo trincheira por 190 dias.....	132

Tabela 14 - Excreção urinária de derivados de purina e balanço de nitrogênio no animais alimentados com as silagens experimentais	133
Tabela 15 - Coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes das rações contendo 60% de silagem de milho e 40% de concentrados	136
Tabela 16 - Valores de energia e NDT das dietas em vacas holandesas em lactação alimentadas com silagem de milho contendo 60% de silagem de milho e 40% de concentrado	138
Tabela 17 - Índice de seleção (IS) de vacas leiteiras alimentadas com os tratamentos contendo silagens de milho impostos durante o experimento	139

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Sigma 10d$	acúmulo de temperatura após dez dias de exposição aeróbia
$\Sigma 5d$	acúmulo de temperatura após cinco dias de exposição aeróbia
BAL	bactéria ácido láctica
ΔN	balanço de nitrogênio
CCS	contagem de células somáticas
Cf	concentração fecal do marcador
CIA	critério de informação de Akaike
CMS	consumo de matéria seca
CN	consumo de nitrogênio
CNF	carboidrato não fibroso
CSE	carboidrato solúvel em álcool
COV	compostos orgânicos voláteis
D	digestibilidade aparente
DA	digestibilidade do amido
DEG-AMIDO	degradabilidade <i>in situ</i> do amido
DEG-FDN	degradabilidade <i>in situ</i> da fibra em detergente neutro
DEG-MS	degradabilidade <i>in situ</i> da matéria seca
dT	temperatura de referência
EA	estabilidade aeróbia
ED	energia digestível
EE	extrato etéreo
EF	<i>Enterococcus faecium</i>
EL	energia líquida
EL	energia líquida
EM	energia metabolizável
EPM	erro padrão da média
FDA	fibra em detergente ácido
FDN	fibra em detergente neutro
HEM	hemicelulose
HTmax	horas para alcançar a temperatura máxima
Im	ingestão do marcador

IS	índice de seleção
LB	<i>Lactobacillus buchneri</i>
LEV	levedura
LIG	lignina
Log	logaritmo
LP	<i>Lactobacillus plantarum</i>
MM	matéria mineral
MO	matéria orgânica
MS	matéria seca
MV	matéria verde
NDT	nutrientes digestíveis totais
FEZES _{Nutri.}	nutriente nas fezes
N-fecal	nitrogênio nas fezes
N-leite	nitrogênio no leite
N-NH ₃	nitrogênio amoniacal
Nr	nutriente na ração
NUL	nitrogênio ureico do leite
N-URINA	nitrogênio na urina
PA	<i>Pediococcus acidilactici</i>
PB	proteína bruta
Pf	produção fecal
pH	potencial hidrogeniônico
PMS	perda total de matéria seca
PMS-EA	perda total de matéria seca durante ensaio de estabilidade aeróbia
RCMS	recuperação da matéria seca
RQME	raíz do quadrado médio do erro
SMBASE	silagem de milho base
SMTOP	silagem de milho topo
Tmax	temperatura máxima
TMP	tamanho médio de partícula
ufc	unidade formadora de colônia

1 INTRODUÇÃO

A mais antiga descrição de produção de silagem data de 1842, é de autoria de Grieswald e foi publicada no *Transactions of the Baltic Society for the Promotion of Agriculture* (MILES, 1895). A partir desse momento até os dias atuais, as mudanças e transformações bioquímicas que ocorrem na planta forrageira do momento da ensilagem até a obtenção do produto final (silagem) é objeto de estudo de pesquisadores em todo o mundo.

Na busca constante para maximizar a produção de silagem, assim como garantir a manutenção de suas características alimentares, conhecimento científico e tecnologias foram sendo desenvolvidas ao longo do tempo para melhorar as condições de produção de alimentos conservados. Dentre as quais podemos citar o melhoramento das plantas forrageiras, as diversas maneiras de armazenamento, o conhecimento do momento ideal de corte e armazenamento, desenvolvimento de inoculantes microbianos específicos para silagem, capazes de otimizar o processo de fermentação e minimizar as perdas (inoculantes homoláticos), ou ainda, inoculantes específicos em manter a qualidade da forragem por mais tempo, durante a fase de exposição aeróbia (inoculantes heteroláticos).

Embora essa tecnologia de aditivos no processo de ensilagem tenha respaldo científico e comprovado benefício para a qualidade das silagens, segundo Bernardes e Rêgo (2014) em pesquisa realizada em fazendas brasileiras de gado de leite, somente 27,7% dos entrevistados disseram que aplicam algum tipo de aditivo nas culturas para silagem. Esses números são ainda menores conforme Bernardes; Carvalho e Silva (2012) em estudo realizado na região Sul do Brasil, onde somente 18% dos produtores com atividade leiteira utilizam aditivos microbianos na silagem de milho. Novinski (2013) verificou que somente 31,4% das propriedades fazem uso de aditivo microbiano na silagem de milho e 74% não fazem uso de quaisquer tipos de aditivos na ensilagem. Esses números podem estar sugerindo desconhecimento do produto, custos elevados e descontentamento com o resultado dos aditivos utilizados nas silagens.

Dessa maneira, a qualidade fermentativa da silagem é influenciada por fatores inerentes à planta e ao ambiente. Dentre os quais, destacam-se o teor de umidade da cultura e a presença ou não de oxigênio dentro do silo que afetam sobremaneira a população microbiana, podendo, favorecer o crescimento de bactérias desejáveis como as produtoras de ácido lático, ou de outra forma, permitir que microrganismos indesejáveis desenvolvam-se, utilizando substratos da planta ou os produtos de fermentação sem, contudo, contribuir para a conservação do material ensilado.

Em levantamento recente realizado no Brasil, a maior parte da silagem é armazenada em silos do tipo trincheira Bernardes e Rêgo (2014), esses silos geralmente estão expostos a penetração do ar, em especial nas partes superiores e próximo às paredes, que são difíceis de compactar e vedar de forma adequada (ASHBELL; LISKER, 1988). Em condições tropicais, em particular quando as estratégias de vedação não são eficientes, a silagem visualmente deteriorada pode atingir 10% da massa ensilada, enquanto que com um procedimento de vedação adequada, as perdas visuais podem ser reduzidas à 3% (AMARAL et al., 2012). Köhler et al. (2013) avaliando método para cálculo das perdas de MS de 18 silos trincheira, verificaram média de 10% de perdas de MS e como orientação do valor de perdas de matéria seca, indicaram valor máximo aceitável de 8% como perdas inevitáveis em silo do tipo trincheira, independente da cultura.

A deterioração aeróbia também diminui a qualidade higiênica de silagem, pois há risco de proliferação de microrganismos indesejáveis, incluindo os patogênicos (LINDGREN; OLDENBURG; PAHLOW, 2002). Assim, as silagens das regiões superiores do silo (Topo), podem ser de pior qualidade quando comparadas aquelas silagens de regiões mais inferiores do silo (Base) e podem apresentar impacto negativo sobre o desempenho dos animais.

O conhecimento gerado até os dias atuais promoveu o consenso geral de que o processo de ensilagem estabiliza em cerca de três semanas, no entanto, existem evidências convincentes que mudanças na composição química e microbiológica de silagem ocorrem por muito mais tempo (DER BEDROSIAN; NESTOR; KUNG, 2012; HOFFMAN et al., 2011; , KUNG; WINDLE; WALKERT, 2014; YOUNG et al., 2012). Como por exemplo, vários estudos têm relatado que a digestibilidade da matéria seca (MS) de silagens aumenta acentuadamente com o tempo de armazenamento, ocasionada por meio de mecanismos proteolíticas naturais que ocorrem no silo, aumentando a disponibilidade de amido (KUNG, 2013).

Recentemente, com o aperfeiçoamento de laboratórios e das análises quantitativas e qualitativas e a interdisciplinaridade do conhecimento, foi possível compreender fenômenos observados no passado, mas que não eram totalmente compreendidos. Processos bioquímicos da conservação que alteram positivamente o alimento original podem ser usados a favor da eficiência da produção com redução dos impactos ambientais.

Neste contexto, o objetivo do atual experimento foi avaliar a influência do tempo de armazenamento e aditivos microbianos sobre a qualidade fermentativa, estabilidade aeróbia, degradabilidade dos nutrientes, comparar modelos matemáticos sobre a degradabilidade em

silagem de milho sob efeito de fermentação prolongada e avaliar as diferenças na qualidade da silagem de milho (TOPO e BASE) sobre o desempenho de vacas leiteiras.

Para organizar a distribuição dos trabalhos desenvolvidos nesta tese, foi realizada a redação da tese em forma de capítulos, sendo:

- Capítulo I com o título: **Revisão de literatura**, tem o objetivo de situar o atual estudo dentro da grande área de pesquisa e relatar ao leitor, o atual “estado da técnica” da pesquisa, contextualizando-o.

- Capítulo II com o título: **Alterações de qualidade durante o armazenamento de silagens de milho**, tem o objetivo de verificar a eficiência da utilização de aditivo microbiano em silagem de milho e avaliar o efeito do tempo de armazenamento sobre as características qualitativas e nutricionais da silagem.

- Capítulo III com o título: **Efeito da estratégia de descarregamento no valor nutritivo de silagem de milho para vacas leiteiras**, tem o objetivo de avaliar as diferenças na qualidade da silagem de milho submetidas a diferentes estratégias de descarregamento do silo (TOPO e BASE) sobre o desempenho de vacas leiteiras.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Silagem de milho e aditivos microbianos

De todas as forrageiras utilizadas para a alimentação animal, o milho (*Zea mays* L.) é a mais empregada para produção de silagem de alta qualidade. A silagem de milho destaca-se mundialmente como o volumoso mais utilizado em confinamentos e semi-confinamentos, em virtude de seu elevado teor de energia por quilograma de matéria seca e rendimento em produtividade por área. Essa forragem é recomendada, pelas suas características de qualidade, facilidade de fermentação, boa aceitação pelos animais e bons rendimentos em desempenho animal (OLIVEIRA et al., 2007).

Durante o tempo de fermentação da forragem, podem ocorrer processos que acarretam perdas de nutrientes nas mais diversas magnitudes. Essas perdas ocorrem ao longo do período de ensilagem na forma de efluente e gases, devendo ser evitadas para não proporcionar prejuízos ao processo fermentativo, as quais podem chegar a 33% da massa ensilada (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Índices fermentativos podem indicar a extensão das perdas de nutrientes e energia, assim como estabilidade de armazenamento da silagem em condições anaeróbias. Tecnologias como o uso de aditivos microbianos no processo de ensilagem têm por objetivo minimizar as perdas fermentativas e elevar a estabilidade da silagem em aerobiose. Na ensilagem do milho, o uso de aditivos deve garantir que bactérias lácticas dominem a fermentação, resultando em uma silagem adequadamente preservada. Conforme Kung, (2009) os aditivos microbianos, entre outras funções, devem inibir também o crescimento de microrganismos aeróbios após a abertura dos silos, em especial aqueles associados à instabilidade aeróbia, como exemplo as leveduras e fungos.

As bactérias homoláticas produtoras de ácido láctico (BAL) devem elevar a sua população dentro do silo em relação às colônias epifíticas existentes na forragem, com isso, elevar a produção de ácido láctico e favorecer o adequado processo de fermentação anaeróbia (PAHLOW, 1991). A fermentação por BAL, ocorre pela via glicolítica anaeróbia de açúcares (glicose e frutose) à ácido láctico com reduzidas perdas de energia 0,7 a 1,7% (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Além disso, a utilização dos inoculantes microbianos promove a redução da proteólise e a deaminação da proteína, com uso mais adequado dos carboidratos solúveis e consequentemente, maior retenção dos nutrientes na silagem (KUNG; STOKES; LIN, 2003).

Kung (2009) demonstrou que a inoculação com aditivos microbianos, reduziu o pH, elevou a razão ácido láctico:ácido acético e diminuiu o teor de nitrogênio amoniacal em mais de 60% dos estudos. Em recente estudo de meta-análise, Schmidt, Souza e Bach (2014), revisaram 37 trabalhos científicos publicados nos últimos 10 anos, que avaliaram o uso de aditivos em silagens de milho. Conforme os autores, a bactéria homolática (heterofermentativa facultativa) mais estudada na ensilagem de milho é o *Lactobacillus plantarum* (LP). Wilkinson e Davies (2013) comentam que a bactéria LP somente é homolática quando utiliza açúcares monossacarídeos de seis carbonos (hexoses), quando utiliza açúcares monossacarídeos de cinco carbonos (pentoses) é heterolática. Conforme Pahlow et al. (2003) afirmam que as bactérias homofermentativas que fermentam os açúcares hexoses em ácido láctico, são incapazes de fermentar pentoses por falta da enzima fosfocetolase, já as bactérias heterofermentativas facultativas, fermentam hexoses como as homofermentativas, mas produzem além da enzimas aldolase, também fosfocetolase para fermentar os açúcares pentoses.

No entanto, Schmidt, Souza e Bach (2014) observaram que dentre os oito trabalhos que avaliaram a inoculação com o LP como aditivo isolado, nenhum proporcionou melhora substancial na qualidade da silagem, em 40% dos trabalhos, o aditivo reduziu a estabilidade aeróbia e as respostas sobre as perdas foram inconclusivas. Kung (2009), em trabalho de revisão de literatura, verificaram que bactérias ácido lácticas melhoraram a EA em somente 33% dos estudos, e em muitos casos, houve piora na estabilidade aeróbia. Contudo, uma vez aberto o silo para consumo, o ácido láctico é usado no metabolismo das leveduras, servindo como substrato dessas, sendo necessárias outras estratégias de ação, a exemplo, bactérias produtoras de ácido acético (heterofermentativas).

O desenvolvimento de uma cepa heterofermentativa *Lactobacillus buchneri* (LB), foi alvo de estudos com o objetivo de empregar alternativas que controlassem a deterioração durante a exposição da silagem ao ar (WEINBERG; MUCK, 1996). As bactérias heterofermentativas metabolizam o ácido láctico e a glicose presentes durante a fermentação para síntese de ácido propiônico e ácido acético, eficazes no controle de fungos e demais microrganismos deterioradores, em meio de baixo pH. Essas bactérias fermentam glicose, produzindo ácido láctico e etanol, sendo a frutose fermentada a ácido láctico, acético e manitol, com perdas elevadas de matéria seca pela produção de gases (5 a 24%) (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). No entanto, o microrganismo *L. buchneri* é capaz de degradar o ácido láctico em ácido acético e concomitante produção de 1,2-propanodiol, bem

como vestígios de etanol Oude Elferink et al., (2001) elevando a concentração do ácido acético como produto final da fermentação (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

O acetato pode ser considerado um ácido pouco eficiente quanto a função em reduzir o pH da silagem, porém a sua ação ocorre sobre o metabolismo de leveduras e fungos filamentosos Danner et al. (2003); Driehuis, Oude Elferink e Spoelstra (1999) os quais constaram redução na contagem de leveduras com o aumento do tempo de armazenamento da forragem. De acordo com Oude Elferink et al. (2001), o *L. buchneri* é capaz de degradar o ácido láctico em condições de anaerobiose, sintetizando o ácido acético, 1,2 propanodiol e traços de etanol. Driehuis, Oude Elferink e Spoelstra (1999) verificaram elevadas concentrações de 1-propanol e ácido propiônico quando a silagem de milho foi inoculada com *L. buchneri* na dose de 1×10^6 ufc/g forragem.

Schmidt, Souza e Bach (2014), em estudo de meta-análise, demonstram que a bactéria ácido láctica mais pesquisada foi o LB, com foco principal em elevar a estabilidade aeróbia. Os autores constaram que 86% dos trabalhos verificaram efeitos positivos na estabilidade aeróbia, decorrente da maior produção do ácido acético e menor contagem de leveduras, no entanto, os autores observaram que somente em um trabalho o aditivo melhorou substancialmente a qualidade das silagens e somente um ensaio foi observado redução nas perdas de matéria seca, dois trabalhos avaliaram o desempenho animal, e um apresentou resultados positivos em consumo de matéria seca e ganho de peso em cordeiros. Kleinschmitt et al. (2013) demonstraram melhorias na estabilidade aeróbia de silagem de milho com doses crescentes do aditivo microbiano *L. buchneri* (zero, 1×10^5 , 5×10^5 e 1×10^6) com valores de 21,5; 25,6; 67,6 e 93,9 horas, esse efeito foi relacionado aos incrementos nos teores de ácido acético que acompanhou o aumento da estabilidade aeróbia, no entanto, o consumo de matéria seca e a produção de leite não foram afetados.

Higginbotham et al. (1998) avaliaram o efeito de inoculantes microbianos contendo bactérias heterofermentativas na ensilagem do milho com diferentes tempos de armazenamento. Os autores verificaram tendência de efeito positivo do inoculante sobre a estabilidade aeróbia, bem como efeito do tempo de abertura sobre os componentes voláteis das silagens. Dessa forma, os aditivos microbianos, devem inibir o crescimento de microrganismos aeróbios e elevar a estabilidade aeróbia das silagens conforme (MOON, 1983; KUNG, 2009). Mari, Schmidt e Nussio (2009) demonstraram que a bactéria *L. buchneri* apresentou comprovada eficácia em silos de larga escala, sendo um meio eficaz de preservação e melhora da estabilidade aeróbia de silagens. Ranjit e Kung (2000), estudando a

deterioração aeróbia em silagem de milho e utilizando o *L. buchneri* verificaram mais de 900 horas de estabilidade para o tratamento com *L. buchneri*.

2.2 Tempo de armazenamento e valor nutritivo de silagens

É de comum conhecimento que o valor nutritivo de silagens é, tipicamente, menor do que aquele da cultura fresca que a deu origem (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991; PAHLOW et al., 2003). Entretanto, pesquisas recentes com silagens de milho e com grãos de milho com alta umidade reportam aumentos de digestibilidade da MS quando as silagens são armazenadas por períodos longos (DER BEDROSIAN; NESTOR; KUNG 2012; HALLADA; SAPIENZA; TAYSOM, 2008; HOFFMAN et al., 2011).

Além disso, Allen (1998) discutiu que a excessiva passagem do grão de milho no trato gastrointestinal de ruminantes, diminuiu a produção de leite quando as vacas eram alimentadas com silagem de milho nova, no entanto, a quantidade de passagem do grão de milho para as fezes diminuiu com o tempo de armazenamento da forragem. Stock et al. (1991), relacionaram isso a provável elevação na solubilização das proteínas do endosperma com o aumento do tempo de armazenamento e são, portanto, menos inibitória para a digestão de amido e consequente queda na produção de leite Kung (2013) quando as vacas passam a receber silagens “novas”, ou seja, silagens fermentadas por períodos curtos. Provavelmente isto ocorre porque o aporte total de energia líquida consumida pelos animais diminui quando a silagem “nova” passa a compor a dieta, devido a menor digestibilidade desta silagem comparativamente à silagem produzida no ano anterior (HALLADA; SAPIENZA; TAYSOM, 2008). Ao contrário de vacas com menor produção de leite, que podem compensar baixa digestibilidade da dieta com aumento de consumo; vacas de alta produção apresentam queda de desempenho quando a digestibilidade da dieta diminui. Em animais de alto desempenho o consumo de matéria seca é normalmente regulado por enchimento ruminal (ALLEN, 2000; MERTENS, 1994).

Embora o pH da silagem reduza rapidamente e estabiliza por volta de três a sete dias após a colheita, períodos entre 21 a 30 dias tem sido amplamente divulgado como tempo adequado para a fermentação (KUNG, 2013). Dessa forma, vários trabalhos corroboram que a fermentação prossegue além dos três a sete dias, com aumentos significativos de ácido lático, etanol e nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) entre sete e 120 dias após a colheita (BOLSEN et al., 1992). Trabalhos de Der Bedrosian, Nestor e Kung, 2012; Young et al. (2012) também

verificaram elevação nos teores de N-NH_3 ao longo do armazenamento da silagens de milho. Em silagens de milho, a amônia é considerada produto de deaminação de aminoácidos (McDONALD; HENDERSON; HERON 1991; PAHLOW et al., 2003). Como a atividade da maior parte das proteases provenientes de células vegetais é inativada pelo abaixamento de pH Heron; Edwards e Phillips (1989), o aumento na concentração de N-NH_3 sugere proteólise microbiana, incluindo quebra da fração proteica constituinte do endosperma do grão.

Der Bedrosian, Nestor e Kung (2012), verificaram correlações significativas ($P < 0,0005$ e $R^2 = 0,78$) entre a proteína solúvel e a digestibilidade do amido, porém, não encontraram efeito ($P > 0,10$) entre nitrogênio amoniacal e a digestibilidade do amido. Kung, Windle e Walker (2014) encontraram elevadas correlações com diferença significativa ($P < 0,0001$) entre N-NH_3 e a digestibilidade *in vitro* do amido. Ferraretto et al. (2014) também verificaram elevadas correlações, ($R^2 = 0,61$ e $R^2 = 0,55$) ($P = 0,001$) entre N-NH_3 e proteína solúvel respectivamente para silagens de milho grão úmido.

A matriz proteica que envolve os grânulos de amido em grãos de milho é composta primariamente de prolaminas, no milho essa prolamina é definida como ‘Zeína’ e representa fator inibitório à digestão de amido (HOFFMAN et al., 2011). A exemplo, Giuberti; Galo e Masoero (2012) verificaram 1,2% de prolamina na MS em silagens de milho planta inteira, colhida com média de 33,9% de MS e 25,1% de amido na MS.

Nesse sentido, Newbold et al. (2006) reportaram aumento na degradabilidade ruminal do amido de silagens de milho armazenadas por 60 a 300 dias (53,2 e 69,0%) respectivamente. Der Bedrosian, Nestor e Kung (2012) verificaram aumentos de 10,5 unidades percentuais na digestibilidade do amido após 360 dias de armazenamento, enquanto Hallada, Sapienza e Taysom (2008) verificaram incremento de 4,6 unidades percentuais na digestibilidade do amido de silagens de milho armazenadas por 330 dias.

Dessa maneira, com o objetivo de verificar quais os ganhos efetivos do tempo de estocagem sobre a digestibilidade do amido Daniel, Junges e Nussio, (2014) realizaram estudo de meta-análise e verificaram que a digestibilidade desse componente aumentou 0,31 unidades percentuais por dia, até 28 dias de armazenamento e, após esta fase, a taxa de incremento de digestibilidade caiu 10 vezes para aproximadamente 0,03 unidades percentuais por dia. Sendo que a digestibilidade do amido aumentou de forma contínua, de acordo com Daniel, Junges e Nussio (2014), os maiores benefícios ocorrem no primeiro mês de fermentação (Figura 1).

Figura 1 - Efeito do tempo de armazenamento (t) na digestibilidade *in vitro*-7 h de amido (DigAmido), incluindo efeito aleatório de experimento. Se $t < 28,4$, então $\text{DigAmido} = 63,7 + 0,31 \times t$; se $t \geq 28,4$, $\text{DigAmido} = 72,5 + 0,028 \times (t - 28,4)$; $P < 0,01$; $R^2 = 0,68$; raiz do quadrado médio do erro (RQME) = 2,80

Em alguns experimentos, o processo de ensilar a planta inteira do milho proporcionou alterações nos teores de carboidratos presentes na planta. Hallada, Sapienza e Taysom (2008) verificaram aumento constante na degradabilidade *in situ* da fibra em detergente neutro (D-FDN) em silagens de milho, elevando-se 1,2 unidades percentuais ao mês entre o dia 1 e 330 de armazenamento, atingindo um platô aos 330 dias. No entanto, Cone et al. (2008), constataram que 180 dias de armazenamento da silagem não afetou a digestibilidade da porção fibra *in vitro*. Dados de Der Bedrosian, Nestor e Kung (2012) para 45 e 315 dias de armazenamento também não afetaram a digestibilidade *in vitro* da FDN. Sanderson (1993) não verificaram diferença ($P > 0,05$) para a digestibilidade do FDN, apresentando valores de 65,9; 62,1 e 62,7% de digestibilidade do FDN para a forragem fresca e armazenada por 40 e 186 dias respectivamente. Young et al. (2012) verificaram que a digestibilidade do FDN da silagem de milho diminuiu uma unidade percentual com os tempos de armazenamento ($P < 0,02$). CVAS (2013) estudaram a digestibilidade do FDN a partir de um grande banco de dados, e verificaram que a digestibilidade do FDN parece não ser afetada pelo tempo de fermentação. Weinberg e Chen (2013) encontraram maior digestibilidade do FDN para a forragem fresca de milho em relação às digestibilidade da silagem, no entanto, para os demais tempos de estocagem, os autores verificaram tendência de redução da digestibilidade do FDN.

Contudo, Daniel, Junges e Nussio (2014) em estudo de meta-análise para determinar a influência do tempo de estocagem na digestibilidade da fração fibra em detergente neutro, observaram que a digestibilidade do FDN diminuiu ao longo do tempo de armazenamento (Figura 2).

Figura 2 - Efeito do tempo de armazenamento (t) na digestibilidade *in vitro*-30 h de FDN (DigFDN), incluindo efeito aleatório de experimento. $\text{DigFDN} = 60,51 - 0,0059 \times t$; $P < 0,01$; $R^2 = 0,22$; RQME = 1,13

Os autores reportam que enquanto as alterações na fração lignina são insignificantes Morrison (1979) a hemicelulose é parcialmente solubilizada (DER BEDROSIAN; NESTOR; KUNG, 2012; YAHAYA et al., 2001;). Assim, por efeito de diluição, a perda de porções da parede celular com maior digestibilidade culmina em menor digestibilidade do restante da fibra que permanece inalterada.

Stock et al. (1991) verificaram que a fermentação da silagem de grão úmido, aumentou a solubilização da proteína, podendo aumentar a disponibilidade de amido no rúmen, e portanto, menos amido irá escapar da degradação ruminal. Para Stock et al. (1991) o tempo de armazenamento foi correlacionado positivamente com digestão de amido ($R^2 = 0,91$), e teor de ácido lático ($R^2 = 0,96$) e negativamente correlacionado com o teor de MS ($R^2 = -0,95$) no entanto, a premissa dos ácidos orgânicos serem responsáveis pelo aumento da digestibilidade do amido é questionada a partir do trabalho de (HOFFMAN et al., 2011)

Evidências apontam que a atividade proteolítica bacteriana pode explicar os aumentos de digestibilidade da fração amido da silagem. Em revisão realizada por Hoffman et al. (2011) é frequente a hipótese de que as proteínas hidrofóbicas ‘zeínas’ são degradadas no processo de ensilagem, e assim, maior acesso das bactérias do rúmen aos grânulos de amido. Proteínas como a zeína nas ligações proteína-amido são potencialmente degradadas no processo de ensilagem por solubilização ou pela atividade proteolítica.

A proteína zeína é altamente insolúvel em água ou fluido ruminal, porém solúvel em ácido láctico e acético (LAWTON, 2002). No entanto, há evidências que o processo de proteólise ocorre mais intensamente por meio da ação de enzimas bacterianas Baron, Stevenson e Buchanan-Smith (1986); Vierstra (1996), em relação a solubilização por ácidos (lático ou acético). Essa hipótese pôde ser levantada a partir do ensaio com silagem de milho de grão úmido, onde o aumento na concentração desses ácidos em relação à silagem controle aos 240 dias de armazenamento não foram verificadas evidências de alterações nas subunidades (α , β , γ e δ) da proteína zeína (HOFFMAN et al., 2011).

Conforme revisão de Glover e Mertz, 1987, esse cita Duvick (1961) como quem propôs pela primeira vez que, os corpos proteicos podem ser os locais onde as zeínas são armazenadas. Por sua vez, esses corpos proteicos são formados no lúmen do retículo endoplasmático e subsequentemente a síntese de zeínas continua para além do retículo endoplasmático, utilizando as mensagens dos ribossomos externos para os corpos proteicos. Ainda conforme o autor, endospermas de milho normais, iniciam a produção da proteína zeína com cerca de 12 dias após a polinização, sendo mais ativo dos 16 aos 35 dias e pouco ou nenhum aumento em zeína com aproximadamente 50 dias após a polinização.

As zeínas estão intrínsecas ao grânulo de amido e localizadas principalmente na superfície do grânulo de amido (MU-FORSTER; WASSERMAN, 1998). No entanto com o avanço da maturidade, as zeínas penetram para uma posição mais central, encapsulando o amido (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000). Esse invólucro sobre o amido em silagens de milho foi definido como sendo um impedimento físico para a máxima digestão do amido em ruminantes (OWENS; ZINN; JIM, 1986). Glover e Mertz, 1987 citam trabalho de Gorham (1822) como responsável por realizar os primeiros estudos com a proteína do milho, no qual os grãos de milho apresentavam 3,3% de proteína solúvel em álcool (zeína) e constituía 40% da proteína total. Mais recentemente, Hamaker et al. (1995) verificaram que as zeínas compõem 50 a 60% da proteína total do milho, sendo 62 a 74% da zeína presente no endosperma.

A baixa qualidade da proteína do milho é devido a deficiência dos aminoácidos lisina e triptofano sendo a zeína deficiente nesses dois aminoácidos, e de fato, no início dos experimentos, ratos alimentados com zeína como única fonte de proteína, morreram em curto espaço de tempo, contudo, embora a porcentagem de proteína do grão aumente, a qualidade da proteína diminuí, porque uma parte desproporcional é devido a síntese da proteína zeína (GLOVER e MERTZ, 1987).

Dessa forma, para a nutrição de ruminantes, os teores de zeínas traduzem-se em reduções das taxas de digestão ruminal do amido, uma vez que essas proteínas são insolúveis em água assim como no líquido ruminal (LAWTON, 2002). Dessa forma, para a digestão do amido, exige-se inicialmente a ação de bactérias proteolíticas ruminais para degradar as zeínas antes da ação das bactérias amilolíticas do rúmen sobre os grânulos de amido (COTTA, 1988). O sinergismo entre zeínas e a digestão do amido em ruminantes é agravada em função da degradação lenta dessas proteínas pelas bactérias do rúmen. Romagnolo, Polan e Barbeau (1994) observaram que a taxa de degradação ruminal das zeínas, foi 0,026%/h, enquanto a proteína do milho globulina-albumina foi de 0,06%/h. Recentemente, Kung, Windle e Walker (2014) encontraram elevadas correlações e diferença significativa ($P < 0,0001$) entre a prolamina e a digestibilidade *in vitro* do amido, sendo maior a digestibilidade a medida que os teores de proteína solúvel aumentam e os teores de prolamina diminuem. Contudo, Hoffman et al., (2011) verificaram aumento da solubilidade das proteínas do milho em tratamento com borato-fosfato, sugerindo que as proteínas tornaram-se menos hidrofóbicas com o avanço no tempo de armazenamento. O grau de encapsulamento do amido por proteínas na ensilagem aliado a intensidade de fermentação e duração do tempo de armazenamento da ensilagem, podem ser fatores determinantes regulatórios do grau de dissociação das proteínas aos grânulos de amido em silagem de milho de planta inteira.

2.3 Tempo de armazenamento e estabilidade aeróbia

O método para avaliar a deterioração aeróbia em escala de experimentos de laboratório, foi proposto pela primeira vez na década de 70 por pesquisadores alemães Pahlow e Muck, (2009) e foi desenvolvida nos anos subsequentes até que se tornou uma metodologia padronizada Ranjit e Kung (2000), que hoje é adotada em vários experimentos para mensurar a estabilidade aeróbia de silagens submetidas a diferentes condições (inoculação, características da cultura, rações, tempos de armazenamento dentre outros).

Durante o período de armazenamento, inevitavelmente, um pouco de oxigênio irá penetrar na silagem, seja por difusão ou por algum dano físico da tampa de proteção. No entanto, após a abertura do silo, o contato da massa ensilada com o oxigênio é inevitável e desencadeia o crescimento de microrganismos aeróbios e como consequência dá-se início ao processo de deterioração aeróbia, também conhecido como “quebra da estabilidade aeróbia” iniciado por leveduras tolerantes á ácidos, ou no caso da silagem de milho, ocasionalmente, bactérias ácido acéticas (MOON; ELY, 1979; SPOELSTRA et al., 1988).

Como o processo de deterioração continua ao longo do tempo, o valor de pH sobe e outros microrganismos continuam o processo de degradação (SÁ NETO, 2012). O acompanhamento da temperatura da silagem é o indicativo mais comum da estabilidade do material após a abertura dos silos, sendo desejável à um bom aditivo a postergação do aquecimento da forragem e, conseqüentemente, a redução nas perdas de matéria seca nessa etapa.

Higginbotham et al. (1998) ao avaliar o efeito de aditivos heteroláticos na silagem de milho armazenadas por 21 e 90 dias verificaram semelhanças entre os valores de Tmax, HTmax para os diferentes tempos de estocagem. De forma geral, as diferenças de temperatura que ocorreram na silagem de milho ao longo do armazenamento são uma maneira indireta de avaliar a qualidade da silagem. Sanderson (1993) verificaram 96 e 190 horas de EA e picos de temperatura de 40 e 32°C para silagens de milho armazenadas por 40 e 186 dias respectivamente.

No trabalho de Nishino et al. (2003) os níveis de ácido acético e os efeitos sobre a estabilidade aeróbia foram mais acentuados em silagens armazenadas por 120 em relação a 60 dias de armazenamento. Conforme Nishino et al. (2003), Driehuis, Oude Elferink e Spoelstra (1999) isto pode apoiar a hipótese de que a maior EA, é devido, principalmente, a ação antifúngica do ácido acético produzido principalmente pelas bactérias inoculadas de *L. buchneri*. Nishino et al., (2004) estudaram o efeito de aditivos microbianos (*Lactobacillus casei* ou *Lactobacillus buchneri*) e efeito do tempo de estocagem (10 ou 60 dias) em silos de laboratório, os mesmos apontaram para a possível melhora da estabilidade aeróbia mesmo em períodos curtos de armazenagem.

Kleinschmit e Kung (2006a) em estudo com aditivos para silagem de milho armazenadas por 14, 28, 42, 56, 70, 282, 361, verificaram valores de estabilidade aeróbia de 80, 111, 95, 118, 126, 131 e 141 horas para silagem controle e 118, 102, 102, 156, 138, 99, 280 horas para as silagens tratadas com aditivo microbiano respectivamente. Os mesmos

autores verificaram tendência ($P < 10$) para as silagens tratadas com aditivo, ser mais estável aos 14 e 56 dias de armazenamento em relação à silagem controle e diferença ($P < 0,05$) aos 361 dias para as silagens aditivadas em relação a silagem controle. Diferentemente, Junges et al. (2013) não verificaram efeito do aditivo heterolático utilizado na silagem de milho, independente do tempo de armazenamento 30, 60, 90 ou 120 dias.

De modo geral, Bayatkouhsar, Tahmasbi e Naserian (2012) estudando aditivos microbianos e estabilidade aeróbia em silagem de milho ao longo do tempo de armazenamento (45 e 90 dias), as silagens armazenadas por 90 dias foram numericamente inferiores na estabilidade aeróbia em relação às silagens armazenadas por 45 dias. Driehuis, Oude Elferink e Spoelstra (1999) observaram valores de estabilidade aeróbia de 39, 32, 37 horas para silagem controle e 38, 56 e 135 horas de estabilidade aeróbia para a silagem de milho tratada com o aditivo microbiano *L. buchneri* na dose 2×10^5 ufc/g e armazenadas por 7, 28 e 56 dias respectivamente. Para Sá Neto et al. (2013) os efeitos de doses do aditivo *L. buchneri* ao longo do tempo de armazenamento, comprovaram a elevação da estabilidade aeróbia, 39,3; 64,5; 169,7 e 153,6 horas para o tratamento com *L. buchneri* aplicado na dose de 1×10^6 ufc/g, esses valores são superiores quando comparados ao tratamento controle, 38,1; 44,8; 41,5 e 45,9 horas para os períodos 15, 60, 90 e 150 dias respectivamente. No mesmo trabalho, o número de leveduras também caiu ao longo do tempo de armazenagem, sugerindo controle nas perdas de matéria seca. Sendo assim, uma explicação para este fato é a ocorrência de microrganismos epífitos (ex. *L. buchneri*) capazes de converter ácido láctico em ácido acético e propiônico Driehuis, Oude Elferink e Spoelstra (1999) que são potentes antifúngicos. Kleinschmit e Kung (2006b) realizaram estudo de meta-análise em função da preocupação de que o microrganismo *L. buchneri*, devido a sua natureza heterolática pudesse elevar as perdas de matéria seca, no entanto, o estudo mostrou que as perdas de matéria seca, em silagem de milho pela maior aplicação do microrganismo *L. buchneri* foi de 1 ponto percentual maior em relação a silagem não tratada. Dessa forma, com os benefícios na melhora da estabilidade aeróbia, essas perdas, não parecem ser justificadas pelo resultado da meta-análise. Ainda no mesmo estudo, as silagens de milho sem aditivo; com o microrganismo *L. buchneri* (na dose de aplicação < 100.000 ufc/g forragem fresca) e com o microrganismo *L. buchneri* (na dose de aplicação > 100.000 ufc/g forragem fresca) apresentaram 25; 35 e 503 horas de estabilidade respectivamente.

Dessa forma, no tópico anterior, pôde-se observar o aumento de digestibilidade de silagens de milho armazenadas por períodos longos. Entretanto, além da digestibilidade dos nutrientes, alterações na estabilidade aeróbia poderiam contribuir de forma indireta para o

maior valor nutritivo das silagens estocadas por mais tempo. Para determinar a influência do tempo de armazenamento na estabilidade aeróbia de silagens de milho, Daniel, Junges e Nussio (2014) realizaram estudo de meta-análise de trabalhos que abordaram o tema estabilidade aeróbia ao longo do tempo de armazenamento (Figura 3).

Figura 3 - Efeito do tempo de armazenamento (t) na estabilidade aeróbia (EA), incluindo efeito aleatório de experimento. Se $t < 110,1$, então, $EA = 93,1 - 0,41 \times (110,1 - t)$; se $t \geq 110,1$, $EA = 93,1$; $P < 0,01$; $R^2 = 0,35$; RQME = 12,9

Os mesmos autores verificaram que a estabilidade aeróbia aumentou 0,4 hora por dia até 110 dias de armazenamento. Portanto, para que a estabilidade aeróbia seja maximizada, os mesmos recomendaram estocar a silagem por no mínimo 3 a 4 meses.

2.4 Silos de larga escala

As forragens de modo geral, podem ser armazenadas em diversos tipos de silos: silo tipo torre, superfície, trincheira, fardo, bolsa dentre outros (SAVOIE; JOFRIET, 1998). No entanto, em função das vantagens como: facilidade de manejo, custo e capacidade de armazenamento, os silos do tipo trincheira e de superfície (silos horizontais) são muito comuns nas propriedades pecuárias do Brasil, porém, quando mal manejados, esses silos expõem uma grande quantidade de forragem aos efeitos indesejáveis do meio ambiente (BOLSEN, 1993). Além do ambiente, silos horizontais estão expostos a interações com a

permeabilidade das paredes, apresentam grande área de exposição da superfície durante o enchimento, a taxa de retirada assim como o tempo de armazenamento são fatores que permitem elevar as perdas durante o armazenamento (GORDON, 1967).

2.5 Manutenção da anaerobiose

A vedação diminui a exposição da massa ensilada ao oxigênio, permitindo o crescimento de microrganismo desejáveis ao processo de fermentação, ainda, a vedação serve como mecanismo físico de proteção contras as intempéries climáticas (ex: chuva e radiação solar), garantido que os ácidos orgânicos e compostos solúveis não sejam lixiviados. Nesse sentido, um fator fundamental para anaerobiose do silo, é a correta vedação dos silos tipo trincheira, com minimização das perdas visíveis e invisíveis, uma vez que o revestimento auxilia na obtenção de silagem de qualidade. A minimização da entrada do oxigênio ao interior do silo deveria garantir que o ambiente interno fosse totalmente adiabático, mesmo assim, pequenas quantidades de oxigênio podem adentrar e atingir a massa de forragem ensilada. Um dos métodos de cobertura, e também, um dos mais comuns, é a cobertura com filme plástico de polietileno, o qual permite formar um ambiente anaeróbico dentro silo, separando-o da atmosfera circundante.

Berger e Bolsen (2006) verificaram as perdas de matéria seca em silos do tipo trincheira a partir de duas profundidades no silo, 0 a 45 e 45 a 90 cm a partir da superfície do silo. As perdas foram reduzidas pela mentada na camada de 0 a 45 cm quando usado filme plástico na vedação do silo, e na profundidade entre 45 a 90 cm as perdas foram aproximadamente 75% menores quando o silo foi vedado. É comum observar em silos de grande escala, camadas de aproximadamente 20 a 30 cm de silagem totalmente degradada, esses silos geralmente foram mal vedados ocasionando a deterioração da forragem, que por sua vez, torna-se um alimento impróprio ao consumo dos animais e deve ser descartado, elevando as perdas de forragem no silo (McDONELL; KUNG, 2006).

Amaral et al. (2009a e 2009b) avaliaram diferentes estratégias de vedação em silos com silagens de planta inteira de milho. Foram avaliados diferentes tipos de filmes (filme dupla face de polietileno de 200 μ m e filme OS). Na ocasião, foram utilizados silos de 500 L, os quais foram abertos após 90 dias de armazenamento. O padrão fermentativo e as perdas de MS não foram influenciados pelo tipo de filme. Amaral (2011) testando diferentes tipos de filmes plásticos para cobertura em silos do tipo trincheira observou redução ($P < 0,05$) no percentual de silagem descartada entre os diferentes tratamentos. O autor observou que a

maior quantidade de silagem descartada do silo tipo trincheira foi para os tratamentos com filme plástico preto e lona dupla face, 7,42 e 5,96% da MS respectivamente, os menores valores foram para os tratamentos com cobertura de filme plástico transparente de poliamida (45 μm) recoberta por lona de polietileno dupla face (200 μm) e filme plástico de polietileno reciclado preto (200 μm) recoberta com 0,10 m de bagaço de cana, 3,86 e 2,87% da MS respectivamente. Não houve diferença estatística com relação às perdas de matéria orgânica, permanecendo na média de 29,98%.

Com relação ao valor nutritivo das silagens, Amaral (2011) não verificou diferença significativa entre os tratamentos, no entanto, a resposta do tratamento com filme plástico preto recoberto com 0,10 m de bagaço de cana, apresentou o maior valor na produção de leite, com 2,54 litros a mais em relação à média dos demais tratamentos com filme plástico. O autor comenta que a diferença na resposta de produção de leite dos animais pode estar relacionada com a qualidade nutricional da silagem, uma vez que, os maiores benefícios das tecnologias empregadas na conservação de forragens, auxiliam em redução das perdas de matéria seca dos silos e raramente causam algum efeito de desempenho no animal.

A proteção adicional do bagaço de cana em evitar as perdas de MS, provavelmente ocorra por proporcionar contato íntimo da lona de cobertura com a massa de forragem ensilada, o bagaço de cana, limita o avanço do oxigênio para dentro do silo, ainda, o próprio efeito do bagaço de cana proporciona temperaturas amenas (proteção contra radiação solar), garantindo que a porosidade da lona plástica não altere-se, o que facilitaria as trocas de gases do silo com a atmosfera. Bernardes, Amaral e Nussio (2009b) verificaram diferentes taxas de permeabilidade do oxigênio entre filmes plásticos produzidos a partir de diferentes polímeros. Da mesma forma, Bernardes et al. (2009a) verificaram menores perdas onde, sobre o filme plástico, colocou-se aproximadamente 100 kg de terra por m^2 . Assim, o efeito do bagaço de cana e a terra, são o mesmo provavelmente.

Kuzin e Savoie (2001) estudaram por meio de um modelo matemático, como os diferentes graus de permeabilidade ao oxigênio e as diferentes espessuras de filmes plásticos de polietileno poderiam atuar sobre as perdas de silagem. Os autores utilizaram um perfil de 3 m de profundidade, coberto com filme de polietileno de diferentes espessuras. As espessuras tipicamente utilizadas para cobrir silos tipo trincheira variam entre 0,01 a 0,02 cm, e representam menos de 2% de perdas de matéria orgânica após 300 dias de armazenamento, enquanto a espessura do filme de polietileno de 0,0001 cm as perdas totais de matéria orgânica atingiram 10% após 300 dias de armazenamento. Os mesmos autores, também

indicaram a espessura ideal do filme plástico conforme o tempo de armazenamento. Com o avançar do tempo de estocagem, a solução seria utilizar um filme de polietileno de espessura crescente. Por um tempo de estocagem de 125 dias, recomenda-se utilizar uma cobertura de pelo menos 0,01 a 0,015cm, para períodos superiores a 300 dias é mais econômico utilizar filme de 0,02 cm de espessura.

Em amplo estudo de meta análise Wilkinson e Fenlon (2013) compararam filmes plásticos utilizados na cobertura de silos de grande porte, em termos de perdas durante o armazenamento e estabilidade aeróbia da silagem. Foi utilizado um perfil entre 10 a 60 cm a partir do topo do silo para as amostragens e avaliações. Os autores verificaram efeito ($P < 0,05$) para as perdas de matéria seca e a estabilidade aeróbia entre o filme plástico de polietileno padrão e o *oxygen barrier* (OB). O filme plástico OB reduziu 8,1 unidades percentuais as perdas de MS e elevou em 59,2 horas a estabilidade aeróbia quando comparado ao filme plástico de polietileno padrão.

No entanto, apesar dos resultados serem favoráveis para a utilização de tecnologias em vedação, como filmes plásticos, é possível por meio de práticas simples e sem muito custo, como a utilização de bagaço de cana Amaral (2011) e Bispo (2013) ou outro material como a terra Bernardes (2009), podem apresentar excelentes resultados na manutenção qualitativa-higiênica da forragem conservada.

2.6 Instabilidade aeróbia e descarregamento da silagem

Após a abertura do silo, perde-se a condição anaeróbia e dá-se início a fase de exposição da forragem ao oxigênio. A partir desse momento a massa ensilada torna-se potencialmente degradável, sujeita a ação de microrganismos deterioradores. Conforme Pitt e Muck (1993); Weinberg e Ashbell (2003), a entrada de oxigênio (influxo) é diretamente influenciado pela massa específica obtida durante a ensilagem do silo. Contudo, as regiões laterais do silos, são as mais propensas a oxidação e deterioração (D'AMOURS; SAVOIE, 2005).

A qualidade nutritiva da silagem, temperatura do ambiente, taxa de retirada da silagem e tempo que a face exposta do silo permanece em contato com o oxigênio, determinam o grau de deterioração aeróbia da silagem (ASHBELL et al., 2002 e WEINBERG; ASHBELL, 2003).

A penetração de oxigênio nas áreas periféricas do silo pode atingir até 4 m a partir da superfície do silo, principalmente se não houver nenhuma camada de material, ou somente pneus sobre o filme plástico que veda a superfície do silo, essas situações sugerem que a taxa

de remoção diária de silagem deve ser maior que 0,30 m por dia ou 2,10 m por semana para evitar a extensa degradação aeróbia (BORREANI; BERNARDES; TABACCO, 2008). Ainda em fazendas comerciais no Norte da Itália, foi observado a ocorrência de 10% de silagem degradada na superfície exposta dos silos quando a taxa de descarregamento semanal foi inferior a 1,0 e 1,5 m durante o inverno e verão respectivamente (BORREANI; BERNARDES; TABACCO, 2008).

Taxas de remoção de 1,10-1,50 m por semana são recomendados por Pitt; Muck (1993) na face exposta do silo. Em condições de temperatura ambiente mais elevada ou com maior umidade, as taxas de remoção recomendadas são de 1,35-2,10 m, podendo chegar a 3,15 m por semana (BERGER; BOLSEN, 2006). Recentemente, Borreani, Bernardes e Tabacco (2008); Borreani e Tabacco (2010) demonstraram em desenho esquemático da face exposta de um silo, as regiões que mais apresentaram deterioração aeróbia da silagem, os mesmos verificaram que as regiões superficiais e periféricas do silo sendo as principais áreas com degradação aeróbia, enquanto que em regiões mais ao centro e base dos silos não apresentaram degradação.

Borreani e Tabacco (2010) apresentaram a termografia da face exposta de painel de silo trincheira, como sendo um exemplo da aplicação das medidas de temperatura da silagem em fazendas. Os autores mensuraram as temperaturas de dois silos do tipo trincheira, os quais apresentaram-se de forma distinta, no silo “A” somente uma pequena área apresentou temperatura superior a 5°C em relação a temperatura de referência (temperatura de referência é a temperatura medida a 40 cm de profundidade na região central do silo), o qual representou 3,7% da superfície total da silagem, enquanto que o silo “B” apresentou 23,2% de degradação aeróbia em relação a temperatura de referência. Os autores verificaram temperaturas de até 54,5 °C nas regiões periféricas dos silos como também, quando a temperatura do painel do silo foi maior que 5°C em relação à temperatura de referência, a contagem de leveduras foi superior a 5 log ufc/g e pH superior a 4,5.

Alguns produtores tem realizado o manejo de misturar as silagens deterioradas com silagem de boa qualidade ou outros alimentos. Essa prática deve ser evitada, especialmente no manejo nutricional de vacas leiteiras. Recomendações gerais apontam que silagens com contagem 10^4 ufc/g de fungos, são adequadas para o fornecimento aos animais ruminantes, enquanto silagens com níveis superiores a 5×10^6 e 1×10^7 ufc/g devem ser descartadas (CHEN; WEINBERG, 2009).

Dessa forma, as pesquisas de Borreani e Tabacco (2010); Chen e Weinberg (2009) mostram, que os aumentos de temperatura no painel dos silos trincheiras em fazendas estão intimamente correlacionados à atividade microbiana (principalmente o crescimento de fungos), e as mudanças de pH e acompanhamento da temperatura, poderiam ter aplicações práticas, alertando os produtores para o risco da deterioração aeróbia, podendo ser um índice para identificar as perdas invisíveis. Conforme os autores, a avaliação conjunta das áreas visíveis de deterioração, juntamente com medições de temperatura no painel do silo, podem ser uma boa indicação da qualidade da forragem destinada ao consumo dos animais.

Referências

ALLEN, M. Strategies to maximize feed intake and milk yield in early lactation. In: WESTERN CANADIAN DAIRY SEMINAR, 1998. Edmonton, **Proceedings...** Red Deer: Department Agricultural Food, and Nutritional Science, University of Alberta, Edmonton, 13. mar, 1998. p. 45-55.

ALLEN, M.S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, p.1598–1624, 2000.

AMARAL, R.C. **Estratégias de controle da deterioração aeróbia em silagem de milho e seu valor alimentício para vacas em lactação**. 2011. 173p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponivel/em:/11/11139/tde-19102011-144643/pt-br.php>. Acesso em: 20 fev. 2014.

AMARAL, R.C.; DANIEL, J.L.P.; SÁ NETO, A.; BISPO, A.W.; LIMA, J.R.; GARCIA, E.H.; ZOPOLLATTO, M.; SANTOS, M.C.; BERNARDES, T.F.; NUSSIO, L.G. Performance of Holstein cows fed diets containing maize silage from silos with different covering methods. In: KUOPPALA, K.; RINNE, M.; VANHATALO, A. (Ed.). INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 16., 2012, Hämeenlinna. **Proceedings...** Hämeenlinna, 2012. p. 470-471.

AMARAL, R.C.; NUSSIO, L.G.; BERNARDES, T.F.; MURARO, G.; SANTOS, V.P. TOLEDO FILHO, S.G.; GOULART, R.S. Aerobic stability of corn silage from the top of silos submitted to different sealing methods. In: BRODERICK G.A.; ADESOGAN A.T.; BOCHER L.W.; BOLSEN K.K.; CONTRERAS-GOVEA F.E.; HARRISON J.H.; MUCK R.E. (Ed.). INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 15. 2009, Madison. **Proceedings...** Madison, 2009b. p. 199-200.

AMARAL, R.C.; NUSSIO, L.G.; BERNARDES, T.F.; SARTURI, J.O.; MURARO, G.; DANIEL, J.L.P. Top losses in silos containing corn silage according to the sealing method adopted. In: BRODERICK G.A.; ADESOGAN A.T.; BOCHER L.W.; BOLSEN K. K.; CONTRERAS-GOVEA F.E.; HARRISON J.H.; MUCK R.E. (Ed.). INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 15., 2009, Madison. **Proceedings...** Madison, 2009a. p. 197-198.

ASHBELL, G.; LISKER, N. Aerobic deterioration in maize silage stored in a bunker silos under farm conditions in a subtropical climate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 45, p. 307-315, 1988.

ASHBELL, G.; WEINBERG, A.G.; HEN, Y.; FILYA, I. The effects of temperature on the aerobic stability of wheat and corn silages. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, Waukegan, v. 28, p. 261-263, 2002.

BARON, V.S.; STEVENSON, K.R.; BUCHANAN-SMITH, J.G. Proteolysis and fermentation of corn-grain ensiled at several moisture levels and under several simulated storage methods. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 66, p. 451-461, 1986.

BAYATKOUHSAR, J.; TAHMASBI A.M.; NASERIAN A.A. Effects of microbial inoculant on composition, aerobic stability, in situ ruminal degradability and in vitro gas production of corn silage. **International Journal of AgriScience**, Kassel, v. 2, n.9, p. 774-786, 2012.

BERGER, L.L.; BOLSEN, K.K.; 2006. Sealing strategies for bunker silos and drive-over piles. In: **SILAGE FOR DAIRY FARMS: GROWING, HARVESTING, STORING AND FEEDING**, 2006. Ithaca. **Proceedings...**, Ithaca, NY: Natural Resource, Agriculture, and Engineering Service, 2006. p. 266-283.

BERNARDES, T.F.; CARVALHO, I.Q.; SILVA, N.C. A snapshot of maize silage quality on dairy farms in South Brazil. In: KUOPPALA, K.; RINNE, M.; VANHATALO, A. (Ed.). **INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE**, 16., 2012, Hämeenlinna. **Proceedings...** Hämeenlinna, 2012. p. 322-323.

BERNARDES, T.F.; NUSSIO, L.G.; AMARAL, R.C.; SCHOGOR, A.L.B. Sealing strategies to control the top losses of corn silage. In: BRODERICK, G.A.; ADESOGAN, A.T.; BOCHER, L.W.; BOLSEN, K.K.; CONTRERAS-GOVEA, F.E.; HARRISON, J.H.; MUCK, R.E.; (Ed.). **INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE**, 15. 2009, Madison. **Proceedings...** Madison, 2009a. p. 213-214.

BERNARDES, T.F.; RÊGO, C. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, p.1–10, 2014.

BERNARDES, T.F.; AMARAL, R.C.; NUSSIO, L.G. Sealing strategies to control the top losses in horizontal silos. In: **THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION**, 2009, São Pedro. **Proceedings...** São Pedro, 2009b. p. 190-209.

BOLSEN, K.K.; LIN, C.; BRENT, B.E.; FEYERHERM, A.M.; URBAN, J.E.; AIMUTIS, W.R. Effect of silage additives on the microbial succession and fermentation process of alfalfa and corn silage. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 75, p. 3066-3083, 1992.

BOLSEN, K.K.; DICKERSON, J.T.; BRENT, B.E.; SONON, R.N. Jr.; DALKE, B.S.; LIN, C.; BOYER, J.E. Jr. Rate and extent of top spoilage losses in horizontal silos. **Journal of Dairy Science**, Manhattan, v. 76, p. 2940-2962, 1993.

BORREANI, G.; BERNARDES, T.F.; TABACCO, E. Aerobic deterioration influences the fermentative, microbiological and nutritional quality of maize and sorghum silages on farm in high quality milk and cheese production chains. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG. v.37, Supl. p.68-77, 2008.

BORREANI, G.; TABACCO E. The relationship of silage temperature with the microbiological status of the face of corn silage bunkers. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v.93, p.2620-2629, 2010.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry and molecular biology of plants. **American Society of Plant Physiology**, Rockville, MD, v.1, 1,367p, 2000.

CHEN, Y.; WEINBERG, Z.G. Changes during aerobic exposure of wheat silages. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.154, p.76–82, 2009.

CONE, J.W.; VAN GELDER, A.H.; H.A. VAN SCHOOTEN, H.A.; GROTEN, J.A.M. Effects of chop length and ensiling period of forage maize on *in vitro* rumen fermentation characteristics. **Journal of the Royal Netherlands Society for Agricultural Sciences**, Netherland, v. 55, p.155-166, 2008.

COTTA, M. Amylolytic of selected species of ruminal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, p.772-776, 1988.

CUMBERLAND VALLEY ANALYTICAL SERVICES - CVAS. The corn silage Fermometer. Cumberland Valley Analytical Services, Hagerstown, Tech Notes. 2013. Disponível em: < <http://www.foragelab.com/Media/The%20corn%20Silage%20Fermometer6.0.pdf>>. Acesso em: 2 dez. 2013.

D'AMOURS, L.; SAVOIE, P. Density profile of corn silage in bunker silos. **Canadian Biosystems Engineering**, Winnipeg, v. 47, p. 221-228, 2005.

DANIEL, J.L.P.; JUNGES, D.; NUSSIO, L.G. Alterações na qualidade de silagens de milho durante o armazenamento. In: JOBIM, C.C.; CECATO, U.; CANTO, M.W.; BANKUTI, F.I. (eds.). SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 5., 2014. Maringá, **Anais...** Maringá, 2014. p.23-36.

DANNER, H.; HOLZER, M.; MAYRHUBER, E. BRAUN, R. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, n.1, p.562-567, 2003.

DER BEDROSIAN, M.C.; NESTOR, K.E.; KUNG, L. Jr. The effects of hybrid, maturity and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 9, p. 5115-5126, 2012.

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

FERRARETTO, L. F.; TAYSOM, K.; TAYSOM, D.M.; SHAVER, R.D.; HOFFMAN, P.C. Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia-nitrogen, and ruminal in vitro starch digestibility in high-moisture corn samples. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, p.1–7, 2014.

GIUBERTI, G.; GALLO, A.; MASOERO, F. Quantification of zeins from corn, high-moisture corn, and corn silage using a turbidimetric method: Comparative efficiencies of isopropyl and *tert*-butyl alcohols. **Journal of Dairy Science**, Champaign, (Technical note), v. 95, p.3384–3389, 2012.

GLOVER, D.V.; MERTZ, E.T. Corn. In: OLSON, R.A.; FREY, K.J. (Ed.). **Nutritional quality of cereal grains: genetic and agronomic improvement**. Madison, Wisconsin, USA: American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America, 1987. p. 183–336.

GORDON, C. H. Storage losses in silage as affected by moisture content and structure. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.50, 397p. 1967.

HALLADA, C.M.; SAPIENZA, D.A.; TAYSOM, D. Effect of length of time ensiled on dry matter, starch and fiber digestibility in whole plant corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91,(E-Suppl. 1) p.30, (Abstr.). 2008.

HAMAKER, B.R.; MOHAMED, A.A.; HABBEN, J.E.; HUANG, C.P.; LARKINS, B.A. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.72, p.583–588, 1995.

HERON, S.J.E.; EDWARDS, R.A.; PHILLIPS, P. Effect of pH on the activity of ryegrass *Lolium multiflorum* proteases. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.46, p.267–277, 1989.

HIGGINBOTHAM, G.E.; MUELLER, S.C.; BOLSEN, K.K.; DePETERS, E.J. Effects of inoculants containing propionic acid bacteria on fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, p.2185-2192, 1998.

HOFFMAN, P.C.; ESSER, N.M.; SHAVER, R.D.; COBLENTZ, W.K. SCOTT, M.P.; BODNAR, A.L.; SCHMIDT, R. ASHBELLJ.; CHARLEY, R.C. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, p.2465–2474, 2011.

JUNGES, D.; SCHMIDT, P.; NOVINSKI, C.O.; DANIEL, J.L.P. Additive containing homo and heterolactic bacteria on the fermentation quality of maize silage. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 35, n. 4, p. 371-377, Oct.-Dec., 2013.

KLEINSCHMIT, D. H.; KUNG, L. Jr. A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 89, p. 4005–4013, 2006b.

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

KLEINSCHMITT, C.; MORAIS, G., CUSTÓDIO, L.; FERNANDES, F.; SANTOS, M.C.; DANIEL, J.L.P.; NUSSIO, L.G. (2013) Performance of lactating dairy cows fed maize silage with increased dosages of *L. buchneri*. In: RAJČÁKOVÁ, L. (Ed.). INTERNATIONAL CONFERENCE ON FORAGE CONSERVATION, 15., 2013. High Tatras. **Proceedings...** High Tatras, Slovak Republic, 2013. p. 141-142.

KÖHLER, B.; DIEPOLDER, M.; OSTERTAG, J.; THURNER, S.; SPIEKERS, H. Dry matter losses of grass, lucerne and maize silages in bunker silos, **Agricultural and Food Science**, Helsinki, v.22, p.145-150, 2013.

KUNG, L. Jr. Effects of microbial additives in silages: facts and perspectives. In: ZOPOLLATTO, M.; MURARO, G.B.; NUSSIO, L.G. (Ed.). INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 1., 2009. São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2009. p.7-22.

KUNG, L. Jr. STOKES, M.R.; LIN, C.J. Silage Additives. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H.(Ed.). **Silage science and technology**. Madison, Wisconsin, USA:

American Society of Agronomy.; Crop Science Society of America.; Soil Science Society of America, 2003. p. 305–360.

KUNG, Jr. L. The effects of length of storage on the nutritive value and aerobic stability of silages. In: DANIEL, J.L.P.; SANTOS, M.C.; NUSSIO, L.G. (Ed.). **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION**, 3., July 22-23, 2013. Campinas. **Proceedings...**Campinas, 2013. p. 7-19.

KUNG, L. Jr.; WINDLE, M.C.; WALKER, N. The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, p. 1–6, 2014.

KUZIN, V.; SAVOIE, P. Modeling air infiltration in bunker silos to optimize the cover. In: **ANNUAL INTERNATIONAL MEETING SPONSORED**, 2001. Sacramento. **Proceedings...** Sacramento: American Society of Agricultural and Biological Engineers, Saint Joseph, 2001. 10p.

LAWTON, J.W. Zein: a history of processing and use. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 79, p. 1–18, 2002.

LINDGREN, S.; OLDENBURG, E.; PAHLOW, G. Influences of microbes and their metabolites on feed and food quality. In: **GENERAL MEETING OF THE EUROPEAN GRASSLAND FEDERATION**, 19., 2002. La Rochelle. **Proceedings...** La Rochelle, 2002, p. 503-511.

MARI, L.J.; SCHMIDT, R.J.; NUSSIO, L.G.; HALLADA, C.M.; KUNG, L. Jr. An evaluation of the effectiveness of *Lactobacillus buchneri* 40788 to alter fermentation and improve the aerobic stability of corn silage in farm silos: Short communication. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.92, p.1174–1176, 2009.

McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2nd ed. Marlow: Chalcombe Publication, 1991. 340p.

McDONELL, E.E.; KUNG, L. Jr. An update on covering bunker silos. In: **THE VITA PLUS DAIRY SUMMIT**, 2006. Newark, **Proceedings...** Newark, 2006. Disponível em: <<http://ag.udel.edu/anfs/faculty/kung/documents/CoveringBunkerSilos.pdf>>. Acesso em: 31 mar. 2014.

MERTENS, D.R. Regulation of forage intake. In: FAHEY Jr. G. C.; COLLINS, M.; MERTENS, D.R.; MOSER, L.E. (Ed.). **Forage quality, evaluation and utilization**. Madison, WI: American Society of Agronomy, 1994. p. 450–493.

MILES, M. **Silos, ensilage and silage**: a practical treatise on the ensilage of fodder corn. New York:Orange Judd, 1895.p. 19.

MOON, H.J.; ELY, L.O. Identification and properties of yeasts associated with the aerobic deterioration of wheat and alfalfa silages. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 69, n.3, p.153 156, 1979.

MOON, N.J. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.55, n.3, p.453-460, 1983.

MORRISON, I.M. Changes in the cell wall components of laboratory silages and the effect of various additives on these changes. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.93, p.581-586, 1979.

MU-FORSTER, C.; WASSERMAN, B.P. Surface localization of zein storage proteins in starch granules from maize endosperm: proteolytic removal by thermolysin and in vitro cross-linking of granule-associated polypeptides. **Plant Physiology**, Waterbury, v.116, p.1563-1571, 1998.

NEWBOLD, J.R.; LEWIS, E.A.; LAVRIJSSEN, J.; BRAND, H.J.; VEDDER, H.; BAKKER, J. Effect of storage time on ruminal starch degradability in corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, (Suppl. 1), p.190, Abstr. 2006.

NISHINO, N.; YOSHIDA, M.; SHIOTA, H.; SAKAGUCHI, E. Accumulation of 1,2-propanediol and enhancement of aerobic stability in whole crop maize silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v.94, p.800-807, 2003.

NISHINO, N.; WADA, H.; YOSHIDA, M.; SHIOTA, H. Microbial counts, fermentation products, and aerobic stability of whole crop corn and a total mixed ration ensiled with and without inoculation of *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87, p. 2563-2570, 2004.

NOVINSKI, C.O. **Composição de micotoxinas e bromatologia de silagens de milho em silos de grande porte utilizando imagens em infravermelho**. 2013. 85p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013, Disponível em: < <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/31219/R%20-%20D%20-%20CHARLES%20ORTIZ%20NOVINSKI.pdf?sequence=1> >. Acesso: 13 mar. 2014.

OLIVEIRA, J. S.; SOBRINHO, F.S.; REIS, F.A.; SILVA, G.A.; ROSA, S.N.F.; SOUZA, J.J.R.; MOREIRA, F.M.; PEREIRA, J.A.; FIRMINO, W.G. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho destinados à silagem em bacias leiteiras do estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiás, v.1, p.45-50, 2007.

OUDE ELFERINK, S. J.W.H.; KROONEMAN, J.; GOTTSCHAL, J.C.; SPOELSTRA, S.F.; FABER, F.; DRIEHUIS, F. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology** Washington, v.67, p.125-132, 2001.

OWENS, F.N.; ZINN, R.A.; KIM, Y.K. Limits to starch digestion in the ruminant small intestine. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.63, p.1634-1648, 1986.

PAHLOW, G.; MUCK, R.E. Managing for improved aerobic stability. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 15., 2009. Madison. **Proceedings...** Madison, WI: University of Wisconsin, 2009. p. 77-90.

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

PAHLOW, G. Role of microflora in forage conservation. In: CONFERENCE ON FORAGE CONSERVATION TOWARDS, 2000. Braunschweig. **Proceedings...** Braunschweig: Institute of Grassland and Forage Research, 1991. p. 26-36.

PITT, R.E.; MUCK, R.E. A diffusion model of aerobic deterioration at the exposed face of bunker silos. **Journal of Agricultural Engineering Research**, Easton, v. 55, p. 11- 26, 1993.

RANJIT, N.K.; KUNG, L. Jr. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, p.526-535, 2000.

ROMAGNOLO, D.; POLAN, C.E.; BARBEAU, W.E. Electrophoretic analysis of ruminal degradability of corn proteins. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.77, p.1093-1099, 1994.

SÁ NETO, A. **Caracterização microbiológica, parâmetros fermentativos e estabilidade aeróbia em silagens de forragens tropicais com aditivos microbianos**, 2012. 115p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11139/tde-11122012-092200/pt-br.php>. Acesso em: 24 abr. 2014.

SÁ NETO, A.; ZOPOLLATTO, M.; BISPO, A.W.; JUNGES, D.; DANIEL, J.L.P.; SANTOS, M.C.; NUSSIO, L.G. *Lactobacillus buchneri* and storage periods affect the fermentation profile. In: MICHALK, D.L.; MILLAR, G.D.; BADGERY, W.B.; BROADFOOT, K. M. INTERNATIONAL GRASSLANDS CONGRESS, 22., 2013. **Proceedings...** Sydney, Australia, 2013. p. 788-799.

SANDERSON, M.A. Aerobic stability and in vitro fiber digestibility of microbially inoculated corn and sorghum silages. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.71, p. 505-514, 1993.

SAVOIE, P.; JOFRIET, J.C. Entreposage des ensilages. In: COMPTE RENDU DU COLLOQUE SUR LES ENSILAGES. **Conseil des Productions Végétales du Québec**, Québec, 1998. p.19-55.

SCHMIDT, P.; SOUZA, C.M.; BACH, B.C. Uso estratégico de aditivos em silagens: quando usar e como usar. In: JOBIM, C.C.; CECATO, U.; CANTO, M.W.; BANKUTI, F.I. (Ed.). SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 5., 2014. Maringá. **Anais...** Maringá, 2014. p.243-264.

SPOELSTRA, S.F.; COURTIN, M.G.; VAN BEERS, J.A.C. Acetic acid bacteria can initiate aerobic deterioration of maize silage. **Journal of Agricultural Science**, Toronto, v. 111, p. 127–132, 1988.

STOCK, R.A.; SINDT, M.H.; CLEALE, R.M.; BRITTON, R.A. High-moisture corn utilization in finishing cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign ,v. 69, n. 4, p.1645-1656, 1991.

VIERSTRA, R.D. Proteolysis in plants: Mechanisms and functions. **Plant Molecular Biology**, Belgium, v.32, p.275–302, 1996.

WEINBERG, Z.G.; CHEN, Y. Effects of storage period on the composition of whole crop wheat and corn silages: Short communication. **Animal Feed Science and Technology** Amsterdam, v. 185, n. 3/4, p. 196–200, 2013.

WEINBERG, Z.G.; ASHBELL, G. Engineering aspects of ensiling. **Biochemical Engineering Journal**, Manchester, v. 13, p. 181-188, 2003.

WEINBERG, Z.G.; MUCK, R.E. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. **FEMS Microbiology Reviews**, Lausanne, v.19, p.53-68, 1996.

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

WILKINSON, J.M.; FENLON, J.S. A meta-analysis comparing standard polyethylene and oxygen barrier film in terms of losses during storage and aerobic stability of silage. **Grass and Forage Science**, Kenilworth. England, 9 oct. 2013.

YAHAYA, M.S.; KIMURA, A.; HARAI, J.; NGUYEN, H.V.; KAWAI, M.; TAKAHASHI, J.; MATSUOKA, S. Effect of length of ensiling on silo degradation and digestibility of structural carbohydrates of lucerne and orchardgrass. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 92, n. 3/4, p. 141-148, 2001.

YOUNG, K.M.; LIM, J.M.; DER BEDROSIAN, M.C.; KUNG, L.Jr. Effect of exogenous protease enzymes on the fermentation and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign,v. 95 n. 11, p. 6687-6694, 2012.

3 ALTERAÇÕES DE QUALIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO DE SILAGENS DE MILHO

Resumo

O presente experimento avaliou a inoculação de aditivos microbianos e tempo de armazenamento na qualidade de silagens de milho. A cultura do milho foi ensilada sem aditivos (Controle) ou com inoculantes contendo bactérias lácticas homofermentativas (*Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici*) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas ou heterofermentativas (*Lactobacillus buchneri*) aplicados na dose 1×10^5 ufc/g. As silagens foram armazenadas em silos experimentais durante 3, 7, 15, 30, 60, 210, 390, 480 ou 570 dias. Foram avaliados: composição química-bromatológica, produtos de fermentação, microbiologia, perdas fermentativas, estabilidade aeróbia e degradabilidade ruminal *in situ*. Os dados de degradabilidade ruminal da matéria seca foram ajustados com regressões não lineares, com o objetivo de se encontrar recomendação prática para tempo mínimo de armazenamento de silagens de milho. Os aditivos não afetaram as variáveis estudadas. Entretanto, *L. buchneri* aumentou a concentração de ácido acético das silagens e diminuiu a deterioração aeróbia, indicada pelo menor acúmulo térmico durante o ensaio de estabilidade aeróbia. O tempo de armazenamento ocasionou diminuição do teor de matéria seca. O teor PB diminuiu nos primeiros 30 dias de estocagem e o teor de amido não alterou-se com os tempos de armazenamento. O teor de carboidratos solúveis diminuiu ao longo do tempo de armazenamento, reflexo do metabolismo dos açúcares em produtos de fermentação. O pH da silagem diminuiu rapidamente nos sete dias de armazenamento mantendo-se estável no decorrer da estocagem, diferentemente para a concentração de ácido acético que aumentou com o tempo de armazenamento. Verificou-se diminuição na contagem de bactérias lácticas e de leveduras ao longo do armazenamento. A produção de gás e a perda de matéria seca aumentaram com o tempo de armazenamento. O tempo de armazenamento aumentou todas as variáveis de estabilidade aeróbia. Os ganhos mais significativos para a estabilidade aeróbia se deram até aproximadamente 60 dias de armazenamento. Houve aumento na produção de gás e recuperação da matéria seca ao longo do tempo de estocagem. A degradabilidade do amido aumentou com os tempos prolongados de armazenamento enquanto que a degradabilidade da fibra em detergente neutro (FDN) não foi afetada. A modelagem dos dados indicou que a degradabilidade ruminal de amido, e consequentemente da MS, apresentaram maiores taxas de ganhos até 28 dias de armazenamento. A concentração de prolamina diminuiu 1,1 unidades percentuais da forragem fresca até aproximadamente 30 dias de armazenamento, à taxa de aproximadamente 0,04 unidade percentual por dia. A concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH_3) e proteína solúvel aumentou de forma constante ao longo do armazenamento, elevando-se 3,6 e 34,7 unidades percentuais em 570 dias de armazenamento respectivamente. Houve correlação positiva entre N-NH_3 e degradabilidade do amido com 24 e 48 horas de incubação (DEG24-amido e DEG48-amido) com valores de $R^2 = 0,80$ e $0,73$ respectivamente. Da mesma forma, verificou-se correlação positiva entre proteína solúvel e DEG24-amido DEG48-amido, com valores de R^2 0,83 e 0,92 respectivamente. De outro lado, prolamina apresentou correlação negativa com DEG24-amido 24 e DEG48-amido, com valores de $R^2 = 0,43$ e $0,75$, respectivamente, indicando proteólise ao longo do armazenamento da silagem de milho. Os benefícios mais importantes ocorrem durante o primeiro mês de armazenamento, sem efeito da presença do aditivo.

Palavras-chaves: Aditivo; Degradabilidade; Estabilidade aeróbia; Modelagem

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of microbial additives and length of storage on the quality of corn silage. Whole-corn plants were ensiled without or with inoculants containing homofermentative (*Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* + cellulolytic and hemicellulolytic enzymes) or heterofermentative lactic acid bacteria (*Lactobacillus buchneri*) applied at 1×10^5 cfu/g. Treated forages were packed and stored in experimental silos for 3, 7, 15, 30, 60, 210, 390, 480, and 570 days. Samples were evaluated for chemical composition, fermentation end-products, microbial counts, fermentation losses, aerobic stability, and ruminal degradability *in situ*. Ruminal degradability of dry matter, adjusted by non-linear regressions, was used to infer a practical recommendation for minimum storage time of corn silage. Inoculants did not affect most of the variables studied. However, *L. buchneri* increased acetic acid concentration and decreased aerobic deterioration of silages. Crude protein content decreases during the first 30 days of storage and remained stable for the remaining storage period. Starch content remained constant over the time of storage. Soluble carbohydrates decreased across the storage period, reflecting the conversion of soluble sugars to fermentation end-products. The silage pH declined rapidly in the first seven days of storage and remained stable for the remaining storage period. On the other hand, acetic acid concentration increased with the length of storage. There was a decrease in lactic acid bacteria and yeast counts over time. Gas production and dry matter loss increased along the fermentation. Contrary, silages stored for long periods presented higher aerobic stability. The most significant gains for stability aerobic occurred during the first 60 days of storage. The digestibility of starch increased with prolonged storage period while the digestibility of neutral detergent fiber was not affected. Modeling those data indicated that ruminal degradability of starch, and consequently of dry matter presented higher rates of improvement up to 28 days of storage. The concentration of prolamins decreased by 1.1 percentage units during the first 30 days of storage at a rate of about 0.04 percentage unit per day. The concentration of ammonia-N ($\text{NH}_3\text{-N}$) and soluble protein increased steadily during storage, by 3.6 and 34.7 percentage units in 570 days of storage, indicating proteolysis during the storage of corn silages. There was a positive correlation between ammonia and starch degradability during 24 and 48 hours of incubation, with values of $R^2 = 0.80$ and 0.73 respectively. Similarly, there was a positive correlation between soluble protein and starch degradability during 24 and 48 hours, with R^2 values of 0.83 and 0.92 respectively. On the other hand, there was a negative correlation between prolamins and starch degradability during 24 and 48 hours, with values of $R^2 = 0.43$ and 0.75 , respectively. The most important alterations occurred during the first month of storage with small effects of microbial additives on the quality of corn silages.

Keywords: Additive; Aerobic stability; Corn silage; Degradability; Length of storage; Modeling

3.1 Introdução

O objetivo maior de produzir alimento volumoso na forma de silagem é otimizar a preservação dos nutrientes originais da planta, que será fornecida aos animais. Entre as forrageiras tropicais, a planta de milho destaca-se com elevado potencial para a ensilagem. Essa planta apresenta adequado teor de carboidratos solúveis, poder tampão e de matéria seca, permitindo boa fermentação em condição anaeróbia, reduzidas perdas de matéria seca e aceitabilidade pelos animais (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991, OLIVEIRA, 2007).

O uso de forragens conservadas é comum na maioria das empresas pecuárias do país. A obtenção de silagens de qualidade alta é dependente de fatores como: colheita de plantas com maturidade adequada, velocidade de colheita, picagem, compactação, vedação do silo e manejo de retirada da silagem. Logo, silagens com alto valor nutritivo, livre de patógenos e toxinas e com estabilidade aeróbia adequada, somente são passíveis de serem obtidas se todos os pontos críticos supracitados forem executados com sucesso, culminando em redução de perdas de matéria seca e aumento de eficiência produtiva.

Muitas vezes o processo de fermentação no silo ocorre de forma inadequada, acarretando perdas de nutrientes nas mais diversas magnitudes, podendo atingir 33% da massa ensilada (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Neste sentido, a utilização de aditivos microbianos na ensilagem tem por objetivo minimizar perdas fermentativas e elevar a estabilidade da silagem após a abertura do silo. Na ensilagem do milho, o uso de aditivos objetiva garantir que bactérias lácticas dominem a fermentação, resultando em silagens bem conservadas e com estabilidade aeróbia aceitável (KUNG; STOKES; LIN, 2003).

A deterioração aeróbia da silagem é promovida pela ação de microrganismos que degradam o ácido láctico, causando a elevação do pH da silagem e permitindo o crescimento de microrganismos indesejáveis. Os inoculantes microbianos utilizados para a produção de silagens de milho são compostos por grupos de bactérias homo ou heteroláticas, ou também a combinação destes. De acordo com Kung (2009), os aditivos microbianos, entre outras funções, devem inibir o crescimento de microrganismos aeróbios após a abertura dos silos, em especial aqueles associados à instabilidade aeróbia, como exemplo as leveduras e fungos. O acompanhamento da temperatura da silagem é o indicativo mais comum da estabilidade do material após a abertura dos silos, sendo desejável a postergação do aquecimento da forragem e, conseqüentemente, a redução nas perdas de matéria seca nessa etapa.

Embora o abaixamento e a estabilização do pH de silagens ocorram entre 3 e 7 dias, períodos entre 21 e 30 dias têm sido amplamente divulgados como adequados para a estabilização da fermentação (KUNG, 2013). Não obstante, vários trabalhos corroboram que a fermentação prossegue além de 7 dias, com aumentos significativos nas concentrações de produtos de fermentação (BOLSEN et al., 1992). Da mesma forma, trabalhos com avaliação microbiológica da silagem têm sido extensivamente estudados nos primeiros dias após a ensilagem McDonald; Henderson e Heron (1991), McEniry et al. 2008, e somente alguns estudos com microbiologia da silagem têm sido realizados para tempos mais prolongados de armazenamento (RICHARD et al. 2007; STORM et al. 2010). A compreensão das mudanças no desenvolvimento microbiológico que ocorrem em silagens armazenadas por períodos longos podem contribuir para minimização de perdas, manutenção da qualidade higiênica da silagem e sobretudo, melhorar a eficiência do processo de conservação, como por exemplo, a disponibilidade de nutrientes.

O processo contínuo de fermentação ao longo do armazenamento ficou evidente nos trabalhos de Der Bedrosian; Nestor e Kung (2012) e Young et al. (2012), que verificaram aumentos nos teores de nitrogênio amoniacal e proteína solúvel ao longo do armazenamento da silagem de milho. Esses aumentos estão correlacionados a níveis crescentes de proteólise e consequentemente maior disponibilidade da fração amido. Hoffman et al. (2011) apontaram as proteínas do endosperma, especialmente as prolaminas, que atuam como fator inibitório à digestão do amido. Nesse sentido, tem se observado relação positiva entre o tempo de armazenamento e a digestibilidade ruminal da silagem de milho, em especial da fração amido (DER BEDROSIAN; NESTOR; KUNG, 2012; HALLADA; SAPIENZA; TAYSON, 1998; NEWBOLD et al., 2006).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do tempo de armazenamento e da aplicação de aditivos microbianos na fermentação, estabilidade aeróbia e degradabilidade ruminal de nutrientes (MS, FDN e amido) de silagens de milho.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Local do Experimento

O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP/ESALQ), no município de Piracicaba/SP (22°42'17" S; 47°37'16" W) e altitude de 554 metros. O clima da região de Piracicaba/SP é classificado

como clima temperado úmido com inverno seco e verão quente - Cwa de acordo com a classificação de Köppen (1948) disponível no Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura (CEPAGRI, 2014).

Tabela 1 - Dados meteorológicos dos meses de dezembro de 2010 a março de 2011, referente aos meses de desenvolvimento da cultura de milho para ensilagem na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”-Esalq/USP, município de Piracicaba/SP

Item	Dez/10	Jan/11	Fev/11	Mar/11
Insolação, h/dia	6,2	6,3	7,1	4,4
Precipitação total mensal, mm	244,1	421,7	145,5	222,2
Umidade relativa, %	76,4	80,0	77,0	83,0
Temperatura máxima, °C	30,7	31,0	31,9	28,2
Temperatura mínima, °C	19,8	20,2	20,2	19,4
Temperatura média, °C	25,3	25,6	26,0	23,8
Evaporação, mm	6,1	5,07	7,70	4,06
Número dias de chuva, dia	16	20,0	15,0	18,0

Fonte: Série de Dados Climatológicos do Campus Luiz de Queiroz de Piracicaba/SP, Departamento de Engenharia de Biosistemas, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, LEB - ESALQ – USP, 2014.

3.2.2 Ensilagem e tratamentos

A semeadura do milho híbrido Pioneer 30F90 Bt foi realizada em dezembro de 2010, pelo sistema de plantio direto, com 80 cm de espaçamento entre linhas, 60 mil sementes/ha e estande de 50 a 52 mil plantas. Foram aplicados 28 kg de N, 80 kg de P₂O₅ e 56 kg de K₂O como adubação de plantio, mais uma adubação de cobertura de 500 kg/ha de 20-00-20.

O corte da planta de milho realizou-se no dia 26 de março de 2011 quando a planta atingiu média de 40,3% de matéria seca (Tabela 2), utilizando-se colhedora de duas linhas acoplada ao trator (Mentamit®, Cajuro, Brasil). A colhedora foi ajustada para corte de tamanho teórico de 10 mm. A planta de milho picada foi transportada para um local coberto, dividida em montes de aproximadamente 135 kg, sendo suficiente para completar os silos experimentais de cada tratamento.

Os tratamentos utilizados consistiram de nove tempos de armazenamento (3, 7, 15, 30, 60, 210, 390, 480 e 570 dias) com ou sem aditivos bacterianos (*Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* 1×10⁵ ufc/g + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, *Lactobacillus buchneri* DSM 13573 1×10⁵ ufc/g de forragem fresca). Com auxílio de aspersor manual, foi aplicado somente água no monte de forragem para o tratamento controle (1 L/t MV), enquanto nos outros montes de forragem, foram aplicados os aditivos comerciais na dose 1 × 10⁵ ufc/g MV, diluído em água (1L/t MV).

Como silos experimentais foram utilizados baldes plásticos com capacidade para 20 litros, buscando-se atingir massa específica de 600 kg de forragem fresca por metro cúbico. Os baldes plásticos eram providos de tampas para vedação adequada. Em cada tampa foi acoplada válvula do tipo *Bunsen* para escape de gases produzidos durante a fermentação. Foi realizada a pesagem dos silos antes do enchimento (balde + tampa) e após cheios foram vedados e novamente pesados para avaliação das perdas quantitativas por gases e perda total de matéria seca por diferença gravimétrica, conforme descrito por JOBIM et al., (2007). Após a ensilagem as tampas dos baldes foram seladas com fitas adesivas e mantidos em local coberto em temperatura ambiente variando entre (9,2 e 32,9 °C) até as respectivas aberturas de cada tempo de armazenamento.

3.2.3 Perda total de matéria seca durante o armazenamento

A perda total de matéria seca foi calculada pela equação a seguir (JOBIM et al., 2007):

$$PMS = \frac{[(PCen - Pen) * MSen] - [(PCab - Pab) * MSab] \times 100}{[(PCen - Pen) * MSen]}$$

Sendo:

PMS = Perda total de matéria seca (%);

PCen = Peso do balde cheio na ensilagem (kg);

Pen = Peso do conjunto (balde+tampa) na ensilagem (kg);

MSen = Teor de matéria seca da forragem na ensilagem (% MS);

PCab = Peso do balde cheio na abertura (kg);

Pen = Peso do conjunto (balde+tampa) na abertura (kg);

MSab = Teor de matéria seca da forragem na abertura (% MS).

A recuperação da matéria seca (RECMS) foi calculada a partir dos pesos iniciais, finais e concentrações de MS da massa de forragem ensilada.

3.2.4 Produção de gases

A determinação das perdas por produção de gases foi mensurada conforme a equação descrita por JOBIM et al. (2007):

$$G = \frac{[(PCen - Pen) * MSen] - [(PCab - Pen) * MSab] \times 100}{[(PCen - Pen) * MSen]}$$

Sendo:

G = Perdas por gases em % da MS;

PCen = Peso do silo cheio na ensilagem (kg);

Pen = Peso do conjunto (silo+tampa) na ensilagem (kg);

MSen = Teor de MS da forragem na ensilagem (%);

PCab = Peso do silo cheio na abertura (kg);

MSab = Teor de MS da forragem na abertura (%).

3.2.5 Amostragens

3.2.6 Coleta de amostras na ensilagem e nas aberturas dos silos experimentais

A partir da forragem utilizada para a confecção dos silos experimentais, foram coletadas três amostras de 350 g em sacos de papel e colocadas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas para determinação da composição bromatológica. Completados os respectivos tempos de armazenamento, procedeu-se a abertura dos silos. A camada superficial de cada silo (aproximadamente 15 cm) foi descartada, abaixo dessa camada, toda a silagem foi recolhida e colocada em sacos plásticos e homogeneizada. Na sequência, uma amostra de 350 g foi coletada em sacos de papel para secagem em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72. Após secagem, o material foi processado em moinho de facas tipo Wiley com peneira de malha de 1,0 mm e armazenado em potes plásticos devidamente vedados para análise da composição bromatológica. Outra amostra de 100 g foi utilizada para determinação imediata do pH, alíquota adicional de 100 g foi imediatamente coletada e utilizada para preparo de extrato aquoso e determinação do perfil microbiológico da silagem. Uma parte desse extrato foi coletado e armazenado em congelador a temperatura de -20°C para análise de produtos de fermentação. Por fim, foi coletado 3 kg de silagem de cada unidade experimental e colocado em baldes plásticos para ensaio de estabilidade aeróbia.

3.2.7 Análise químico-bromatológica

A determinação do teor de matéria seca (segunda matéria seca) foi realizada por secagem em estufa a 105°C durante 16 h (AOAC, 2000). As cinzas foram obtidas por combustão das amostras a 600°C durante 4 h (AOAC, 1997). A análise de PB foi realizada pelo método de Dumas (marca LECO 2000, Leco Instruments Inc, modelo FP-528) (WILES; GRAY; KISSLING, 1998). O EE foi determinado pelo método de extração Soxhlet segundo AOAC (1997). Os teores de FDN, FDA, CEL, HEM e LIG foram determinados conforme o método de Van Soest; Robertson e Lewis (1991) utilizando-se sulfito de sódio e α -amilase com base no método sequencial proposto pela ANKON[®] Fiber Analyser e descrito por HOLDEN (1999). A análise de carboidratos solúveis em etanol foi realizada conforme metodologia descrita por HALL (2000).

O teor de amido foi avaliado por hidrólise enzimática e a determinação da glicose resultante, analisada por espectrometria (HALL, 2009). Em tubos de 50 mL, com tampa rosqueável foi adicionado 2 mg de amostra e solução tampão de acetato de sódio e 300 μ L de α -amilase termo-estável Novozymes (Termamyl, 2X). Os tubos foram deixados em estufas por 1 h a 105 °C. Após, foi adicionado 500 μ L da enzima amiloglucosidase (300U/mL – *Aspergillus niger*, Novozymes (Sigma[®] A7095, 50mL) e os tubos incubados por 2 horas a 50 °C. As amostras foram diluídas na proporção 1:1 (500 μ L de amostra digerida + 500 μ L de água destilada). A leitura da concentração de glicose resultante da hidrólise enzimática do amido foi realizada em espectrofotômetro a 505 nm, utilizou-se o kit Doles[®] (método glicose oxidase).

Para a extração de prolaminas as amostras foram moídas em moinho tipo Wiley com peneira de malha 1 mm de acordo com Nellis, Hoffman e Shaver (2013). Primeiramente, obteve-se a matéria seca insolúvel em tampão (MSit), para tanto, 500 mg de cada amostra foi acondicionada em potes plásticos com tampa e foi adicionado uma solução de tampão borato fosfato, e colocados em banho-maria a 39 °C por 1 hora. O conteúdo foi filtrado em papel de filtro Whatman N° 541 e seco em estufa a 55°C por 24 horas.

Na sequência, uma sub amostra de 200 mg da MSit foi adicionada à tubos para centrifuga e uma solução aquosa de álcool, composta por álcool butílico terciário e mercaptoetanol foi adicionada e, o tubo foi submetido a agitação por 4 horas. Após centrifugar as amostras, 50 microlitros do sobrenadante de cada amostra foi pipetada dentro de cuvetas, 2,5 mL de reagente Bradford foi adicionado (BRADFORD, 1976), e as amostras

foram cobertas e deixadas em temperatura ambiente por 5 minutos. A absorbância de cada amostra foi mensurada à 595 nm e utilizou-se como curva padrão de zeína purificada

A proteína solúvel foi determinada por meio de solução borato-fosfato. Para tanto, uma alíquota de 1,0 g de amostra com 10 mL de solução de álcool butílico terciário (10%) e 50 mL de solução borato fosfato foram adicionados em becker de 100 mL e deixado por 1 hora a 39 °C em repouso, em seguida, foi filtrado em papel Whatman 541 (KRISHNAMOORTHY et al. 1982). Os teores de proteína bruta do resíduo para determinação da proteína solúvel foram determinados de acordo com os métodos descritos por Wiles, Gray e Kissling (1998), por meio da combustão das amostras segundo o método de Dumas, utilizando auto-analisador de nitrogênio, marca LECO 2000, Leco Instruments Inc, modelo FP-528.

Na Tabela 2, está apresentada a composição bromatológica da planta de milho no momento da ensilagem.

Tabela 2 - Composição bromatológica da planta de milho na ensilagem

Item ¹	Tratamentos ²			
	Controle	LB	LP+EF+PA	EPM
Matéria seca, %	41,10	39,90	40,00	0,75
Proteína bruta, % MS	6,64	7,06	6,82	0,16
FDN, % MS	45,20	44,80	43,92	1,21
FDA, % MS	22,96	23,62	23,90	0,73
Amido, % MS	24,71	25,69	25,26	1,06
Lignina, % MS	2,07	2,18	2,18	1,62
Hemicelulose, % MS	20,43	21,18	21,80	0,53
Extrato etéreo, % MS	2,77	2,31	2,55	0,06
Cinzas, % MS	3,64	3,70	3,77	0,22
TMP, mm	11,10	11,52	11,94	0,42
pH	5,62	5,60	5,77	0,05
BAL, ufc/g MV	7,9	7,8	7,6	0,19
LEV, ufc/g MV	6,7	6,8	6,8	0,10
FUNG, ufc/g MV	6,3	6,2	6,4	0,04

¹ FDN – fibra em detergente neutro; FDA – fibra em detergente ácido; N-NH₃ – nitrogênio amoniacal; pH – potencial hidrogeniônico; DEG-MS – degradabilidade *in situ* da matéria seca; DEG-FDN – degradabilidade *in situ* da fibra em detergente neutro; DEG-amido – degradabilidade *in situ* do amido; TMP – tamanho médio de partículas; BAL – bactérias lácticas; LEV – leveduras; FUNG - fungos filamentosos.

² CONTROLE – silagem sem aditivo; LB – silagem com aditivo microbiano *Lactobacillus buchneri* (1×10⁵ ufc/g MV); LP+EF+PA – silagem com aditivo microbiano *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* (1×10⁵ ufc/g MV) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas.

Outra sub-amostra foi congelada em freezer para preparo do extrato aquoso e determinações de N-NH₃ conforme método colorimétrico descrito por Chaney e Marbach (1962), adaptado para uso em placas de microtúbulos e mensuração em colorímetro – Elisa

Reader (absorbância de 550 nanômetros). A concentração de ácido acético foi determinado conforme Palmquist e Conrad (1971) em cromatógrafo gasoso, modelo CLG (Hewlett Packard Company® 5890 series II). O ácido lático foi analisado por espectrometria com leitura em 565 nm de acordo com metodologia adaptada de PRYCE (1969). A concentração de etanol foi determinada em cromatógrafo gasoso com detector de massas (GC-MS) (GCMS QP 2010 plus, Shimadzu®, Kyoto, Japan), usando coluna capilar (Stabilwax, Restek®, Bellefonte, USA; 60 m, 0,25 mm ϕ , 0,25 μ m crossbond carbowax polyethylene glycol) e parâmetros analíticos conforme as recomendações do fabricante.

3.2.8 Análise de pH e microbiologia

A partir de uma sub-amostra fresca de silagem foi preparado extrato aquoso por meio da adição de 25 g de amostra fresca em 225 mL de água destilada estéril KUNG et al. (1984), após 1 minuto foi medido o valor de pH. Para as avaliações microbiológicas, foi preparado extrato aquoso por meio da adição de 25 g de amostra fresca em 225 ml de solução salina (0,105g KCl, 2,25g NaCl, 0,05g NaHCO₃ e 0,9g CaCl₂ dihidrato) e homogeneizado durante 4 minutos em Homogeneizador de alimentos (Nova Ética® Vargem Grande Paulista, Brasil) e realizada a leitura de pH. Outra alíquota foi utilizada na contagem da população de bactérias ácido lácticas (BAL), leveduras (LEV) e fungos (FUNG) a partir dos extratos diluídos e filtrados em (compressa de gaze de algodão) e realizadas as demais diluições (10^{-2} a 10^{-6}). Para identificação e contagem das BAL, foram utilizadas placas com meio seletivo (Petrifilm 3M® AC, Figura 4) incubadas em jarras de 2,5 L com gerador de anaerobiose Anaerobac (Probac do Brasil®) proporcionando atmosfera anaeróbia dentro das jarras e mantidas em estufa de incubação Biochemical Oxygen Demand (BOD) TE – 391 TECNAL® com temperatura de 33°C por 48 horas. Para contagem LEV e FUNG utilizou-se placas com meio seletivo (Petrifilm 3M® YM, Figura 5) colocadas em estufa de BOD com temperatura de 25°C por 72 horas.

Após os respectivos tempos de incubação, realizou-se a contagem de microrganismos nas placas contendo mais de 20 e menos de 300 unidades formadoras de colônia (ufc) e expresso como logaritmo na base 10.

Figura 5 - Determinação da população de bactérias ácido lácticas - BAL

Figura 4 - Determinação da população de leveduras - LEV

3.2.9 Ensaio de estabilidade aeróbia

A estabilidade aeróbia foi avaliada pelo controle de temperatura das silagens expostas ao ar de acordo com o método descrito por KUNG; ROBINSON e RANJIT (2000). Amostras de 3,0 kg das silagens de cada unidade experimental foram colocadas sem compactação em baldes plásticos sem tampa e mantidos em sala climatizada com dispositivo programado para manter a temperatura média de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 240 horas. As temperaturas foram mensuradas a cada 15 minutos com o uso de sistema eletrônico de aquisição de dados modelo Novus Tagtemp inseridos no centro geométrico da massa em cada balde. Amostras das silagens foram colhidas ao início e ao término do período de avaliação, para determinação do teor de MS em estufa de circulação forçada de ar a 55°C por 72 horas.

As variáveis avaliadas durante o ensaio de estabilidade aeróbia foram: estabilidade aeróbia (EA), definida como o tempo em horas para elevação da temperatura em 2°C em relação ao ambiente; temperatura máxima (T_{max}) alcançada pela massa, em $^\circ\text{C}$; tempo em horas (HT_{max}), para atingir a temperatura máxima; acúmulo de temperatura em 5 dias de exposição aeróbia ($\Sigma 5d$); acúmulo de temperatura em 10 dias de exposição aeróbia ($\Sigma 10d$) (O'KIEL; CLANCY; DOYLE, 2001); e recuperação de matéria seca (RCMS) de zero a 240 horas.

3.2.10 Ensaio de degradabilidade *in situ*

Foi realizado ensaio de degradabilidade *in situ* de MS, FDN e amido. Utilizou-se sacos de tecido nylon com poros de aproximadamente 50 μ m, com medidas de 20 x 40 cm (macro-bag). Foram incubados aproximadamente 70 g das amostras de silagem de milho e acondicionados *in natura*, ou seja, sem moagem ou secagem prévia (HUNTINGTON; GIVENS, 1995).

Os sacos tiveram massa vazia (tara) foi anotada. A pesagem das amostras ocorreu dois dias antes das incubações, em balança analítica, com precisão de duas casas decimais. Após a pesagem, os sacos foram selados para o fechamento e amarrados a uma anilha de metal com borracha elástica. Os sacos com as amostras frescas eram congelados e retirados uma hora antes do horário de incubação, para as amostras se estabilizarem com a temperatura ambiente.

No dia da incubação os sacos com a anilha de metal, foram colocados em mosquetões, esses por sua vez, eram fixados aos elos de uma corrente, de forma sequencial, sendo os mesmos introduzidos ao conteúdo ruminal e a corrente fixada ao lado externo da cânula (Figuras 6 e 7).

Para a realização do ensaio de degradabilidade *in situ* utilizou-se duas vacas adaptadas com cânula ruminal, não lactantes (vacas secas), com peso médio de 460 kg. Os animais foram alojados em baias individuais do tipo *tie stall* com 1,35 m de largura e 2,0 m de comprimento, com o piso (cama) de areia, bebedouro e cocho individuais. As vacas receberam ração contendo silagem de milho (53%), caroço de algodão (8%), farelo de soja (18%), polpa cítrica peletizada (9,5%), milho moído fino (9%) e suplemento vitamínico-mineral (2,5%). As rações eram fornecidas duas vezes ao dia (7:30 e 17:30 horas) em quantidade que permitisse 10% de sobras.

Figura 7 - Confeção e preparo dos macro-bags para ensaio de degradabilidade *in situ*

Figura 6 - Animal utilizado para em saio de degradabilidade *in situ* e alocação dos macro-bags no conteúdo ruminal

Todos os tempos de armazenamento foram incubados, dessa forma, totalizando 81 sacos (macro-bag), por animal (3 aditivos $\times$ 9 tempos de armazenamento $\times$ 3 repetições).

Após a remoção do rúmen, os sacos foram imediatamente submersos em água com gelo (0°C) e, a seguir, lavados em máquina de lavar roupas, por cinco ciclos, até que a água se tornasse límpida. O excesso de água foi retirado manualmente por meio de compressão leve dos sacos, que foram secos em estufa a 55° C por 72 horas para posterior pesagem. A degradabilidade *in situ* da matéria seca (DEG-MS) foi calcula como:

$$\text{DEG-MS (\%)} = \frac{[\text{MS inicial (g)} - \text{MS residual (g)}] \times 100}{\text{MS inicial (g)}}$$

Sendo:

DEG-MS = Degradabilidade *in situ* da matéria seca;

MS inicial = massa seca da amostra (g);

MS residual = massa seca residual (g).

Os resíduos obtidos das duplicatas (dois animais) de cada tempo de armazenamento, foram combinados e moídos em moinho tipo Wiley provido com peneira de 1 mm de diâmetro. Esses resíduos foram agrupados em uma única amostra composta para as determinações químico-bromatológicas. Foram determinados os teores de FDN do resíduo conforme o método de Van Soest, Robertson e Lewis, (1991) utilizando-se sulfito de sódio e α -amilase, com base no método sequencial proposto pela ANKON[®] Fiber Analyser e descrito por HOLDEN (1999). O teor de amido nos resíduos foi avaliado por hidrólise enzimática (HALL, 2009). Os resultados das determinações bromatológicas dos resíduos de FDN e amido foram utilizados para posterior cálculo de degradabilidade *in situ* do FDN (DEG-FDN) e degradabilidade *in situ* do amido (DEG-amido), conforme cálculos abaixo:

$$\text{DEG-FDN (\%)} = \frac{[\text{FDN inicial (g)} - \text{FDN residual (g)}] \times 100}{\text{FDN inicial (g)}}$$

Sendo:

DEG-FDN = Degradabilidade *in situ* da fibra em detergente neutro;

FDN inicial = massa de fibra em detergente neutro antes da incubação (g);

FDN residual = massa de fibra em detergente neutro residual (g).

$$\text{DEG-Amido (\%)} = \frac{[\text{Amido inicial (g)} - \text{Amido residual (g)}] \times 100}{\text{Amido inicial (g)}}$$

Sendo:

DEG-Amido = Degradabilidade *in situ* do amido;

Amido inicial = massa de amido antes da incubação (g);

Amido residual = massa de amido residual (g).

3.2.11 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (3×9): aditivos (Controle, *L. buchneri* e *L. plantarum* + *E. faecium* + *P. acidilactici* + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas) e tempos de armazenamento (3, 7, 15, 30, 60, 210, 390, 480 e 570 dias). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o PROC MIXED do SAS (2003).

Para a variável DEG-MS foi realizado modelagem dos dados para os tempos de armazenamento (0, 3, 7, 15, 30, 60, 210, 390, 480 e 570 dias). Foram consideradas cinco modelos de regressão não-lineares, utilizando-se o procedimento NLMIXED do SAS: a) exponencial, b) logístico, c) *Broken-line* com regressão linear para o primeiro seguimento seguido de platô (linear, platô); d) *Broken-line* com regressão linear para o primeiro segmento e outra regressão linear para o segundo segmento (linear, linear); e e) *Broken-line* com regressão quadrática para o primeiro segmento, seguido de regressão linear (quadrática, linear) para o segundo seguimento. Os ajustes dos modelos foram comparados por R^2 -ajustado, (quanto maior melhor), raiz quadrada do quadrado médio do erro (quanto menor melhor) e critério de informação de Akaike (quanto menor melhor).

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Características da planta de milho no momento da ensilagem

A composição bromatológica, as contagens microbianas e o teor de MS da forragem fresca estão apresentados na Tabela 2. O teor de matéria seca da planta fresca foi em média de

40,3% da MV, que é próximo ao limite máximo para produção de silagem de milho sem comprometer a fermentação (KUNG e SHAVER, 2000). O teor de MS é uma das principais variáveis avaliadas antes da ensilagem. Dessa forma, buscou-se no momento do corte da planta otimizar os ganhos em produção de MS e teor de amido digestível, com minimização das perdas durante a fermentação. No entanto, Pinto et al. (2010); Zopollatto; Daniel e Nussio (2009); apresentam teores de MS em torno de 33 a 38%, como mais frequentes.

A composição bromatológica da forragem fresca (Tabela 2) esteve condizente com o teor de MS e apresentou concentração adequada de componentes fibra, com média de FDN de 44,6% da MS e proteína bruta de 6,8% da MS, semelhante aos teores observados por Young et al. (2012) e Nishino et al. (2004). A concentração média de amido de 25,2% da MS foi relativamente elevada para as condições tropicais, mas condizente com o teor de MS, indicando colheita em estágio mais avançado de maturidade, possibilitando aumentos de aproximadamente 6 unidades percentuais no teor de amido quando comparada a média de 19% da MS de amido no momento da ensilagem, quando a forragem apresentou média de 33,3% de MS (SÁ NETO, 2012).

O teor de CSE da forragem fresca foi em média 4,72% da MS, e pode ser considerado abaixo do esperado. No entanto, valor semelhante foi verificado por Kang et al. (2009), que encontraram teores de CSE de 5,23% da MS para planta fresca de milho com 40% de MS. Já Sanderson (1993) verificou teores médios de 10% da MS para forragem fresca colhida com 32% de MS. Conforme Nussio; Simas e Lima (2000), o teor de CSE pode estar correlacionado com o teor de MS da planta, portanto, a baixa concentração de CSE verificado no atual experimento poderia ser parcialmente explicado pelo expressivo dreno metabólico representado pela espiga durante o enchimento de grãos. Conforme Fahey e Daynard (1978) as folhas localizadas na porção superior da espiga de milho, realizam o processo de translocação dos nutrientes para os grãos, enquanto que as folhas mais a baixo da espiga realizam esse mesmo processo, porém, os nutrientes seguem para o crescimento radicular da planta de milho. Os carboidratos solúveis são utilizados como substrato pelos microrganismos para a produção do ácido láctico, e garantem a conservação adequada da forragem ao longo do armazenamento.

O teor de $\text{NH}_3\text{-N}$ e proteína solúvel da planta fresca foi de 0,53% do N-total e 17,6% da PB respectivamente. O teor de prolamina foi de 2,3% da MS para a forragem fresca. São escassos os dados avaliando esse componente na silagem de planta inteira de milho. Até o

momento, somente Giuberti, Gallo e Masoero (2012) reportaram valores 1,2% da MS de prolamina para silagem de milho.

A degradabilidade *in situ* da MS e do FDN da planta fresca de milho após 24 e 48 horas de incubação apresentou valores de 28,9 e 48,4% da MS, 33,3 e 50,2% do FDN respectivamente. Os baixos valores de degradabilidade da fração fibra encontrados no atual experimento quando comparados a digestibilidade *in vitro* de aproximadamente 53% do FDN para a planta de milho fresca colhida com 41% de MS, Der Bedrosian; Nestor e Kung (2012) e a digestibilidade *in vitro* de 67,4% do FDN para a planta de milho fresca colhida com 29% de MS Sanderson (1993), deve-se em parte, ao método adotado no presente estudo, pois a colheita das plantas foi realizada com forrageira sem processador de grãos e o material foi incubado sem moagem, na forma *in natura*. A mesma justificativa se aplica aos valores de degradabilidade *in situ* do amido da planta fresca de milho após 24 e 48 horas de incubação, a qual apresentou valores de degradabilidade de 41,6 e 56,4% do amido, respectivamente. Der Bedrosian; Nestor e Kung (2012) verificaram digestibilidade *in vitro* do amido de aproximadamente 65,4% do amido para forragens frescas, ensiladas com 41,0% de MS, valor semelhante foi observado por Young et al., (2012) que encontraram digestibilidade *in vitro* de 66,3% do amido para a forragem fresca ensilada com 36,8% de MS.

As contagens de Bal, Lev e Fung na planta fresca estão apresentadas na Tabela 2, e apresentaram contagem média de 7,7, 6,7 e 6,3 ufc/g de forragem fresca, respectivamente. As BAL são microrganismos importantes para a produção de ácido lático, responsável pela acidificação do meio, sua presença e multiplicação é desejável principalmente nas primeiras horas do processo de fermentação, minimizando as perdas de MS, e os ácidos com ação marcante no controle do desenvolvimento de Lev e Fung durante a armazenagem. De forma semelhante ao atual experimento, Young et al. (2012) encontraram contagens de 8,89, 7,40 e 6,39 ufc/g de forragem fresca para os microrganismos Bal, Lev e Fungo respectivamente. No entanto, Nishino et al. (2004) verificaram contagens menores, com valores de 5,64 e 5,52 ufc/g de forragem fresca para os microrganismo Bal e Lev respectivamente, quando comparado ao atual experimento. Contagens maiores ou menores de microrganismos na forragem fresca poderão auxiliar na compreensão dos resultados que serão apresentados no decorrer desse trabalho, de forma especial, nos resultados de estabilidade aeróbia.

O tamanho médio de partículas (TMP) na ensilagem foi aproximadamente 11,5 mm e favoreceu ao processo de compactação e a fermentação anaeróbia. McDonald, Henderson e Heron, (1991) comentam que TMP inferior a 20-30 mm, favorece o extravasamento de carboidratos solúveis na silagem e por isso, maior crescimento das bactérias lácticas. Na

discussão que se segue, será possível verificar as principais alterações que ocorrem em relação à prolamina, perfil microbiológico, estabilidade aeróbia e digestibilidade dos nutrientes na silagem de milho a medida que avança o tempo de armazenamento.

3.3.2 Características químico-bromatológicas das silagens

Na Tabela 3 estão apresentados os valores de probabilidade para efeitos de inoculantes e tempo de armazenamento na composição químico-bromatológica das silagens de milho. Os teores de MS, PB, prolamina, cinza, N-NH₃, proteína solúvel e CSE foram alterados ($P < 0,04$) pelo tempo de armazenamento. Ao contrário, os aditivos não influenciaram ($P > 0,07$) as demais variáveis bromatológicas estudadas. Contudo, conforme apresentado na Figura 8a, ocorreu diminuição de 2,5 unidades percentuais no teor de MS das silagens ao longo do armazenamento, como resultado da fermentação. Este aumento da umidade pode ser consequente a fermentações secundárias, as quais causam o rompimento de células e promovem o extravasamento do conteúdo intracelular para o meio externo. Dados de Weinberg e Chen (2013), corroboram com o encontrado no atual experimento, os quais verificaram menor teor de MS ao longo dos tempos de armazenamento, no entanto, diferem de Kleinschmit e Kung (2006a), os quais verificaram aumento médio de 1,5 unidades percentuais no teor de MS entre os tempos de armazenamento 14 a 361 dias de armazenamento.

Tabela 3 - Valores de probabilidade para efeitos de aditivo (A) e tempo de armazenamento (T) na composição química bromatológica

Item	A	T	A × T
Matéria seca, % MS	0,13	0,04	1,00
Proteína bruta, % MS	0,41	<0,01	0,70
Fibra em detergente neutro, % MS	0,74	1,00	0,89
Fibra em detergente ácido, % MS	0,44	0,85	1,00
Lignina, % MS	0,07	0,95	0,99
Hemicelulose, % MS	0,85	0,78	1,00
Amido, % MS	0,73	0,42	0,15
Prolamina, % MS	0,98	<0,01	0,99
Proteína solúvel, % PB	0,18	<0,01	0,97
Extrato etéreo, % MS	0,30	0,70	1,00
Cinzas, % MS	0,11	<0,01	1,00
Nitrogênio amoniacal, % N	0,23	<0,01	0,54
Carboidrato solúvel em etanol, % MS	0,51	<0,01	0,61

Para a variável PB (Figura 8b) o efeito de armazenamento ($P < 0,01$) foi marcante nos primeiros dias de armazenamento, principalmente porque a PB diminui até aproximadamente 30 dias, mantendo-se relativamente constante para os demais tempos de estocagem.

Figura 8 - Teores de MS (A), amido (B), PB (C) e cinza (D) das silagens em diferentes tempos de armazenamento. Silagem Controle (□); silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* (1×10^5 ufc/g MV) (▲); silagem aditivada com *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* (1×10^5 ufc/g MV) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (●); EPM: erro padrão da média

Este fato pode estar relacionado à ocorrência de proteólise e consequente elevação no teor de nitrogênio amoniacal e proteína solúvel nos primeiros dias de fermentação, conforme verificado nas (Figura 10b e 10c). Na figura acima, os teores de EE e amido (Figura 8c) mantiveram-se constante ($P > 0,42$) ao longo do armazenamento, com valores médios de 2,65 e 25,4% da MS. De modo geral, em função da magnitude das variações observada nos teores de cinza (Figura 8d), parece ser improvável haver algum efeito biológico significativo sobre o processo de conservação da forragem.

Para os componentes fibra: FDN, FDA, lignina e hemicelulose (Figuras 9a, 9b, 9c e 9d), não houve efeito de aditivo e tempo de armazenamento para as variáveis analisadas.

Figura 9 - Teores de FDN (A), FDA (B), Lignina (C), Hemicelulose (D), das silagens em diferentes tempos de armazenamento. Silagem Controle (□); silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* - (1×10^5 ufc/g MV) (▲); silagem aditivada com *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* - (1×10^5 ufc/g MV) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (●); EPM – erro padrão da média

Der Bedrosian, Nestor e Kung (2012) reportam teores semelhantes dos componentes fibra, não havendo diferença entre os tempos de armazenamento. Dados de Sanderson et al. (1993) corroboram com os apresentados neste experimento, não havendo efeito do processo de ensilagem sobre o teor de FDN e FDA da silagem de milho armazenadas por período de até 186 dias. Nos trabalhos de Kleinschmit, Schmidt e Kung (2005); Kleinschmit e Kung (2006a) as concentrações de PB, FDN e FDA após a fermentação não foram afetados pelos aditivos ou pelo tempo de armazenamento. Para a variável hemicelulose, não houve efeito ($P > 0,85$) de aditivo, da mesma forma não houve efeito ($P > 0,78$) para tempo de estocagem. Embora não ocorreu efeito de estocagem, Morrison (1979) comenta a possibilidade de reduções de 10 a 20% no teor de hemicelulose durante a fermentação da massa ensilada, possivelmente em função da hidrólise ácida iniciada pelos produtos de fermentação.

Conforme a Figura 10a, houve efeito de tempo de armazenamento ($P < 0,01$) para o teor CSE. O teor médio de CSE da forragem fresca foi de 4,72% da MS sendo reduzindo rapidamente para 1,12% da MS após 7 dias de armazenamento. Os carboidratos solúveis são rapidamente utilizados pelos microrganismos presentes na silagem, os quais são responsáveis em acidificar o meio e conservar a massa ensilada. Isso também foi observado por Sanderson (1993), o qual verificou reduções de 6,6 e 5,8 unidades percentuais de carboidratos solúveis após 40 e 186 dias de armazenamento respectivamente.

Os teores de N-NH₃ estão apresentados na Figura 10b. A concentração de N-NH₃ aumentou de forma ininterrupta com o tempo de armazenamento ($P < 0,01$); variando de 1,29 a 4,15% do N-total para as silagens armazenadas por 3 a 570 dias respectivamente, corroborando com as elevações dos teores de N-NH₃ verificados por Der Bedrosian, Nestor e Kung (2012) ao longo do armazenamento. De modo contrário, não houve efeito ($P > 0,23$) do aditivo sobre os teores de N-NH₃. De forma semelhante à N-NH₃, os teores de proteína solúvel Figura 10c, aumentaram ($P < 0,01$) constantemente com os maiores tempos de estocagem, variando de 22,7 a 52,3% da PB para silagens armazenadas por 3 a 570 dias respectivamente. O aumento constante desses compostos na silagem de milho corrobora com os valores verificados nos trabalhos de Hoffman et al. (2011); Der Bedrosian, Nestor e Kung (2012) para silagens armazenadas por até 240, 360 dias respectivamente. Der Bedrosian, Nestor e Kung (2012) verificaram teores de proteína solúvel variando de 35 e 55% da PB, para os tempo 0 e 360 dias de estocagem, respectivamente. Produtos como a proteína solúvel apresentam concentração de 25% da PB aproximadamente, para a forragem fresca, e com o tempo de armazenamento, esse valor pode aumentar para 60% da PB CVAS (2013), concentrações de proteína solúvel e N-NH₃ aumentam com o tempo de estocagem, e

geralmente são difíceis de evitar uma vez que a proteólise é o resultado da ação de proteases (GRUM; SHOCKEY; WEISS, 1991).

De acordo com Kung e Shaver (2000), os teores de N-NH_3 podem variar entre 5 a 7% do N-total e são aceitáveis para a silagem de milho com MS entre 35 e 40%, sendo os valores superiores, provavelmente devido aos períodos longos de armazenamento, e sua presença ocorre em função da proteólise seguida de deaminação pela ação de enzimas vegetais e microbianas (GRUM; SHOCKEY; WEISS, 1991; VIERSTRA, 1996).

Na maioria das vezes, a presença de nitrogênio amoniacal na silagem é definida como produto de deaminação bacteriana de aminoácidos, e não como um produto da hidrólise ácida (OHSHIMA; McDONALD, 1978). Dessa forma, fica evidente, que as maiores taxas de proteólise ocorrem principalmente nos primeiros dias de fermentação da silagem (Fairbairn, Alli e Baker, 1988), elevando-se ao longo do armazenamento. No entanto, a constante elevação no teor de N-NH_3 e de proteína solúvel ao longo da armazenagem, confirma a ocorrência de proteólise ininterrupta na silagem de milho. Conforme Heron, Edwards e Philips (1989) algumas enzimas proteolíticas continuam ativas mesmo em condição ácida e de pH baixo.

Para o conteúdo da prolamina (Figura 10d), houve diferença ($P < 0,01$) para tempo de armazenamento, variando de 2,3 a 1,07% da MS para a forragem fresca em relação à armazenada por 570 dias respectivamente, porém, não houve efeito ($P > 0,98$) de aditivo entre os tratamentos.

Embora não tenha sido encontrado na literatura estudos avaliando tempo de estocagem e teor de prolamina em silagem de milho, a redução dos teores de prolamina ao longo dos tempos de armazenamento corrobora com os estudos de Hoffman et al. (2011); Kung, Windle e Walker (2014) para silagem de grão úmido. Os dados de prolamina encontrados no presente estudo estão de acordo à hipótese de Hoffman et al. (2011); Jurjanz e Monteils (2005); os quais observaram ganhos em digestibilidade do amido e da forragem ensilada, em relação a forragem fresca.

Figura 10 - Teores de CSE (A), N-NH₃ (B), proteína solúvel (C), prolamina (D) das silagens em diferentes tempos de armazenamento. Silagem Controle □; silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* - (1×10^5 ufc/g MV) (▲); silagem aditivada com *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* - (1×10^5 ufc/g MV) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (●); EPM – erro padrão da média

Uma explicação plausível para esses ganhos em digestibilidade deve-se a degradação da matriz proteica (prolamina) envolta ao grânulo de amido, ocasionada pelo processo de fermentação da forragem. Hoffman et al. (2011) em seu trabalho, comentaram que o grau de encapsulamento do amido por prolaminas presentes na forragem combinado com a intensidade de fermentação e duração do período de ensilagem, parecem ser os fatores determinantes da disponibilidade final do amido. Com a menor presença da fração prolamina sobre os grânulos de amido, esse tem mais chance de encontrar-se dissociado, facilitando o acesso de bactérias ruminais aos grânulos.

Dessa forma, a redução de prolaminas nas silagens pode ter implicações importantes quanto à digestibilidade da fração amido em animais ruminantes.

3.3.3 Produtos de fermentação e microbiologia

Na Tabela 4 encontram-se valores de probabilidade para efeitos de aditivos e tempo de armazenamento nos produtos de fermentação e perfil microbiológico de silagens de milho. Os teores de ácido láctico estão apresentados na Figura 11a. Verificou-se tendência ($P = 0,08$) para tempo de armazenamento, contudo sem efeito ($P = 0,25$) de aditivos. Embora o teor de MS da forragem no momento da ensilagem seja essencial para fermentação adequada, como por exemplo a preservação da forragem por meio do controle da pressão osmótica e da atividade de água, o ácido láctico é coadjuvante importante, responsável pela redução do pH e limitador do crescimento de leveduras e demais microrganismos indesejáveis.

Tabela 4 - Valores de probabilidade para efeitos de aditivo (A) e tempo de armazenamento (T) nos produtos de fermentação e perfil microbiológico de silagens de milho

Item	A	T	A × T
Ácido acético, % MS	0,01	<0,01	0,07
Ácido láctico, % MS	0,25	0,08	0,70
Ácido láctico:ácido acético	0,30	0,09	0,97
Etanol, % MS	0,44	0,33	0,06
pH	0,92	<0,01	0,63
Bactérias ácido lácticas, log ufc/g	0,09	<0,01	0,02
Leveduras, log ufc/g	0,12	<0,01	0,81

Os teores de ácido láctico observados nesse estudo corroboram com dados de Der Bedrosian, Nestor e Kung (2012); Muck, Weinberg e Contreras-Govea (2013) que também não constataram aumentos entre as silagens de milho armazenadas por diferentes tempos de

estocagem. Embora trabalhos da literatura demonstrem uma fase estável durante a fermentação da silagem (Pahlow et al., 2003), componentes químicos como o ácido láctico continuam a mudar mesmo após a fase estável ter sido encerrada. Embora a concentração de ácido láctico tenha sido observado tendência para o tempo de armazenamento, tempos de estocagens prolongados podem resultar em silagens com menores concentrações de ácido láctico, e altas concentrações de ácido acético em relação a silagens armazenadas por curtos períodos de armazenamento (KLEINSCHMIT e KUNG 2006a). É possível que esse fato ocorra porque, algumas cepas de bactérias ácido lácticas metabolizam o ácido láctico na ausência da glicose (LINDGREN; AXELSSON; McFEETERS, 1990). No entanto, diferentemente do observado no presente estudo, Reich e Kung (2010), verificaram diferença ($P < 0,05$) entre as combinações de aditivos com *L. buchneri* e a silagem controle após 215 dias de armazenamento.

O teor de ácido acético (Figura 11b) foi influenciado pelos aditivos ($P = 0,01$) e pelo tempo de armazenamento ($P < 0,01$). No atual experimento, foi observado na média, maior teor de ácido acético para silagens tratadas com *L. buchneri* 3,13% da MS, em relação à silagem não tratada 2,91% da MS. Esse resultado corrobora ao encontrado por Filya (2003) para silagem armazenada por 90 dias, o qual verificou que a silagem tratada com *L. buchneri* apresentou maior ($P < 0,05$) teor de ácido acético em relação à silagem não tratada com aditivo. No entanto, esse resultado difere ao observado por Sá Neto et al. (2013) os quais verificaram diferença ($P < 0,05$) para o teor de ácido acético 2,3 e 1,2% da MS para a silagem controle e silagem tratada exclusivamente com *L. buchneri*, respectivamente. Contudo, Danner et al. (2003) afirmaram que o ácido acético é um inibidor potente da atividade de leveduras, que são microrganismos deterioradores de silagens expostas ao oxigênio (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Da mesma forma, Kleinschmit e Kung (2006a) observaram maior efeito do tempo de armazenamento para o tratamento com *L. buchneri* em relação a silagem controle a partir dos 56 dias de ensilagem.

Driehuis, Ounde Elferink e Spoelstra (1999) em estudo de tempo de armazenamento para silagem de milho, verificaram que a silagem controle apresentou aumento lento no teor de ácido acético, e em menor extensão que as silagens inoculadas com o aditivo *L. buchneri*. De modo geral, aproximadamente 60 dias de armazenamento pareceu ser o momento onde a produção de ácido acético atingiu o platô. Ainda, esses autores demonstram a ocorrência de microrganismos epífitos (ex. *L. buchneri*) capazes de converter ácido láctico em ácido acético e propiônico, ambos considerados potentes antifúngicos. Esses mesmos autores, indicaram em seu estudo que *L. buchneri* foi incapaz de competir com sucesso com a microflora epífita

durante a fase inicial de fermentação, mas tornou-se predominante durante a fase de armazenagem, provavelmente devido a capacidade de utilizar o ácido láctico como um substrato para o seu crescimento. É possível que esse fato possa explicar a maior produção de ácido acético em períodos avançados do armazenamento, conforme observado no presente experimento. Kung (2009) demonstrou que a inoculação com aditivos microbianos, reduziu o pH e elevou a razão ácido láctico:ácido acético e diminuiu o teor de nitrogênio amoniacal em mais de 60% dos estudos.

De modo geral, os teores de ácido acético encontrados no presente estudo foram elevados, corroborando com os dados verificados por Ranjit, Taylor e Kung (2002) para silagens armazenadas por 180 dias, porém, foram substancialmente maiores em relação aos teores verificados por Fylyia (2003); Kleinschmit e Kung (2006a). Isso resultou em razões ácido láctico:ácido acético menores que 3, parâmetro usado como indicador de fermentação homolática adequada (Figura 12a). Razões de 2,90 entre ácido láctico:ácido acético também foram observadas Ranjit, Taylor e Kung (2002) após 180 dias de armazenagem. Contudo, concentrações de ácido acético menores que 2% da MS, antes classificada como excelente conforme Dulphy e Demarquilly (1981), porque era um indicativo de fermentação indesejada, pode não ser mais verdade absoluta, principalmente porque o ácido acético apresenta benefícios após a abertura dos silos, como por exemplo, aumento da estabilidade aeróbia.

Para a variável pH, houve efeito ($P < 0,01$) de tempo de armazenagem, porém não verificou-se diferença ($P > 0,92$) entre os aditivos. O pH médio da forragem fresca foi de 5,66 e diminuiu rapidamente para 4,17 e 3,95 após 3 e 7 dias de armazenagem (Figura 11c). A redução de pH é consequência direta da produção do ácido láctico, sendo um indicador do estado de preservação da massa ensilada. A manutenção de pH abaixo de 4,0 para silagem de milho é um indicador de presença adequada do ácido láctico, o qual é desejável por promover ação inibitória sobre microrganismos indesejáveis, os quais são responsáveis pelas perdas de matéria seca. Conforme observado nesse experimento, os maiores efeitos da armazenagem ocorreram na primeira semana, sendo que após 7 dias de estocagem o pH manteve-se praticamente constante para todos os período subsequentes de armazenagem. Der Bedrosian, Nestor e Kung (2012) verificaram valores de pH variando entre 5,77 e 5,83 para forragem fresca e redução para a média de 3,72 após 45 dias de armazenagem. De modo geral, os valores de pH desse experimento, pode ser considerado dentro da normalidade, conforme Kung e Shaver (2000) para silagens de milho colhidas com teores de 35 e 40% de MS.

Figura 11 - Teores de ácido láctico (A), ácido acético (B), pH (C) das silagens em diferentes tempos de armazenamento. Silagem Controle (□); silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* - (1×10^5 ufc/g MV) (▲); silagem aditivada com *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* - (1×10^5 ufc/g MV) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (●); EPM – erro padrão da média

As concentrações de etanol estão apresentadas na Figura 12b. Não houve efeito de aditivo nem de tempo de estocagem. O teor de etanol variou de 0,42 a 0,43% da MS entre 3 e 570 dias de armazenamento. Diferentemente ao atual experimento, Der Bedrosian, Nestor e Kung (2012) constaram que as concentrações de etanol aumentaram ao longo do tempo de estocagem, com teores próximos de 2 a 3% de etanol na MS. Os autores especularam que esse fato poderia ter sido causado por contagens elevadas de leveduras, uma vez que o trabalho

também apresentou baixa concentração de ácido acético. No presente estudo, os teores de etanol podem ser considerados baixos, sendo indicativo de fermentação adequada e redução da população de leveduras ao longo do tempo de armazenamento, conforme verificado na Figura 13a.

De modo geral, silagens de milho convencionais, apresentam teores típicos de compostos finais de fermentação, sendo essencialmente: ácido lático, 4 a 7% da MS; ácido acético, 1 a 3% da MS; etanol 1 a 3% da MS e pH de 3,2 a 4,2 para silagens entre 35 e 40% de MS (KUNG e SHAVER 2000).

Figura 12 - Relação láctico:acético (A) e etanol (B), das silagens em diferentes tempos de armazenamento. Silagem Controle (□); silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* - (1×10^5 ufc/g MV) (▲); silagem aditivada com *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* - (1×10^5 ufc/g MV) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (●); EPM – erro padrão da média

Nesse sentido, no presente estudo a população de leveduras (Figura 13a) diminuiu ($P < 0,01$) exponencialmente ao longo do tempo de armazenamento, variando de 5,9 para 3,4 log ufc/g para os dias 3 e 570 de armazenamento sem efeito de aditivo. Essa redução é considerada benéfica uma vez que as leveduras contribuem para as perdas de matéria seca na forma de dióxido de carbono. A exposição prolongada aos produtos de fermentação com ação antifúngica, num meio anaeróbico e ácido, especialmente o ácido acético (Figura 11b) é uma

razão possível para a queda nas contagens de leveduras ao longo da fermentação de silagens bem preservadas. Além disso, com o desenvolvimento das leveduras, surgem outros microrganismos deterioradores, a exemplo, os fungos filamentosos que deprimem a qualidade nutricional da silagem. Driehuis, Oude Elferink e Spoelstra (1999) demonstraram que o uso do aditivo *L. buchneri* prejudicou a atividade de leveduras em silagens, embora esse fato não tenha sido observado no presente trabalho. Esse mesmo comportamento em relação a diminuição da população de leveduras, também foi observado por Kleinschmit e Kung (2006a). Nishino et al. (2003), verificaram redução na população de leveduras de 3,72 para 3,42 log ufc/g para silagem de milho controle armazenada por 60 e 120, dias respectivamente. De forma geral, os trabalhos da literatura demonstram reduções na contagem de leveduras, semelhante ao verificado no atual estudo.

Um número menor de leveduras presentes na silagem deve reduzir o risco de deterioração aeróbia, uma vez que as leveduras são consideradas os microrganismos iniciadores do processo de espoliação da silagem (LINDGREN et al., 1985; McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Kung et al. (1998) demonstraram que a estabilidade aeróbia foi negativamente correlacionada com o número de leveduras presentes no momento da abertura do silo, silagens de milho com populações abaixo de 10^3 ufc/g mantiveram-se estáveis por até 3 vezes mais tempo em relação às silagens com populações iniciais de 10^6 ufc/g, considerada elevada. Conforme observado no presente estudo, a EA foi aumentada (Figura 15a) a medida que a população de leveduras diminuiu (Figura 13a) na abertura do silo. Dessa forma, em função da diminuição da população de leveduras, e também do aumento do teor de ácido acético ao longo do tempo, a estabilidade aeróbica pode ser melhorada no presente estudo, especialmente em silagens de milho armazenadas por períodos superiores a 60 dias.

A população de bactérias lácticas (BAL) (Figura 13b) diminuiu ($P < 0,01$) exponencialmente ao longo do tempo de armazenamento, variando de 8,9 para 4,0 log ufc/g entre 3 e 570 dias de armazenamento. Houve interação entre aditivo e tempo de armazenamento ($P = 0,02$; Tabela 4). No atual estudo, a fermentação avançou rapidamente logo após a forragem ter sido ensilada, com produção dos produtos de fermentação, redução do pH e redução do teor de carboidratos solúveis. Isso correspondeu com o aumento inicial da contagem de bactérias ácido lácticas (BAL), lise de células vegetais em condições anaeróbias e liberação dos substratos fermentescíveis (O'KIELY; MUCK, 1998).

Figura 13 - População de levedura (A) e bactéria láctica (B), das silagens em diferentes tempos de armazenamento. Silagem Controle ($\square$); silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* - (1×10^5 ufc/g MV) ($\blacktriangle$); silagem aditivada com *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* - (1×10^5 ufc/g MV) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas ($\bullet$); EPM – erro padrão da média

Com o maior tempo de estocagem, existe a tendência de acúmulo de ácidos orgânicos (ácido acético e ácido láctico) e manutenção das condições ácidas da silagem, a ponto do próprio meio (silagem) inibir o crescimento de bactérias lácticas (*feedback* negativo). Fato parecido ao atual experimento, foi observado por Nishino et al. (2004); Nishino et al. (2003) ao constatar redução na população de BAL, variou de 8,05 para 5,72 log ufc/g e 5,33 para 4,87 ufc/g na silagem de milho controle armazenada por 10-60 e 60-120 dias, respectivamente.

3.3.4 Perdas de matéria seca durante armazenagem

Na Tabela 5 encontram-se os valores de probabilidade para efeitos de aditivo e tempo de armazenamento na produção de gás e recuperação de matéria seca (RECMS) de silagens de milho. Para os itens produção de gás e RECMS houve diferença estatística ($P < 0,01$) para

tempo de armazenamento, no entanto, o mesmo não foi verificado para efeito de aditivo ($P > 0,27$). A produção de gás elevou-se de forma constante ao longo do tempo de armazenamento (Figura 14a). Essas variáveis demonstram se o processo fermentativo da silagem ocorreu de forma adequada ou se houve fermentações indesejáveis, responsáveis por causar perdas de MS durante a estocagem da forragem.

Tabela 5 - Valores de probabilidade para efeitos de aditivo (A) e tempo de armazenamento (T) na produção de gás e recuperação de matéria seca de silagens de milho

Item	A	T	A × T
Gás, %	0,92	<0,01	0,68
Recuperação de MS, %	0,27	<0,01	1,00

Oliveira et al. (2010) avaliando perdas e valor nutritivo de silagem de milho armazenada por 60 dias, verificaram, valores de 2,2% da MS na forma de gás. Esse valor está próximo ao observado no presente experimento, que foi de 1,8% da MS de perdas na forma de gás aos 60 dias de armazenamento. No entanto, conforme McDonald, Henderson e Heron (1991) aumentos nas perdas por gases ocorrem quando as vias de fermentação se dão por meio de bactérias heterofermentativas, leveduras, enterobactérias e *Clostridium* ssp, que metabolizam o ácido láctico e carboidratos solúveis em dióxido de carbono (CO₂).

Em estudo de meta-análise Kleinschmit e Kung (2006b), os benefícios verificados na maior estabilidade aeróbia para as silagens tratadas com *L. buchneri* parecem compensar a menor RECMS da silagem, embora no atual experimento isso não tenha ocorrido. Weinberg e Chen (2013) verificaram aumento das perdas de MS ao longo do armazenamento, atingindo nível máximo após 90 dias de armazenamento, sugerindo uma provável estabilização do processo, porém, conforme o atual estudo, as perdas de matéria seca, assim como os demais processos bioquímicos e microbiológicos continuaram para os períodos prolongados de armazenamento, inferindo atividade microbiana e enzimática, embora de forma menos intensa que nos períodos iniciais de armazenamento.

Figura 14 - Gás (A), recuperação de matéria seca (RECMS) (B) silagens em diferentes tempos de armazenamento. Silagem Controle (□); silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* - (1×10^5 ufc/g MV) (▲); silagem aditivada com *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* - (1×10^5 ufc/g MV) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (●); EPM – erro padrão da média

Contudo, Kung (2009) demonstrou que com o uso de aditivos microbianos, a RECMS melhorou em apenas 35% dos trabalhos analisados. Assim, os dados encontrados no presente experimento, corroboram com a maioria dos resultados encontrados na literatura.

3.3.5 Estabilidade aeróbia

Na Tabela 6, encontram-se os valores de probabilidade para efeitos de aditivo e tempo de armazenamento na estabilidade aeróbia de silagens de milho. Houve efeito ($P < 0,01$) de tempo de armazenamento para as variáveis EA, $\Sigma 5d$, $\Sigma 10d$ Tmax, HTmax e PMS-EA. Somente o $\Sigma 10d$ foi influenciado ($P < 0,01$) pelos aditivos. No presente estudo, o maior ganho de EA foi alcançado com aproximadamente 60 dias de armazenamento (Figura 15a) atingindo um platô a partir de 52 horas de EA.

Tabela 6 - Valores de probabilidade para efeitos de aditivo (A) e tempo de armazenamento (T) na estabilidade aeróbia de silagens de milho

Item	A	T	A × T
EA, h	0,86	<0,01	0,92
Σ5d, °C	0,32	<0,01	0,05
Σ10d, °C	<0,01	<0,01	0,22
Tmax, °C	0,22	<0,01	0,28
HTmax, h	0,69	<0,01	0,92
PMS-EA, % MS	0,15	<0,01	0,99

¹ EA – estabilidade aeróbia; Tmax = Temperatura máxima; PMS-EA – perdas de matéria seca na estabilidade aeróbia; Σ5d – Acúmulo de temperatura durante cinco dias de exposição aeróbia; Σ10d – Acúmulo de temperatura durante 10 dias de exposição aeróbia.

Figura 15 - Estabilidade aeróbia, (A); Σ5d, (B) e Σ10d, (C) das silagens em diferentes tempos de armazenamento. Silagem Controle (□); silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* - (1×10^5 ufc/g MV) (▲); silagem aditivada com *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* - (1×10^5 ufc/g MV + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (●); EPM – erro padrão da média

Durante o período de armazenamento, inevitavelmente, um pouco de oxigênio penetra na silagem, em decorrência de falhas na vedação. No entanto, após a abertura do silo, o contato da massa ensilada com o oxigênio desencadeia o crescimento de microrganismos aeróbios, e como consequência, dá-se início ao processo de deterioração aeróbia, também conhecido como “quebra da estabilidade aeróbia”, decorrente da ação de leveduras tolerantes à ácidos, ou no caso da silagem de milho, ocasionalmente, bactérias do gênero *Acetobacter* sp. (MOON e ELY, 1979; SPOELSTRA et al., 1988).

De forma semelhante, Dolci et al., (2011) verificaram 65 horas de EA para silagens armazenadas por 110 dias, valor próximo às 53 horas de EA após 120 dias de armazenamento encontrado no presente estudo. Esse valor de EA pode ser considerado relativamente baixo quando comparados às 274 horas de EA para silagem tratada com aditivo *L. buchneri* Danner, et al. (2003), e pode ser explicado em função da alta população inicial de leveduras na forragem fresca, conforme demonstrou Ranjit e Kung (2000) e verificado na Tabela 2 do atual estudo. Sanderson (1993) avaliando aditivos com cepas de bactérias ácido lácticas em silagem de milho verificaram valores de EA de 96 e 190 horas para silagens armazenadas por 40 e 186 dias respectivamente, não havendo efeito ($P > 0,05$) de tratamento nos diferentes tempos de armazenamento.

No trabalho de Danner et al. (2003), o aditivo microbiano homolático *L. plantarum* reduziu a EA das silagens. Da mesma forma, Junges et al. (2013) testando uma combinação de aditivos homo e heteroláticos (*L. plantarum*, *L. brevis* e *E. faecium*) reportaram que a inoculação com o microrganismo heterolático não sobressaiu-se à fermentação homolática, não havendo assim, benefício sobre a estabilidade aeróbia. Corroborando, trabalhos de Filya (2003); Weinberg et al. (1993) têm demonstrado que a inoculação com bactérias homoláticas não tem melhorado a estabilidade aeróbia. Kung (2009) em ampla revisão de literatura, verificaram que bactérias ácido lácticas melhoraram a EA em somente 33% dos estudos, e em muitos casos, houve piora na EA.

Muck (2004) em estudo com aditivos homoláticos, também não verificou efeito de aditivo sobre a EA comparada a silagem não aditivada. Da mesma forma, Kleinschmit e Kung (2006a) relataram que silagens de milho inoculados com *L. buchneri* e *P. pentosaceus* apresentaram melhorias inconsistentes na estabilidade aeróbia. Essa ausência de efeito dos aditivos sobre a estabilidade aeróbia pode também estar relacionada com a maior carga microbiana epifítica na planta no momento da ensilagem e reduzir o tempo de estabilidade aeróbia, conforme verificado no atual estudo. Zopollatto, Daniel e Nussio (2009) em trabalho

de revisão de literatura, verificaram valores mínimos de 25 e máximos de 41 horas de EA para silagens de milho. Esses valores estão próximos aos observados nesse experimento.

Em recente trabalho de meta-análise, Daniel; Junges e Nussio (2014), compilaram médias de tratamentos, provenientes de publicações encontradas na literatura e testaram vários modelos matemáticos, dentre os quais, a regressão *broken-line* com primeiro segmento linear seguido de platô foi o modelo que melhor se ajustou ao banco de dados (maior R^2 e menor raiz do quadrado médio do erro - RQME). O trabalho apontou que a estabilidade aeróbia aumentou 0,4 horas por dia até 110 dias de armazenamento, quando se estabilizou. Os autores concluíram para que a estabilidade aeróbia seja maximizada, deve-se estocar a silagem por no mínimo 3 a 4 meses.

Em clima quente, a colheita de milho para ensilagem é suscetível a maior deterioração aeróbia. Ashbell et al. (2002) explicam que isso ocorre porque as leveduras aeróbias são mais ativas em temperaturas entre 20 e 30 °C, havendo também maior desenvolvimento de fungos, elevação do pH e produção de CO₂. Portanto, é muito importante encontrar aditivos adequados que inibam o crescimento de fungos e protejam a silagem após a exposição ao ar. Normalmente, a silagem de planta de milho, após a abertura do silo, apresenta aumento no crescimento de populações de leveduras. Embora a contagem de leveduras não tenha sido realizado no atual experimento, Ranjit e Kung (2000), apontam as leveduras como sendo a principal causa do início da deterioração aeróbia. Da mesma forma, Sá Neto (2012) verificaram aumentos na contagem de leveduras em silagem de milho durante exposição ao ar por 10 dias. No entanto o principal motivo da maior EA durante os maiores tempos de estocagem, deve-se a menor população de leveduras presentes na silagem, conforme verificado na Figura 13a.

As leveduras consomem ácido láctico, dando condições para o surgimento de microrganismos oportunistas, os quais se tornam ativos metabolicamente, produzem calor e consomem nutrientes da silagem. Por exemplo, Dolci et al. (2011) definiram como valores típicos de população de leveduras em forragem fresca de planta de milho de 6,90 log ufc/g para plantas colhidas no ponto de 50% da linha do leite. Esse valor está muito próximo ao verificado no atual experimento, 6,8 log ufc/g.

O tempo de armazenamento também influenciou ($P < 0,01$) as variáveis $\Sigma 5d$ e $\Sigma 10d$ de exposição aeróbia (Tabela 6 e Figuras 15b e 15c). Para ambas as temperaturas acumuladas, os valores foram consistentes com a EA, ou seja, quanto menor foi o acúmulo de temperatura, maior foi a EA da silagem no atual experimento, demonstrando que silagens armazenadas por aproximadamente 60 dias, atingiram os menores valores, com o menor acúmulo de

temperatura 28 e 73°C para $\Sigma 5d$ e $\Sigma 10d$ respectivamente, e maior EA, com 52 horas. Estudo realizado por Sá Neto (2012) evidenciou que silagens tratadas com diferentes doses do aditivo *L. buchneri* bem como diferentes tempos de armazenamento afetou positivamente ($P < 0,05$) as variáveis $\Sigma 5d$ e $\Sigma 10d$ de exposição aeróbia. Como por exemplo, o autor verificou diminuição no $\Sigma 5d$, com valores de: 34,8, 31,9, 24,7 e 14,2°C para 15, 60, 90 e 150 dias de armazenamento respectivamente, utilizando a mesma dose do aditivo *L. buchneri* (1×10^5 ufc) do atual experimento.

Embora a EA não tenha sido influenciada ($P > 0,86$) pelos aditivos, no presente experimento a variável $\Sigma 10d$ foi diminuída pela inoculação com *L. buchneri* ($P < 0,01$). O menor acúmulo de temperatura da silagem é indicativo de menor deterioração da silagem após a abertura do silo e possivelmente isso esteja relacionado às maiores produções de ácido acético (Figura 11b) quando comparado a silagem controle (sem aditivo). Esse resultado está de acordo Danner et al. (2003) que também verificaram efeito de aditivo contendo *L. buchneri* sobre a melhora na estabilidade aeróbia.

Como o processo de deterioração continua ao longo do tempo, o valor de pH se eleva e outros microrganismos continuam o processo de degradação. O acompanhamento da temperatura da silagem é o indicativo mais comum da estabilidade do material após a abertura dos silos, sendo desejável à um bom aditivo o atraso do aquecimento da forragem e, consequentemente, a redução nas perdas de MS nessa etapa. Dessa forma, Na Tabela 6 encontram-se os valores de probabilidade para efeitos de aditivo e tempo de armazenamento para o perfil de temperatura apresentadas pelas silagens de milho. Para os itens HTmax e Tmax houve diferença estatística ($P < 0,01$) para tempo de armazenamento, no entanto, o mesmo não foi verificado para efeito de aditivo ($P > 0,22$). Para a variável HTmax (Figura 16a) o tempo médio em horas para alcançar a temperatura máxima foi menor nos primeiros tempos de abertura aumentando para os tempos de estocagem prolongados 34,2 e 75,6 horas para 3 e 570 dias de armazenamento, respectivamente.

A Tmax (Figura 16b) comportou-se de forma contrária a HTmax, sendo a temperatura maior nos tempos iniciais de armazenamento e diminuído para os tempos mais avançados de armazenamento 43,5 e 40 °C para 3 e 570 dias de armazenamento respectivamente. Os números apresentados para as variáveis HTmax e Tmax, mostram que nos primeiros dias de estocagem (3, 7 e 15 dias) ainda existe importante quantidade de carboidratos residuais (Figura 10a) sendo metabolizado por microrganismo, principalmente leveduras (Figura 13a) presentes na silagem de milho, refletindo em fermentação acelerada e consequente maior

temperatura quando comparado aos tempos de estocagens prolongados (30, 60, 210, 390, 480 e 570 dias).

Figura 16 - HTmax, (A) e Tmax (B) das silagens em diferentes tempos de armazenamento. Silagem Controle (□); silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* - (1×10^5 ufc/g MV) (▲); silagem aditivada com *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* - (1×10^5 ufc/g MV) (●) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas; EPM – erro padrão da média

Do mesmo modo, Dolci et al. (2011) verificaram 42,2 °C como a temperatura mais alta, após 229 horas de exposição aeróbia. Semelhante ao atual experimento, Gimenes et al. (2006) também não verificaram diferença ($P > 0,05$) entre estudo avaliando inoculante bacteriano na silagem de milho sobre as variáveis Tmax, HTmax armazenada por 74 dias. Higginbotham et al. (1998) ao avaliar o efeito de aditivos heteroláticos na silagem de milho armazenadas por 21 e 90 dias não verificaram diferença entre os valores de Tmax, HTmax para os diferentes tempos de estocagem. De forma geral, as diferenças de temperatura que ocorreram na silagem de milho ao longo do armazenamento são uma maneira indireta de avaliar a qualidade da silagem.

Driehuis, Oude Elferink e Spoelstra (1999) constataram que os efeitos causadores da inibição do crescimento de fungos foram manifestados nos estágios finais da fermentação e

estão relacionados com os níveis crescentes de ácido acético na massa ensilada (Figura 11b). No trabalho de Nishino et al. (2003) os níveis de ácido acético e os efeitos sobre a estabilidade aeróbia foram mais acentuados em silagens armazenadas por 120 em relação a 60 dias de armazenamento. Esse efeito de tempo de estocagem sobre a EA, também pode ser verificado nesse experimento. Conforme Nishino et al. (2003), Driehuis, Oude Elferink e Spoelstra (1999) isto pode apoiar a hipótese de que a maior EA, é devida, principalmente, a ação antifúngica do ácido acético produzido principalmente pelas bactérias inoculadas de *L. buchneri*. De acordo com Oude Elferink et al. (2001) o microrganismo *L. buchneri* sob condição anaeróbia e de baixo pH, é capaz de transformar ácido láctico em ácido acético, CO_2 , etanol e 1,2-propanodiol.

Para a variável, perdas de matéria seca durante ensaio de estabilidade aeróbia (PMS-EA, Figura 17) houve efeito ($P < 0,01$) de tempo de armazenamento, contudo o mesmo não foi verificado ($P > 0,15$) para aditivos.

Figura 17 - PMS-EA das silagens em diferentes tempos de armazenamento. Silagem Controle (□); silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* - (1×10^5 ufc/g MV (▲); silagem aditivada com *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* - (1×10^5 ufc/g MV) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (●); EPM – erro padrão da média

As maiores PMS-EA ocorreram nos períodos iniciais, 3, 7 e 15 dias de estocagem, com valores médios de 19,0, 18,5 e 17,5% da MS respectivamente, atingindo um platô com aproximadamente 30 dias de armazenamento com valor médio de 12,5% da MS. Isso pode ser explicado em função da maior quantidade de carboidratos residuais como substrato para produção de álcoois por meio do metabolismo de leveduras (Fenlon, Henderson e Rooke 1995) e aumentos das PMS após a abertura dos silos. Conforme a Figura 13a, a maior população de leveduras nos menores tempos de armazenagem da forragem, coincide com as maiores PMS-EA. De forma oposta, com os maiores tempos de estocagem, a população de

leveduras foi reduzida e conseqüentemente, as PMS forragem também foram menores. Valores próximos ao presente estudo foram observados por Kim e Adesogan (2006) avaliando a EA em função de diferentes temperaturas de ensilagem e em condições adversas em que a forragem foi submetida, verificaram PMS de 8,2 a 13,8% para os diferentes tratamentos.

Kleinschmit e Kung (2006b) realizaram estudo de meta-análise em função da preocupação de que o microrganismo *L.buchneri*, devido a sua natureza heterolática, pudesse elevar as PMS. No entanto, o estudo mostrou que as PMS em silagem de milho pela maior aplicação de *L.buchneri* foi de 1 ponto percentual maior em relação a silagens não tratadas. Dessa forma, os benefícios na melhora da estabilidade aeróbia parecem se sobrepor a maior perda de MS.

3.3.6 Degradabilidade ruminal do amido

Na Tabela 7 encontram-se apresentados os valores de probabilidade para efeitos de aditivo e tempo de armazenamento na degradabilidade *in situ* do amido após 24h de incubação (DEG24-amido, % amido), e degradabilidade *in situ* amido após 48h de incubação (DEG48-amido, % amido) de silagens de milho. Para essas variáveis verificou-se efeito ($P < 0,01$) do tempo de armazenamento, não havendo entretanto efeito de aditivo ($P > 0,15$).

Tabela 7 - Valores de probabilidade para efeitos de aditivo (A) e tempo de armazenamento (T) na degradabilidade *in situ* amido 24h (DEG24-amido, % amido), degradabilidade *in situ* amido 48h (DEG48-amido, % amido) de silagens de milho

Item	A	T	A × T
DEG24-amido, % amido	0,28	<0,01	0,37
DEG48-amido, % amido	0,15	<0,01	0,81

Conforme observado nas Figuras 18a e 18b, a degradabilidade do amido progrediu de forma constante ao longo do tempo de armazenamento. Os ganhos em degradabilidade do amido após 24 horas de incubação (Figura 18a) elevaram-se de 41,67% no dia 0 até 50,33% da MS no dia 30, ou seja, o processo de fermentação da forragem elevou em 8,66 unidades percentuais a degradabilidade da fração amido durante esse período, ou à taxa de 0,29 unidades percentuais de degradabilidade do amido ao dia.

Figura 18 - DEG24-amido (A) e DEG48-amido (B), das silagens em diferentes tempos de armazenamento. Silagem Controle (□); silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* - (1×10^5 ufc/g MV) (▲); silagem aditivada com *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* - (1×10^5 ufc/g MV) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (●); EPM – erro padrão da média

Os benefícios da ensilagem também continuaram para os períodos mais prolongados de armazenamento, com ganhos de 23,72 unidades percentuais para as silagens armazenadas dos 30 aos 570 dias de armazenamento, ou seja, à taxa de 0,04 unidades percentuais de degradabilidade do amido ao dia. Dessa forma, ficou evidente que os maiores benefícios da ensilagem ocorrem no primeiro mês de armazenagem, no entanto é possível melhorar os ganhos com armazenagens prolongadas, porém isso implica em fatores como logística de armazenamento e controle das perdas para que esses ganhos sejam efetivos e reflitam em benefícios reais no desempenho dos animais.

Os ganhos em degradabilidade do amido após 48 horas de incubação Figura 18b elevaram-se de 56,39% no dia 0 até 92,95% da MS aos 60 dias, ou seja, o processo de fermentação da forragem elevou em 36,56 unidades percentuais a degradabilidade da fração amido durante esse período, ou à taxa de 1,22 unidades percentuais de degradabilidade do amido ao dia. A partir dos 60 dias de armazenamento a degradabilidade do amido atingiu um platô, com nenhum ou mínimos ganhos da degradabilidade.

Der Bedrosian, Nestor e Kung (2012) estudaram o efeito do tempo de armazenagem para plantas de milho colhidas com 41% de MS, valor semelhante ao observado nesse estudo, e verificaram valores de digestibilidade do amido *in vitro* ($P < 0,01$) de 68% para a forragem fresca, alcançando o máximo de 85% de digestibilidade após 270 e 360 dias de armazenamento para silagens de milho. Esses resultados foram semelhantes aos observados por Young et al., (2012), os quais verificaram diferenças ($P < 0,01$) entre os tempos de armazenamento, com valores de 66,34, 75,22 e 80,71% de digestibilidade do amido para a forragem fresca e armazenadas por 45 e 150 dias respectivamente. Provavelmente esses aumentos em digestibilidade são devidos a quebra da prolamina, constituinte da matriz proteica (HOFFMAN et al., 2011).

Dessa forma, uma variável que pode auxiliar na compreensão dos fatores que interferem nos aumentos de digestibilidade da fração amido, é a redução dos teores de prolamina ao longo do armazenamento da forragem (Figura 10d). O teor de prolamina na forragem fresca foi de 2,3% da MS, e aos 30 dias reduziu para aproximadamente 1,1% da MS. Esse número indica que a prolamina diminuiu à taxa aproximada de 0,04 unidades percentuais por dia até os 30 dias de armazenamento, quando então atingiu platô. Coincidentemente, os pontos de menor presença de prolamina no grão de milho foram relacionados com as maiores taxas de degradabilidade de amido no rúmen (Figura 18a). Ainda, as taxas de ganhos em digestibilidade de amido e a taxa de diminuição do teor de prolamina foram similares (aproximadamente 0,04 unidades percentuais por dia). No sentido inverso, os teores de nitrogênio amoniacal e proteína solúvel, na forragem fresca foram de 0,53% do N-total e 17,6% da PB respectivamente, e aos 30 dias aumentaram para aproximadamente 2,06% do N-total e 31,46% da PB (Figuras 10b e 10c). Esses números indicam que o nitrogênio amoniacal e a proteína solúvel aumentaram à taxa aproximada de 0,05 e 0,46 unidades percentuais por dia até os 30 dias de armazenamento respectivamente, no entanto, sem atingir um platô e, assim, podem explicar os incrementos na digestibilidade ruminal do amido.

As prolaminas são proteínas que formam a matriz proteica que circundam o grânulo de amido (Simpson, 2001). Devido a característica hidrofóbica da prolamina, a matriz proteica

representa um bloqueio, limitando o acesso de enzimas ao amido. No ambiente natural, as prolaminas são degradadas na germinação por cisteína endoproteases e os peptídeos que resultam desse processo são degradados por serina carboxipeptidases (Simpson, 2001). O resultado dessa ação é o fornecimento de aminoácidos para a planta ainda na forma de embrião. Em trabalho de revisão realizado por Young et al. (2012), uma quantidade considerável de proteases são produzidas por espécies de *Aspergillus* e *Trichoderma* (conhecidos por produzir amilase e protease) dentre as quais, a enzima aspártico protease, apresenta atividade em pH baixo e seria essencial no uso de alimentos fermentados.

Sejam as proteases de origem vegetal ou microbiana, ambas podem contribuir para a proteólise durante a ensilagem. Hoffman et al. (2011) também propõe a ocorrência da ação proteolítica sobre as prolaminas ao invés da solubilização por ácidos orgânicos e etanol os quais explicariam as maiores digestibilidade do amido para silagens de milho armazenadas por períodos longos. Alguns estudos questionam o processo de proteólise, uma vez que esse pode ser excessivo em silagens Rooke e Hatfield (2003), porém, a maior parte das pesquisas tem sido voltadas a redução da proteólise em silagens de capins e leguminosas (WINTERS et al., 2008). Assim, os benefícios da proteólise controlada, podem ser consideradas desejáveis para silagens de milho.

Trabalhos na literatura apontam como 7 horas de digestibilidade *in vitro* tempo suficiente para explicar o desaparecimento ruminal do amido [CVAS (2013); Der Bedrosian, Nestor e Kung (2012); Snyder (2011); Young et al. (2012)] No atual experimento, o tempo de incubação *in situ* 24 horas explicou melhor o efeito do tempo de armazenamento sobre o desaparecimento do amido no rúmen quando comparado à incubação 48 horas. Na incubação por 48 horas, a taxa constante ascendente na degradabilidade foi atingida até aproximadamente 60 dias de armazenamento, quando atingiu um platô.

Por fim, para determinar a influência do tempo de estocagem na digestibilidade da fração amido, Daniel; Junges e Nussio (2014) realizaram estudo de meta-análise e verificaram que a digestibilidade da fração amido aumentou 0,31 unidades percentuais ao dia, até 28 dias de armazenamento. Após esse tempo de estocagem, a taxa de incremento de digestibilidade caiu 10 vezes, para aproximadamente 0,03 unidades percentuais por dia. Esses valores são similares aos verificados no presente estudo (Figura 18a). Os mesmos autores destacaram que enquanto o valor inicial de digestibilidade do amido obtido na meta-análise pode ser considerado baixo (64%), deve-se ressaltar que estes valores foram obtidos por incubação *in vitro* durante 7 h e o tempo curto de exposição do substrato à digestão pode ter favorecido o

desaparecimento de grânulos de amido prontamente digestíveis, encontrados em silagens estocadas por mais tempo.

3.3.7 Degradabilidade ruminal da fibra

Na Tabela 8 são apresentados os valores de probabilidade para efeito de aditivos e tempo de armazenamento na degradabilidade *in situ* do FDN após 24h de incubação (DEG24-FDN, % FDN) e degradabilidade *in situ* FDN após 48h de incubação (DEG48-FDN, % FDN) de silagens de milho. Para essas variáveis, não houve efeito ($P > 0,84$) nem de aditivo nem de tempo de armazenamento.

Tabela 8 - Valores de probabilidade para efeito de aditivo (A) e tempo de armazenamento (T) na degradabilidade *in situ* do FDN 24h, (DEG-FDN24h, % FDN), degradabilidade *in situ* FDN 48h, (DEG-FDN48h, % FDN) de silagens de milho

Item	A	T	A × T
DEG24-FDN, % FDN	0,84	0,99	0,76
DEG48-FDN, % FDN	0,89	0,98	1,00

Conforme observado nas Figuras 19a e 19b, a DEG24-FDN e a DEG48-FDN mantiveram-se constante ao longo do armazenamento. A DEG24-FDN foi de 33,34% para a forragem fresca e de 31,9% na média dos tempos de armazenamento, ou seja, degradabilidade de FDN da forragem fresca foi 1,4 unidades percentuais mais digestível quando comparada a forragem ensilada. No entanto, a degradabilidade DEG48-FDN foi 50,21% para a forragem fresca e 48,05% na média dos tempos de armazenamento, sendo a degradabilidade de FDN da forragem fresca foi 2,15 unidades percentuais mais digestível quando comparada a forragem ensilada. Os maiores valores de degradabilidade da forragem fresca em relação a forragem ensilada corroboram com os achados de (DER BEDROSIAN; NESTOR; KUNG (2012), SANDERSON, (1993); WEINBERG; CHEN (2013). Uma provável explicação pode estar relacionada ao efeito de diluição, a perda de porções da parede celular com maior digestibilidade (hemicelulose) ocasiona a menor digestibilidade do restante da fibra que permanece inalterada nas silagens.

Figura 19 - DEG24-FDN (A) e DEG48-FDN (B) das silagens em diferentes tempos de armazenamento. Silagem Controle ($\square$); silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* - (1×10^5 ufc/g MV) ($\blacktriangle$); silagem aditivada com *Lactobacillus plantarum* + *Enterococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* - (1×10^5 ufc/g MV) + enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas ($\bullet$); EPM – erro padrão da média

Contudo, Sanderson (1993) verificou que os tempos de estocagem de 45 e 186 dias não afetaram a digestibilidade da fração FDN, corroborando com os resultados deste experimento. Ao contrário Hallada, Sapienza e Tayson (2008) reportaram aumentos na digestibilidade *in situ* de FDN de aproximadamente 1,2 unidades percentuais ao mês para silagens armazenadas até 180 dias. Porém, esse achado é exceção na literatura e parece não haver explicação plausível para tal. Embora o número de trabalhos que reportam os efeitos da estocagem na digestibilidade da parede celular de silagens de milho sejam restrito, é de consenso para a maior parte dos autores que as alterações causadas pelo tempo de armazenamento são negativas e pequenas (CONE et al., 2008; DER BEDROSIAN; NESTOR; KUNG, 2012; SNYDER, 2011).

Desse modo, para determinar a influência do tempo de estocagem na digestibilidade da fração FDN, Daniel; Junges e Nussio (2014) verificaram em estudo de meta-análise em

silagem de milho, que a digestibilidade da fração FDN diminui ao longo do armazenamento - 0,0059 unidades percentuais ao dia. Enquanto as alterações na fração lignina são insignificantes (Morrison, 1979), a hemicelulose é parcialmente solubilizada (DER BEDROSIAN; MORRISON, 1979; NESTOR; KUNG, 2012; YAHAYA et al., 2001;). Assim, por efeito de diluição, a perda de porções da parede celular com maior digestibilidade promove a menor digestibilidade da fibra remanescente que permanece inalterada.

3.3.8 Modelagem da degradabilidade da matéria seca *in situ* de silagem de milho

A degradabilidade *in situ* da MS após 24 e 48 horas de incubação (DEG24-MS, e DEG48-MS) elevou-se durante todos os períodos de armazenamento (Figura 20). Do mesmo modo, a porcentagem de N-NH₃ e proteína solúvel também elevaram-se ao longo do armazenamento da forragem (Figuras 10b e 10c) e pode também indicar aumento na proteólise, que por sua vez, levou a um aumento da disponibilidade de amido (KUNG, 2013).

Todos os modelos utilizados na análise de DEG-MS apresentaram ajustes razoáveis (Tabela 9). Estes modelos foram testados com o objetivo de se estabelecer recomendação prática (Robbins, Saxton e Southern, 2006) para tempo mínimo de estocagem de silagens de milho. No entanto, a regressão quadrática no primeiro segmento e linear no segundo segmento ‘*Broken-line*’ (quadrático, linear) apresentou os melhores ajustes para os tempos de incubação DEG24-MS e DEG48-MS. Com base nisso, a taxa de aumento nas digestibilidades foi de 0,56 unidades percentuais por dia para DEG24-MS e, aproximadamente, 0,86 unidades percentuais por dia para DEG48-MS até os primeiros 28 dias de armazenamento (ver parâmetro D na Tabela 9). Após atingido o ponto de inflexão, continuou a aumentar lentamente (~0,03 unidades percentuais por dia para DEG24-MS e ~0,01 unidades percentuais ao dia para DEG48-MS) até o final dos 570 dias de armazenamento da forragem.

No estudo de Muck, Weinberg e Contreras-Govea (2013) não foi verificado efeito de tempo de estocagem para silagens de milho armazenadas por 4 ou 60 dias. No entanto, para as silagens de milho com teor baixo de MS (<30% de MS) e teor elevado de MS (~50% de MS), apresentaram ($P < 0,01$) digestibilidade *in vitro* após 24 horas de incubação (DEG24-MS) de 84,6% e 76,8% respectivamente. Provavelmente essa maior digestibilidade para materiais com teor elevado de MS, deve-se em grande parte, a maior digestibilidade do amido, isso porque, plantas com teor elevado de MS apresentam maior acúmulo de amido nos grãos, que é mais digestível em relação aos demais componentes de fibra. Kang et al. (2009) verificaram

degradabilidade *in situ* da MS após 24 horas de incubação de 64,% da MS para silagens de milho armazenadas por até 110 dias.

Tabela 9 - Critérios dos modelos não lineares utilizados na avaliação da degradabilidade da matéria seca em silagem de milho nos diferentes tempos de armazenamento

Critérios ¹	Modelo				
	Exponencial	Logístico	Broken-line (linear, platô)	Broken-line (linear, linear)	Broken-line (quadrático, linear)
DEG24-MS					
A	31,6	50,4	50,2	29,5	40,5
B	19,2	0,522	-0,195	0,562	-0,014
C	0,0148	0,0221		0,0260	0,0261
D			93,0	19,2	28,9
R ² -ajustado	0,671	0,661	0,647	0,742	0,744
RQME	4,30	4,30	4,38	3,96	3,95
CIA	410	412	415	395	395
DEG48-MS					
A	49,1	69,6	69,6	49,4	66,1
B	20,7	0,881	-0,583	0,858	-0,021
C	0,0594	0,0751		0,0105	0,0108
D			32,4	19,5	28,3
R ² -ajustado	0,802	0,797	0,765	0,811	0,819
RQME	3,37	3,39	3,60	3,29	3,23
CIA	329	330	339	327	325

¹ A, B, C e – parâmetros do modelo; RQME – raiz do quadrado médio do erro; CIA – Critério de informação de Akaike.

Exponencial: $DEG = A + B \times [1 - \exp(-C \times t)]$

Logístico: $DEG = A / [1 + \exp(-B - C \times t)]$

Broken-line (linear, platô): Se $(t < D)$, depois $DEG = A + B \times (D - t)$, então $DEG = A$

Broken-line (linear, linear): Se $(t < D)$, depois $DEG = A + B \times t$, então $DEG = (A + B \times D) + C \times (t - D)$

Broken-line (quadrático, linear): Se $(t < D)$, depois $DEG = A + B \times (D - t) \times (D - t)$, então $DEG = A + C \times (t - D)$

Onde DEG = degradabilidade da matéria seca *in situ* da silagem de milho incubada por 24h (DEG-MS) ou 48h (DEG-MS) e t = tempo de armazenamento em dias.

Hallada, Sapienza e Tayson (2008) verificaram incrementos de 0,50% e 0,70% na digestibilidade *in vitro* da MS após 12 e 30h de incubação ao mês respectivamente. Diferentemente ao estudo com silagem de milho realizado por Weinberg e Chen (2013) verificaram valores de digestibilidade *in vitro* da MS de 67,5 para a forragem fresca, e média de 60,9% da MS para as silagens armazenadas por até 360 dias sem efeito ($P > 0,05$) para os tempos de armazenamento.

Figura 20 - Influência do tempo de armazenamento sobre a degradabilidade *in situ* da matéria seca (MS). Amostras frescas foram incubadas em macro-bag durante 24h (DEG24-MS) ou 48h (DEG48-MS). As linhas com traços e pontilhadas demonstram os valores previstos pelo modelo *broken-line* (quadrático, linear)

Portanto, os maiores ganhos na digestibilidade da MS ocorreram no primeiro mês de armazenamento. Visto que, a principal razão para os ganhos de digestibilidade da MS ao longo da estocagem, foi o aumento de digestibilidade da fração amido (Figuras 18a e 18b), decorrente da proteólise ocasionada na prolamina.

A proteólise também é um mecanismo intrínseco decorrente da fermentação, que induz a degradação de proteínas (BARON; STEVENSON; BUCHANAN-SMITH, 1986). A proteólise pode ser melhor definida como um conjunto de proteínas degradadas por enzimas vegetais ativas ou por proteases bacterianas (VIERSTRA, 1996). Portanto, prolaminas presentes na matriz do grânulo de amido pode ser degradada pela atividade proteolítica. Como resultado final, os aminoácidos e peptídeos oriundos da proteólise são deaminados pela ação bacteriana (Ohshima e Mcdonald, 1978). A parte final deste processo, pode ser indicada pela concentração de N-NH_3 presente na massa ensilada. Logo, a produção N-NH_3 indica a redução das proteínas matriz proteica (prolamina) envolta ao grânulo de amido.

3.3.9 Correlações

Nesse sentido, foi verificada elevada correlação positiva linear ($R^2 = 0,80$; $P < 0,01$) entre $N-NH_3$ e DEG24-amido. Da mesma forma, observou-se correlação positiva quadrática ($R^2 = 0,73$; $P < 0,01$) entre $N-NH_3$ e DEG48-amido, conforme as Figuras 21a e 21b. Não diferente, houve elevada correlação positiva linear ($R^2 = 0,83$; $P < 0,01$) entre proteína solúvel e DEG24-amido, assim como se verificou correlação positiva quadrática ($R^2 = 0,92$; $P < 0,01$) entre proteína solúvel e DEG48-amido, de acordo com as Figuras 22a e 22b. De modo geral, os níveis crescentes de $N-NH_3$ e proteína solúvel refletiram em aumentos de degradabilidade da fração amido das silagens de milho.

Figura 21 - Correlação positiva entre nitrogênio amoniacal, N-total e degradabilidade do amido, % do amido após 24 h de incubação *in situ* (DEG24-amido): $y = 9,6 \text{ Nitrogênio amoniacal} + 31,2$; RQME = 4,62 (A). Correlação positiva entre nitrogênio amoniacal, N-total e degradabilidade do amido, % do amido após 48 h de incubação *in situ* (DEG48-amido): $y = - 4,4 \text{ Nitrogênio amoniacal}^2 + 30,1 \text{ Nitrogênio amoniacal} + 45,2$; RQME = 3,76 (B)

De acordo com Hoffman et al. (2011) a explicação para os aumentos na degradabilidade de do amido em silagem de milho, devem-se a provável proteólise. Der Bedrosian, Nestor e Kung (2012) verificaram correlações significativas ($R^2 = 0,78$; $P < 0,01$) entre a proteína solúvel e a digestibilidade do amido, porém, não encontraram efeito entre nitrogênio amoniacal e a digestibilidade do amido.

Resultados semelhantes foram observados por Kung, Windle e Walker (2014), os quais encontraram correlações positivas ($P < 0,01$) entre N-NH₃ e a digestibilidade *in vitro* do amido para silagens de milho de grão úmido, da mesma forma, Ferraretto et al. (2014) verificaram correlações ($R^2 = 0,61$; $R^2 = 0,55$; $P < 0,01$) entre N-NH₃ e proteína solúvel respectivamente para silagens de milho de grão úmido.

Figura 22 - Correlação positiva entre proteína solúvel e degradabilidade do amido, % do amido após 24 h de incubação *in situ* (DEG24-amido) : $y = 0,74 \text{ Proteína solúvel} + 26,6$; RQME = 3,64 (A). Correlação positiva entre proteína solúvel e degradabilidade do amido, % do amido após 48 h de incubação *in situ* (DEG48-amido) : $y = -0,04 \text{ Proteína solúvel}^2 + 3,8 \text{ Proteína solúvel} + 11,2$; RQME = 2,13 (B)

Baron, Stevenson e Buchanan-Smith, (1986) em estudo com silagem de grãos úmido de milho, verificaram elevação nos teores de nitrogênio solúvel após ensilagem. Dados de Philippeau e Michalet-Doreau (1998), avaliando a influência da ensilagem de grãos de milho sobre a degradação *in situ* do amido no rúmen, verificaram aumentos na degradação dos grãos ensilados em relação a forragem fresca. Jurjanz e Monteils (2005) também encontraram aumentos na degradação ruminal do amido em grãos de milho ensilados.

Conforme os dados das Figuras 21a e 22a, a incubação *in situ* por 24 horas, demonstrou melhor o efeito do próprio processo de fermentação (diminuição do pH, produtos de fermentação, proteólise) e do tempo de armazenamento, sobre os aumentos na degradabilidade do amido quando comparado à incubação por 48 horas (Figura 21b), às 48 horas de incubação, o efeito da fermentação da silagem foi minimizado, uma vez que com 48 horas, a degradabilidade do amido pode ter sido mais afetada pela ação do próprio rúmen e dos microrganismos ruminais. Esse efeito também pôde ser observado nas Figuras 18a e 18b onde são demonstrados os valores de degradabilidade do amido incubado por 24 e 48 horas, respectivamente.

Dessa forma, fica evidente a provável proteólise da prolamina (Figuras 23a e 23b) que houve durante o processo de conservação na forma de silagem da planta inteira de milho. As proteínas presentes na matriz proteica e que envolvem o grânulo de amido, dificultam o acesso das enzimas para degradação do amido (HUNTINGTON; HARMON; RICHARDS, 2006). Vários autores têm sugerido que as zeínas são degradadas durante as etapas de fermentação da silagem (HOFFMAN et al., 2011; JURJANZ; MONTEILS, 2005 PHILIPPEAU; MICHALET – DOREAU, 1998).

Recentemente, Kung, Windle e Walker (2014) encontraram correlações elevadas ($P < 0,01$) para N-NH₃, proteína solúvel, prolamina e a digestibilidade *in vitro* do amido em silagem de milho de grão úmido, sendo maior a digestibilidade à medida que os teores de proteína solúvel aumentam e os teores de prolamina diminuem, corroborando com os dados encontrados no presente experimento para silagem de planta inteira de milho.

Essas observações condizem com o observado no atual experimento, onde verificou-se correlação negativa quadrática ($R^2 = 0,42$; $P = 0,01$) entre prolamina e DEG24-amido (Figura 23a). Da mesma forma, houve correlação negativa quadrática ($R^2 = 0,73$; $P < 0,01$) entre prolamina e DEG48-amido (Figura 23b).

Figura 23 - Correlação negativa entre prolamina, % MS e degradabilidade do amido, % do amido após 24 h de incubação *in situ* (DEG24-amido) : $y = 128,6 \text{ Prolamina}^2 - 369,3 \text{ Prolamina} + 307,2$; RQME = 7,84 (A). Correlação negativa entre prolamina, % MS e degradabilidade do amido, % do amido após 48 h de incubação *in situ* (DEG48-amido) : $y = 79,2 \text{ Prolamina}^2 - 242,7 \text{ Prolamina} + 261,2$; RQME = 3,63 (B)

A proteólise de modo geral, vem sendo tradicionalmente associada como um processo indesejável durante à produção de silagens (MUCK 1987). No entanto, pesquisas recentes [Der Bedrosian, Nestor e Kung (2012); Ferraretto et al. (2014); Hoffman et al. (2011); Kung, Windle e Walker (2014)] sugerem que a proteólise na silagem de milho de planta inteira e silagem de milho de grão úmido é o fator principal para explicar os aumentos nas digestibilidade do amido. Na prática, Firkins (2008) comenta que maximizando a digestão do amido no trato total, é possível reduzir as induções de amido na dieta alimentar.

Assim, conforme os estudos supracitados, o tempo de armazenamento pode ser adotado como estratégia para elevar a quantidade de amido disponível para ser degradado no rúmen de

vacas leiteiras. Outro benefício prático da proteólise é melhorar a degradabilidade do amido de grãos secos (grãos duros ou moles) no rúmen, conforme relatado por Philippeau e Michalet-Doreau (2008), quando a ensilagem melhorou a digestibilidade ruminal de ambas as fontes de grãos de milho. Kung, Windle e Walker (2014) comentaram que em alimentos com alto teor de MS o processo de fermentação é mais lento em relação a materiais com teor de MS, menor, refletindo em necessidade de maior tempo de fermentação para que os efeitos da proteólise ocorram na matriz protéica do amido.

No entanto, o maior investimento em estruturas de armazenamento e estoque de forragens deve ser avaliado durante a tomada de decisão em relação ao tempo de armazenamento. Por exemplo, se ao invés de 3 semanas, o produtor decidir esperar 4 meses (16 semanas) antes de iniciar o fornecimento aos animais, o estoque de forragem deverá ser redimensionado, havendo necessidade de ampliar a capacidade de estocagem em 24% (DANIEL; JUNGES; NUSSIO, 2014).

3.10 Conclusões

A aplicação de aditivos microbianos não alterou as características bromatológicas, recuperação da matéria seca e a estabilidade aeróbia da silagem de milho estocadas por períodos longos. No entanto, silagens estocadas por mais tempo são mais estáveis quando exposta ao ar provavelmente em decorrência da redução da população de leveduras presente na silagem.

A degradabilidade ruminal da silagem de milho aumentou continuamente ao longo do período de armazenamento, enquanto que o benefício mais importante ocorre durante o primeiro mês. Assim, recomenda-se que a silagem de milho deve permanecer armazenada, ao menos, um mês antes do fornecimento aos animais.

Referências

- ASHBELL, G.; WEINBERG, A.G.; HEN, Y.; FILYA, I. The effects os temperature on the aerobic stability of wheat and corn silages. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, Waukegan, v. 28, p. 261-263, 2002.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International** 16. ed. Washington, USA. 1997.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International** 17. ed. Gaithersburg, USA. 2000.
- BARON, V.S.; STEVENSON, K.R.; BUCHANAN-SMITH, J.G. Proteolysis and fermentation of corn-grain ensiled at several moisture levels and under several simulated storage methods. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 66, p. 451-461, 1986.
- BOLSEN, K.K.; LIN, C.; BRENT, B.E.; FEYERHERM, A.M.; URBAN, J.E.; AIMUTIS, W.R. Effect of silage additives on the microbial succession and fermentation process of alfalfa and corn silage. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 75, n. 11, p. 3066-3083, 1992.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v,72, p. 248-259, 1976.
- CENTRO DE PESQUISAS METEOROLÓGICAS E CLIMATICAS APLICADAS A AGRICULTURA – CEPAGRI. 2014. Cidade Universitária “Zeferino Vaz” – Campinas/SP. Disponível em: < http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima_muni_436.html> Acesso em: 10 abr. 2014.
- CHANEY, A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, Washington, v.8, p. 130-137,1962.
- CONE, J.W.; VAN GELDER, A.H.; VAN SCHOOTEN, H.A.; GROTEN, J.A.M. Effects of chop length and ensiling period of forage maize on *in vitro* rumen fermentation characteristics. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, Wageningen, v.55, n. 2, p. 155-166, 2008.
- CVAS-Cumberland Valley Analytical Services. The corn silage Fermometer. Cumberland Valley Analytical Services, Hagerstown, Tech Notes, 2013. Disponível em: < <http://www.foragelab.com/Media/The%20corn%20Silage%20Fermometer6.0.pdf>>. Acesso em: 2 dez. 2013.
- DANIEL, J.L.P.; JUNGES, D.; NUSSIO, L.G. Alterações na qualidade de silagens de milho durante o armazenamento. In: JOBIM, C.C.; CECATO, U.; CANTO, M.W.; BANKUTI, F.I. (Ed.). SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 5., 2014. Maringá, 2014. **Anais...** Maringá, 2014. p.23-36.
- DANNER, H.; HOLZER, M.; MAYRHUBER, E. BRAUN, R. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, n.1, p.562-567, 2003.

DER BEDROSIAN, M.C.; NESTOR, K.E.; KUNG, Jr. L. The effects of hybrid, maturity and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 9, p. 5115-5126, 2012.

DOLCI, P.; TABACCO, E.; COCOLIN, L.; BORREANI, G. Microbial dynamics during aerobic exposure of corn silage stored under oxygen barrier or polyethylene films. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 21, p.7499-7507, 2011.

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

DULPHY, J.P.; DEMARQUILLY, C. Problèmes particuliers aux ensilages. In: DEMARQUILLY, C. (Ed.). **Prévision de la valeur nutritive des aliments des ruminants**. Paris: INRA publications, 1981. p. 81-104.

FAIRBAIRN, R.; ALLI, I.; BAKER, B.E.. Proteolysis associated with the ensiling of chopped alfalfa. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 71, p.152-158, 1988.

FAIREY, N.A.; DAYNARD, T.B. Assimilate distribution and utilization in maize. **Canadian Journal, Plant Science**, Ottawa, v. 58. p. 719-730, 1978.

FENLON, D.R.; HENDERSON, A.R.; ROOKE, J.A. The fermentative preservation of grasses and forage crops. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, Suppl., v.79, n.24, p.118-131, 1995.

FERRARETTO, L.F.; TAYSOM, K.; TAYSOM, D.M.; SHAVER, R.D.; HOFFMAN, P.C. Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia-nitrogen, and ruminal in vitro starch digestibility in high-moisture corn samples. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, p.1–7, 2014.

FILYA, I. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, p.3575–3581, 2003.

FIRKINS, J.L. Considerations associated with corn processing in dairy rations. In: SOUTHWEST NUTRITION CONFERENCE, UNIVERSITY OF ARIZONA, 2008. Tucson, **Proceeding...** Tucson, 2008. Disponível em: <http://www.cals.arizona.edu/ans/swnmc/Proceedings.../2008/ProceedingsList_08.html. 2008>. Acesso em: 20 de mar. de 2014.

GIMENES, A.L.G.; MIZUBUTI, I.Y.; MOREIRA, F.B.; PEREIRA, E.S.; RIBEIRO, E.L.A.; MORI, R.M. 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.

GIUBERTI, G.; GALLO, A.; MASOERO, F. Quantification of zeins from corn, high-moisture corn, and corn silage using a turbidimetric method: Comparative efficiencies of isopropyl and *tert*-butyl alcohols. **Journal of Dairy Science**, Champaign, Technical note. v.95, p.3384–3389, 2012.

GRUM, D.E.; SHOCKEY, W.L.; WESS, W.P. Electrophoretic examination of alfalfa silage proteins. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.74, p.146-154, 1991.

HALL, M.B. Determination of starch, including maltooligosaccharides, in animal feeds: comparison of methods and a method recommended for AOAC collaborative study. **Journal of Association of Official Analytical Chemist International**, Gaithersburg, v. 92, n. 1, p.42-49, 2009.

HALL, M.B. **Neutral detergent-soluble carbohydrates, nutritional relevance and analysis**: a laboratory manual. Gainesville: University of Florida, 2000. 42p. (Bulletin, 339).

HALLADA, C.M.; SAPIENZA, D.A.; TAYSOM, D. Effect of length of time ensiled on dry matter, starch and fiber digestibility in whole plant corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91,(E-Suppl. 1) p.30, (Abstr.). 2008.

HERON, S.J.E.; EDWARDS, R.A.; PHILLIPS, P. Effect of pH on the activity of ryegrass *Lolium multiflorum* proteases. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.46, p.267–277, 1989.

HIGGINBOTHAM, G.E.; MUELLER, S.C.; BOLSEN, K.K.; DePETERS, E.J. Effects of inoculants containing propionic acid bacteria on fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, p.2185–2192, 1998.

HOFFMAN, P. C.; ESSER, N. M.; SHAVER, R. D.; COBLENTZ, W. K. SCOTT, M. P.; BODNAR, A. L.; SCHMIDT, R. J.; CHARLEY, R. C. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, p. 2465–2474, 2011.

HOLDEN, L.A. Comparison of methods of *in vitro* dry matter digestibility for ten feeds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.82, n.8, p.1791-1794, 1999.

HUNTINGTON, G.B.; HARMON, D.L.; RICHARDS, C.J. Sites, rates, and limits of starch digestion and glucose metabolism in growing cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84.(E-Suppl.), p.14–24, 2006.

HUNTINGTON, J.A.; GIVENS, D.I. The *in situ* technique for studying the rumen degradation of feeds: a review of the procedure. **Nutrition Abstracts and Reviews Series B**, Wallingford, v. 65, n. 2, p. 63-93, 1995.

JOBIM, C.C.; NUSSIO, L.G.; REIS, R.A.; SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.36, Supl. esp., p.101-120, 2007.

JUNGES, D.; SCHMIDT, P.; NOVINSKI, C.O.; DANIEL, J.L.P. Additive containing homo and heterolactic bacteria on the fermentation quality of maize silage. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 35, n. 4, p. 371-377, Oct.-Dec., 2013.

JURJANZ, S.; MONTEILS, V. Ruminant degradability of corn forages depending on the processing method employed. **Animal Research**, Courtaboeuf, v.3, p.15–23, 2005.

KANG, T.W.; ADESOGAN, A.T.; KIM, S.C.; LEE, S.S. Effects of an esterase-producing inoculant on fermentation, aerobic stability, and neutral detergent fiber digestibility of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, p.732–738, 2009.

KIM, S.C.; ADESOGAN, A.T. Influence of ensiling temperature, simulated rainfall, and delayed sealing on fermentation characteristics and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, p.3122–3132, 2006.

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

KLEINSCHMIT, D.H.; KUNG, L. Jr. A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.89, p.4005–4013, 2006b.

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

KÖPPEN, W. Climatologia: con um estudo de los climas de la tierra. México:Fondo de Cultura Economica, 1948. 478p.

KRISHNAMOORTHY, U.; MUSCATO, T.V.; SNIFFEN, C.J.; VAN SOEST, P.J. Nitrogen fractions in selected feedstuffs. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.65, p. 217-225. 1982.

KUNG, L. Jr.; R. SHAVER, R. Interpretation and use of silage fermentation analysis report. Madison, n.13, v. 3, 5p. 2000. Disponível em: <<http://fyi.uwex.edu/forage/files/2014/01/Fermentation.pdf>>. Acesso em: 19 jun. 2014.

KUNG Jr. L. Effects of microbial additives in silages: facts and perspectives. In: ZOPOLLATTO, M.; MURARO, G.B.; NUSSIO, L.G. (Ed.). INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 1.,2009. São Pedro, **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2009. p.7-22.

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

KUNG, Jr. L. The effects of length of storage on the nutritive value and aerobic stability of silages. In: DANIEL, J.L.P.; SANTOS, M.C.; NUSSIO, L.G. (Ed.). INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 3,2013. July 22-23, Campinas. **Proceedings...**Campinas, 2013. p. 7-19.

KUNG Jr., L.; ROBINSON, J.R.; RANJIT, N.K. et al. Microbial populations, fermentation end-products, and aerobic stability of corn silage treated with ammonia or a propionic acid-based preservative. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, p.1479-1486, 2000.

KUNG, Jr. L.; SHEPERD, A.C.; SMAGOLA, A.M.; ENDRES, K.M.; BESSETT, C.A.; RANJIT, N.K.; GLANCEY, J.L. 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**, Champaign, v.81, p.1322-1330, 1998.

KUNG, Jr. L.; STOKES, M.R.; LIN, C.J. Silage Additives. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H.(Ed.). **Silage science and technology**. Madison, Wisconsin, USA: American Society of Agronomy, ; Crop Science Society of America.; Soil Science Society of America, 2003. p. 305–360.

KUNG, L. Jr.; WINDLE, M.C.; WALKER, N. The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.97, p.1–6, 2014.

LINDGREN, S.E.; AXELSSON, L.T.; McFEETERS, R.F. Anaerobic L-lactate degradation by *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiology Letters*, Oxford, v. 66, p. 209–214, 1990.

LINDGREN, S.; PETERSSON, K.; KASPERSSON, A.; JONSSON, A.; LINGVALL, P. Microbial dynamics during aerobic deterioration of silages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.36, p.765–774, 1985.

McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2nd ed. Marlow: Chalcombe Publication, 1991. 340p.

McENIRY, J.; O'KIELY, P.; CLIPSON, N.J.W.; FORRISTAL, P.D.; DOYLE, E.M. Bacterial community dynamics during the ensilage of wilted grass. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.105, p.359–371, 2008.

MOON, H.J.; ELY, L.O. Identification and properties of yeasts associated with the aerobic deterioration of wheat and alfalfa silages. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 69, n.3, p.153–156, 1979.

MORRISON, I.M. Changes in the cell wall components of laboratory silages and the effect of various additives on these changes. **The Journal of Agricultural Science**. Cambridge, v. 93, p. 581–586, 1979.

MUCK, R.E. Dry matter levels on alfalfa silage quality I. nitrogen transformation. **Transactions of the ASAE**, Niles Road, v.30, p. 7–14, 1987.

MUCK, R.E. Effects of corn silage inoculants on aerobic stability. **Transactions of the ASAE**, Niles Road, v.47, p.1011–1016, 2004.

MUCK, R.E.; WEINBERG, Z.G.; CONTRERAS-GOVEA, F.E. Silage extracts used to study the mode of action of silage inoculants in ruminants. **Agricultural And Food Science**, Helsinki, v. 22, p.108–114, 2013.

NELLIS, S.E.; HOFFMAN, P.C.; SHAVERA, R.D. Modified method to quantify prolamin proteins in dry and high-moisture corn: Technical note. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.96, p.1–6, 2013.

NEWBOLD, J.R.; LEWIS, E.A.; LAVRIJSEN, J.; BRAND, H.J.; VEDDER, H.; BAKKER, J. 2006. Effect of storage time on ruminal starch degradability in corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, (Suppl. 1). Abstr. 2006, p.190.

NISHINO, N.; YOSHIDA, M.; SHIOTA, H.; SAKAGUCHI, E. Accumulation of 1,2-propanediol and enhancement of aerobic stability in whole crop maize silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.94, p.800–807, 2003.

NISHINO, N.; WADA, H.; YOSHIDA, M.; SHIOTA, H. Microbial counts, fermentation products, and aerobic stability of whole crop corn and a total mixed ration ensiled with and without inoculation of *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87, p.2563–2570, 2004.

NUSSIO, L.G.; SIMAS, J.M.C.; LIMA, M.L.M. Determinação do ponto de maturidade ideal para colheita do milho para silagem. In: NUSSIO, L.G.; ZOPOLLATTO, M.; MOURA, J.C. WORKSHOP SOBRE MILHO PARA SILAGEM, 2., 2000. Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2000. p.11-26.

O'KIELY, P.; MUCK R.E. Grass silage. In: CHERNEY J.H.; CHERNEY D.J.R. (Ed.). **Grass for dairy cattle**. Wallingford, UK: CAB International Publishing. 1998. p. 223–251.

OHSHIMA, M.; McDONALD, P. A review of the changes in nitrogenous compounds of herbage during ensilage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Malden, v.29, p.497–505, 1978.

OLIVEIRA, L.B.; PIRES, A.J.V.; CARVALHO, G.G.P.; RIBEIRO, L.S.O.; ALMEIDA, V.V.; PEIXOTO, C.A.M. Perdas e valor nutritivo de silagens de milho, sorgo-sudão, sorgo forrageiro e girassol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.39, n.1, p.61-67, 2010.

OLIVEIRA, J.S.; SOBRINHO, F.S.; REIS, F.A.; SILVA, G.A.; ROSA, S.N.F.; SOUZA, J.J.R.; MOREIRA, F.M.; PEREIRA, J.A.; FIRMINO, W.G. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho destinados à silagem em bacias leiteiras do estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiás, v.1, p.45-50, 2007.

OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; KROONEMAN, J.; GOTTSCHAL, J.C.; SPOELSTRA, S.F.; FABER, F.; DRIEHUIS, F. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p.125–132, 2001.

PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison, Wisconsin, USA: American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America, . 2003. p. 31–93.

PALMIQUIST, D.; CONRAD, H. Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high fat diets. **Journal of Dairy Science**. Lancaster, v.74, p.3152, 1971.

PHILIPPEAU, C.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of genotype and ensiling of corn grain on in situ degradation of starch in the rumen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, p.2178–2184, 1998.

PINTO, A.P.; LANÇANOVA, A.C.; LUGÃO, S.M.B.; ROQUE, A.P.; ABRAHÃO, J.J.S.; OLIVEIRA, J.S.; LEME, M.C.J.; MIZUBUTI, I.Y. Avaliação de doze cultivares de milho (*Zea mays* L.) para silagem. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 1071-1078, out.dez. 2010.

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

RANJIT, N.K.; KUNG Jr. L. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, p.526-535, 2000.

RANJIT, N.K.; TAYLOR, C.C.; KUNG, Jr. L. Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage. **Grass and Forage Science**, Oxford, v.57, p.73–81, 2002.

REICH, L.J.; KUNG, L. Jr. Effects of combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with various lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.159, p.105–109, 2010.

RICHARD, E.; HEUTTE, N.; SAGE, L.; POTTIER, D.; BOUCHART, V.; LEBAILLY, P.; GARON, D. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. **Food and Chemical Toxicology**, Philadelphia, v.45, p. 2420–2425, 2007.

ROBBINS, K.R.; SAXTON, A.M.; SOUTHERN, L.L. Estimation of nutrient requirements using broken-line regression analysis. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n.13 p.155-165, 2006.

ROOKE, J.A.; HATFIELD, R.D. Biochemistry of ensiling . In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison, Wisconsin, USA: American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America, 2003. p. 95–140.

SÁ NETO, A.; NUSSIO, L.G.; ZOPOLLATTO, M.; JUNGES, A.; BISPO, A.W. Silagem de milho ou de cana-de-açúcar com *Lactobacillus buchneri* exclusivamente ou em associação com *L. plantarum*, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 5, p. 528-535, 2013.

SÁ NETO, A. **Caracterização microbiológica, parâmetros fermentativos e estabilidade aeróbia em silagens de forragens tropicais com aditivos microbianos**, 2012. 115p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11139/tde-11122012-092200/pt-br.php>. Acesso em: 24 abr. 2014.

SANDERSON, M.A. Aerobic stability and in vitro fiber digestibility of microbially inoculated corn and sorghum silages. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, p. 505-514, 1993.

SIMPSON, D.J. Proteolytic degradation of cereal prolamins: the problem with proline. **Plant Science**, Shannon, v.161, p.825–838, 2001.

SNYDER, T. Corn silage: hybrid type, ensiling time affect feed value, Idaho, 2011. Disponível em: <http://www.progressivedairy.com/index.php?option=com_content&view=article&id=7274:corn-silage-hybrid-type-time-in-silo-affect-feeding-value&catid=46:feed-and-nutrition&Itemid=72>. Acesso em: 23 mar. 2014.

SPOELSTRA, S.F.; COURTIN, M.G.; VAN BEERS, J.A.C. Acetic acid bacteria can initiate aerobic deterioration of maize silage. **Journal of Agricultural Science**, Toronto, v. 111, p. 127–132, 1988.

STORM, I.M.L.D.; KRISTENSEN, N.B.; RAUN, B.M.L.; SMEDSGAARD, J.; THRANE, U. Dynamics in the microbiology of maize silage during whole-season storage. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.109, p.1017–1026, 2010.

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

VIERSTRA, R.D. Proteolysis in plants: Mechanisms and functions. **Plant Molecular Biology**, Belgium, v.32, p.275–302, 1996.

WEINBERG, Z.G.; CHEN, Y. Effects of storage period on the composition of whole crop wheat and corn silages: Short communication. **Animal Feed Science and Technology** Amsterdam, v. 185, n. 3/4, p. 196–200, 2013.

WEINBERG, Z.G.; ASHBELL, G.; HEN, Y.; AZRIELI, A. The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silages. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.75, p.512-518, 1993.

WILES, P.G.; GRAY, I.K.; KISSLING, R.C. Routine analysis of protein by Kjeldahl and Dumas methods: review and interlaboratory study dairy products. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, Washington, v.81, p.620–632, 1998.

WINTERS, A.L.; MINCHIN, F.R.; MICHAELSON-YEATES, T.P.T.; LEE, M.R.F.; MORRIS, P. Latent and active polyphenol oxidase (PPO) in red clover (*Trifolium pratense*) and use of a low PPO mutant to study the role of PPO in proteolysis reduction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.56, p. 2817–2824, 2008.

YAHAYA, M.S.; KIMURA, A.; HARAI, J.; NGUYEN, H.V.; KAWAI, M.; TAKAHASHI, J.; MATSUOKA, S. Effect of length of ensiling on silo degradation and digestibility of structural carbohydrates of lucerne and orchardgrass. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 92, n. 3/4, p. 141-148, 2001.

YOUNG, K.M.; LIM, J.M.; DER BEDROSIAN, M.C.; KUNG, Jr. L. Effect of exogenous protease enzymes on the fermentation and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95 n. 11, p. 6687-6694, 2012.

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

4 EFEITO DA ESTRATÉGIA DE DESCARREGAMENTO NO VALOR NUTRITIVO DE SILAGEM DE MILHO PARA VACAS LEITEIRAS

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho de vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo silagem de milho proveniente da metade superior (Topo) ou metade inferior (Base) do silo tipo trincheira. Os tratamentos foram delineados conforme o descarregamento do silo: SMTOP (silagem de milho proveniente da metade superior do silo - 0 a 1,5 m de profundidade) e SMBASE (silagem de milho proveniente da metade inferior do silo - 1,5 a 3,0 m de profundidade). Imediatamente após a compactação, o silo foi vedado com filme de polietileno preto e branco 200 μ m. Uma camada de 0,10 m de espessura de bagaço de cana-de-açúcar foi adicionada à superfície do filme plástico para proteger contra raios UV e manter o filme em justaposição à massa ensilada. A silagem de milho foi armazenada por 190 dias. Foram utilizadas 24 vacas distribuídas aleatoriamente em 12 blocos casualizados e arranjo de reversão simples, com períodos de 21 dias. Os animais foram mantidos em sistema de confinamento *Tie-Stall* com baias individuais e alimentados duas vezes ao dia. As dietas foram iso-protéicas (16,5%) e iso-amiláceas (17,0%), e continham 60% de silagem de milho (% da MS). O consumo de matéria seca, a produção e a composição do leite foram determinados entre os dias 15 e 21 de cada período experimental. Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o procedimento Mixed do SAS. A silagem de milho apresentou média de 33,40% de MS, 7,47% de PB, 49,26% de FDN, 26,21% de FDA, 2,31% de Lignina, 23,77% de Hemicelulose, 1,36% de carboidratos solúveis, 2,53% de EE, 3,45% de cinza, 25,70% de amido, 3,46% de $\text{NH}_3\text{-N}$, 0,74% de etanol, 3,30% de ácido acético, 3,63% de ácido lático e pH de 3,97%. O monitoramento da temperatura do painel do silo indicou que 4,8 e 0,4% da área do painel apresentaram temperatura maior que a da referência em 5 e 10° C, respectivamente. O tamanho médio de partícula na ensilagem e a taxa de retirada diária da silagem foram de 11,0 mm e 0,18 m/dia respectivamente. As silagens de milho Topo e Base não apresentaram descarte físico e toda a forragem foi fornecida aos animais. Não houve diferença ($P > 0,07$) entre os tratamentos Topo e Base para os coeficientes de digestibilidade aparente da: PB, EE, Cinza, CNF e amido. Não houve diferença ($P > 0,10$) entre os tratamentos com as dietas formuladas com a silagem de milho do Topo e Base para o índice de seleção de partículas. Não houve diferença ($P > 0,11$) para composição do leite, consumo de alimentos e produção de leite por bovinos leiteiros alimentados com silagem de milho do tratamento Topo ou Base. Como exceção, a silagem a partir da Base, apresentou conteúdo de nitrogênio ureico do leite (NUL) de 8,95 mg/dL, 21% inferior comparado com a silagem a partir do Topo 11,35 mg/dL. A silagem a partir da Base apresentou valores de 2,3; 0,1; 0,1 e 0,07 unidades percentuais maior para as variáveis nutrientes digestíveis totais (NDT), energia digestível (ED), energia metabolizável (EM) e energia líquida (EL) respectivamente, comparado com a silagem a partir do Topo, sem entretanto apresentar efeito sobre o consumo de matéria seca e produção de leite. Sob condições de manejo ótimo do silo, a estratégia de descarregamento da silagem de milho não afetou o desempenho de vacas leiteiras.

Palavras-chave: Densidade; Digestibilidade; Pannel de silo; Temperatura

Abstract

The objective of this study was to evaluate the performance of dairy cows fed diets containing corn silage from the top-half (top) or lower-half (bottom) of bunker silo. The treatments were designed according to silage unloading: corn silage from the upper-half of the silo (0 to 1.5 m deep; top) and corn silage from the lower-half of the silo (1.5 to 3.0 m deep; bottom). Immediately after packing, silo was sealed with polyethylene black and white 200 micrometers film. A layer of 0.10 m of sugarcane bagasse was used to protect the plastic film against ultra violet light and hold the film in juxtaposition to the silage mass. Corn silage was stored during 190 days and used to compose total mixed rations fed to 24 lactating cows allocated in 12 randomized blocks, arranged in a cross-over design with 21 periods. Cows were housed in a tie-stall barn. All diets contained 60% of corn silage and were iso-nitrogen (16.5% CP) and iso-starch (17.0% of starch). Dry matter intake, milk yield and milk composition were determined on days 15 to 21 in each period. Data were analyzed using the Mixed procedure of SAS. Chemical composition of corn silages were similar and averaged: 33.4% dry matter; 7.5% crude protein; 49.3% neutral detergent fiber; 26.2% acid detergent fiber; 2.3% lignin; 23.8% hemicellulose; 1.4% soluble carbohydrates; 2.5% ether extract; 3.5% ash; 25.7% starch; 3.5% N-NH₃ (% CP); 0.74% ethanol; 3.30% acetic acid; 3.63% lactic acid, and pH = 3.97. Approximately 4.8 and 0.4% of the silo panel surface showed temperature greater than 5 and 10 °C, respectively. The rate of daily removal was in average 0.18 m/day. Because no spoiled silage was found, all top and bottom silages were fed to the animals. There was no difference ($P > 0.07$) between top and bottom treatments for apparent digestibility coefficients of crude protein, ether extract, ash, non-fiber carbohydrates and starch, selection index of particles ($P > 0.10$), milk composition and milk yield ($P > 0.11$). However, silage from the bottom decreased the content of milk urea nitrogen by 21% compared with the silage from the top (8.95 vs 11.35 mg/dL). Furthermore, silage from the bottom led to 2.3; 0.1; 0.1 and 0.07 percentage units higher for total digestible nutrients, digestible energy, metabolized energy and net-energy compared with silage from the top, with no effect on dry matter intake and milk production. Under conditions of optimal management of the silo, the strategy of unloading corn silage do not affect the performance of dairy cows.

Keywords: Digestibility; Silo working face

4.1 Introdução

A silagem de milho é a principal fonte de forragem para vacas leiteiras de alta produção no Brasil. Em levantamento recente realizado no Brasil, Bernardes e Rêgo (2014) reportaram que a maior parte desta silagem é armazenada em silos tipo trincheira, que são mais propensos à penetração de ar, especialmente nas partes superiores e próximo às paredes, que são difíceis de compactar e vedar de forma adequada (ASHBELL; LISKER, 1988).

Durante as fases de armazenamento e descarregamento, a deterioração pode ocorrer devido à ação de microrganismos aeróbios, que utilizam a silagem como fonte de nutrientes. Em condições tropicais, em particular quando as estratégias de vedação não são eficientes, geralmente observam-se 10% da massa ensilada visualmente degradada, além das perdas invisíveis. Ashbell e Kashanchi (1987) apontam perdas de MS de até 70% para as silagens do topo e 3 a 10% de perdas para a silagem localizada em zonas centrais do silo trincheira. Por outro lado, com procedimentos de vedação adequados, as perdas visuais podem ser reduzidas para aproximadamente 3% (AMARAL et al., 2012). Como consequência desse processo de deterioração, estão as perdas de matéria seca BOLSEN, (1997) e as perdas de componentes nutricionais importantes (KUNG et al., 1998), consequência direta da oxidação do ácido lático e dos carboidratos solúveis (CAI et al., 1999). A deterioração aeróbia também diminui a qualidade higiênica da silagem, com o risco de maior proliferação de microrganismos indesejáveis, incluindo os patogênicos (LINDGREN; OLDENBURG; PAHLOW, et al. 2002).

Assim, silagens oriundas de regiões superiores do silo (topo) teoricamente apresentam valor nutritivo inferior às silagens de regiões inferiores do silo (base), e pode ter impacto negativo no desempenho dos animais. Em diversas unidades produtivas no Brasil é comum a adoção de estratégia de descarregamento do silo de forma que a silagem do topo e a silagem da base possam ser destinadas à categorias diferentes de animais. Silagens do topo são comumente ofertadas para novilhas ou lotes de vacas de baixa produção, supondo que essa silagem seja de baixa qualidade. Por outro lado, silagens da base são tipicamente fornecidas às vacas de maior produção, possibilitando maior consumo de nutrientes. O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho de vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo silagens de milho oriundas do topo ou da base de um silo tipo trincheira.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Local do Experimento

O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP/ESALQ), no município de Piracicaba/SP (22°42'17" S; 47°37'16" W) e altitude de 554 metros. O clima da região de Piracicaba/SP é classificado como 'clima temperado úmido com inverno seco e verão quente Cwa' de acordo com a classificação de KÖPPEN (1948) disponível no Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas a Agricultura (CEPAGRI, 2014).

4.2.2 Ensilagem e tratamentos

A semeadura do milho híbrido Pioneer 30F90 Bt foi realizada na segunda quinzena de dezembro de 2010, pelo sistema de plantio direto, com 80 cm de espaçamento entre linhas, 60 mil sementes/ha e estande de 50 a 52 mil plantas. Foram aplicados 28 kg de N, 80 kg de P_2O_5 e 56 kg de K_2O na semeadura e 500 kg/ha de 20-00-20 como adubação de cobertura. A colheita da cultura do milho foi realizada na segunda quinzena de abril de 2011, quando a planta atingiu média de 32% de matéria seca, utilizando colhedora de duas linhas acoplada ao trator (Mentamit[®], Cajuru, Brasil). A colhedora foi ajustada para picagem de partículas com tamanho teórico de 10 mm.

A forragem foi transportada e compactada em silo do tipo trincheira, com dimensões de 3,0 m altura × 4,0 m largura (Figura 24). A compactação da silagem ocorreu durante todo o período de colheita forragem (10 h/dia), utilizando-se trator com peso de aproximadamente 50% da massa de forragem transportada ao silo em cada hora (11 t de forragem/hora). Imediatamente após o enchimento do silo, a vedação foi realizada com filme de polietileno preto e branco 200 µm. Ao longo das bordas do silo foram posicionados sacos com pedregulhos para auxiliar na vedação. Na sequência, uma camada de 0,10 m de espessura de bagaço de cana-de-açúcar foi adicionada a superfície do filme plástico para proteger contra raios UV e manter o filme em justaposição à massa ensilada.

Após período de armazenamento de 190 dias, o silo foi aberto e definidos os tratamentos:

- Silagem **TOPO** – Silagem de milho a partir da metade superior do silo (de 0 a 1,5 m de profundidade);
- Silagem **BASE** – Silagem de milho a partir da metade inferior do silo (1,5 a 3,0 m de profundidade).

Figura 24 - Ilustração esquemática do silo trincheteira com os tratamentos de silagem de milho

4.2.3 Rações experimentais e manejo alimentar

As rações experimentais continham 60% de silagem de milho e 40% de concentrados e foram formuladas de acordo com o NRC (2001) considerando produção de 30 kg/dia de leite. Os ingredientes concentrados utilizados nas rações foram: farelo de soja (20,6%), polpa cítrica peletizada (16,9%) e mineral (2,5%). As dietas foram isoprotéicas (16,5% da MS) e isoamiláceas (17% da MS). Pelo fato das dietas não conterem milho moído, a fonte majoritária de amido foi a silagem de milho, o que possibilitou avaliar a digestibilidade *in vivo* do amido da silagem de milho.

As rações completas foram fornecidas duas vezes ao dia (8:00 h e 17:00 h) em quantidade suficiente para permitir sobras de aproximadamente 10%. O teor de matéria seca da silagem de milho foi determinado semanalmente para ajuste das proporções dos ingredientes. O concentrado e o volumoso de cada dieta experimental foram pesados e misturados em vagão autopropelido com capacidade para 500 kg (Super Callan American Callan, USA) por período de 7 minutos. Após a mistura, a ração foi quantificada e distribuída nos cochos individuais.

O consumo diário de MS foi obtido por meio da diferença entre a quantidade de matéria seca fornecida e as sobras, que foram coletadas e congeladas a -20 °C, durante os dias 18, 19 e 20 de cada período experimental e ao final foram compostas por dietas (fornecido) e por

animal (sobras). As amostras dos volumosos, concentrados, ração ofertada e sobras foram analisadas no Laboratório de Bromatologia do departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP).

As amostras foram desidratadas em estufa de ventilação forçada, com temperatura de 55 °C por período de 72 horas. Em seguida foram processadas em moinhos de facas tipo Wiley com peneira de 1,0 mm e armazenadas em embalagens plásticas até o momento da análise. A composição bromatológica das silagens e das rações (Tabela 10 e 11) foi determinada com base em métodos de química líquida.

A determinação do teor absoluto de matéria seca (segunda matéria seca) foi realizada por secagem em estufa a 105°C durante 16 h (AOAC, 2000). As cinzas foram obtidas por combustão das amostras a 600°C durante 4 h (AOAC, 1997). A análise de PB foi realizada pelo método de Dumas (Leco 2000, Leco Instruments Inc) (WILES; GRAY; KISSLING, 1998). O EE foi determinado pelo método de extração Soxhlet segundo AOAC (1997). Os teores de FDN, FDA, CEL, HEM e LIG foram determinados conforme o método de Van Soest, Robertson e Lewis (1991) utilizando-se sulfito de sódio e α -amilase com base no método sequencial proposto pela ANKON[®] Fiber Analyser e descrito por (HOLDEN, 1999). A análise de carboidratos solúveis em etanol (CSE) foi realizada conforme metodologia descrita por HALL (2000).

O teor de amido foi avaliado por hidrólise enzimática e a determinação da glicose resultante, analisada por espectrometria (HALL, 2009). Em tubos de 50 mL com tampa rosqueável foi adicionada 2 mg de amostra, solução tampão de acetato de sódio e 300 μ L de α -amilase termo-estável Novozymes (Termamyl, 2X). Os tubos foram deixados em estufas por 1 h a 105 °C. Após, foi adicionado 500 μ L da enzima amiloglicosidase (300U/mL – *Aspergillus niger*, Novozymes (Sigma[®] A7095, 50mL) e os tubos incubados por 2 horas a 50 °C. As amostras foram diluídas na proporção 1:1 (500 μ L de amostra digerida + 500 μ L de água destilada). A leitura da concentração de glicose resultante da hidrólise enzimática do amido foi realizada em espectrofotômetro a 505 nm, utilizou-se o kit Doles[®] (método glicose oxidase).

A segunda sub-amostra foi congelada em freezer para preparo do extrato aquoso e determinações do N-NH₃ conforme método colorimétrico descrito por Chaney e Marbach (1962), adaptado para uso em micro-placas (absorbância de 550 nanômetros). O ácido láctico foi analisado por colorimetria em espectrofotômetro (leitura em 565 nm) de acordo com metodologia adaptada de PRYCE (1969).

A terceira sub-amostra (500 g) foi utilizada na avaliação do tamanho de partícula da silagem (TMP) (Tabela 11), baseada na estratificação das partículas por meio do método *Penn State Particle Size* (LAMMERS; BUCKMASTER; HEINTICHS, 1996).

Tabela 10 - Composição bromatológica das silagens de milho

Item	Topo	Base	EPM ²
Matéria seca estufa, % MV	32,88	33,92	0,73
Matéria seca corrigida ¹ , % MV	34,43	36,09	0,81
MS estufa/MS corrigida	0,96	0,94	-
Proteína bruta, % MS	7,19	7,75	0,14
Fibra em detergente neutro, % MS	48,89	49,63	1,00
Fibra em detergente ácido, % MS	25,78	26,63	0,48
Lignina, % MS	2,40	2,21	0,08
Hemicelulose, % MS	23,38	24,15	0,45
Carboidratos solúveis, % MS	1,37	1,35	0,11
Extrato etéreo, % MS	2,49	2,57	0,04
Cinza, % MS	3,11	3,78	0,17
Amido, % MS	25,00	26,40	0,01
Nitrogênio amoniacal, % N	3,31	3,61	0,25
pH	3,97	3,97	0,02

¹ Matéria seca corrigida conforme equação de Weissbach, 2009; ² EPM – erro padrão da média.

Tabela 11. Composição das rações experimentais

Ingredientes (%MS)	Tratamentos	
	Silagem Topo	Silagem Base
Silagem de milho	60,30	59,85
Farelo de Soja	20,51	20,74
Polpa cítrica peletizada	16,45	16,64
Núcleo mineral	2,74	2,77
Nutrientes (%MS) ¹		
MS, % MV	43,22	44,12
PB, % MS	16,55	16,73
FDN, % MS	34,08	34,72
EE, % MS	2,20	2,25
Cinzas, % MS	5,77	6,30
CNF, % MS	41,40	40,00
Amido, % MS	16,94	16,67
Estratificação de partículas		
19 - 38 mm, %	8,29	10,36
8 - 19 mm, %	40,29	40,64
< 8 mm, %	51,96	49,30
TMP, mm	9,86	10,41

¹ PB – proteína bruta; FDN – fibra em detergente neutro; EE – extrato etéreo; CNF – carboidratos não fibrosos; TMP – tamanho médio da partícula.

Assim, foi obtido o material retido com diâmetro superior a 19 mm, entre 19 e 8 mm e inferior a 8 mm. O TMP foi estimado pela ponderação da proporção de retenção do material em cada uma das peneiras utilizadas.

A proporção de material retido em cada peneira para a ração ofertada e para as sobras foi utilizada para determinar o índice de seleção (IS) de partículas, calculado como o consumo observado de cada fração do alimento retido em cada peneira (LAMMERS; BUCKMASTER; HEINRICHS, 1996) e expresso como porcentagem do consumo predito daquela fração (% da matéria natural). Valores de IS (<100%) indicam recusa, ingestão preferencial (>100%), ausência de seleção (=100%) (LEONARDI; ARMENTANO, 2003).

Os teores de álcoois, ésteres, ácidos graxos voláteis e acetona Tabela 12, foram determinados em cromatógrafo gasoso com detector de massas (GC-MS) (GCMS QP 2010 plus, Shimadzu®, Kyoto, Japan), usando coluna capilar (Stabilwax, Restek®, Bellefonte, USA; 60 m, 0,25 mm ø, 0,25 µm crossbond carbowax polyethylene glycol) e parâmetros analíticos conforme as recomendações do fabricante.

Tabela 12 - Produtos de fermentação das silagens de milho

Item	Topo	Base	EPM ¹
Ácido láctico, % MS	2,99	3,78	0,26
Ácido acético, % MS	2,85	3,25	0,12
Etol, % MS	0,51	0,53	0,04
Ácido propiônico, % MS	0,48	0,53	0,02
1,2-Propanodiol, % MS	0,27	0,65	0,09
1-Propanol, % MS	0,21	0,18	0,03
2,3-Butanodiol, % MS	0,16	0,10	0,02
Álcool iso-propílico, mg/kg	1548	8	365
Ácido butanóico, mg/kg	507	665	240
Lactato de etila, mg/kg	117	128	7
Ácido valérico, mg/kg	141	82	34
Ácido iso-butírico, mg/kg	38	73	19
Ácido iso-valérico, mg/kg	52	55	13
2-Butanol, mg/kg	42	24	7
Acetato de etila, mg/kg	27	22	2
Acetato de propila, mg/kg	22	13	3
Acetona, mg/kg	12	15	1

¹ EPM – erro padrão da média.

O teor de matéria seca em estufa à 55°C foi corrigido para produtos voláteis de acordo com equação de (WEISSBACH, 2009): MS corrigida (%MV) = MS estufa (%MV) + 0,08 × ácido láctico (%MV) + 0,77 × 1,2-propanodiol (%MV) + 0,87 × 2,3-butanodiol (%MV) + 0,95

× ácidos graxos voláteis* (%MV) + lactato de etila (%MV) + 1-propanol (%MV) + 2-butanol (%MV) + acetato de propila (%MV) + etanol (%MV) + álcool iso-propílico (%MV) + acetato de etila (%MV) + acetona (%MV). Os ácidos graxos voláteis* incluem: ácido acético + ácido propiônico + ácido iso-butírico + ácido butírico + ácido iso-valérico + ácido valérico. O teor de matéria estuda 55°C foi corrigido para produtos voláteis de acordo com equação de (WAISSBACH, 2009): $MS \text{ corrigida (\%MV)} = MS \text{ estufa (\%MV)} + 0,08 \times \text{ácido láctico (\%MV)} + 0,77 \times 1,2\text{-propanodiol (\%MV)} + 0,87 \times 2,3\text{-butanodiol (\%MV)} + 0,95 \times \text{ácidos graxos voláteis* (\%MV)} + \text{lactato de etila (\%MV)} + 1\text{-propanol (\%MV)} + 2\text{-butanol (\%MV)} + \text{acetato de propila (\%MV)} + \text{etanol (\%MV)} + \text{álcool iso-propílico (\%MV)} + \text{acetato de etila (\%MV)} + \text{acetona (\%MV)}$. Os ácidos graxos voláteis* incluem: ácido acético + ácido propiônico + ácido iso-butírico + ácido butírico + ácido iso-valérico + ácido valérico.

A partir da quarta sub-amostra foi preparado extrato aquoso por meio da adição de 0,225 L de água destilada estéril em 25 g de amostra fresca (Kung et al., 1984), a qual foi homogeneizada durante 4 minutos em homogeneizador de alimentos (Nova Ética® Vargem Grande Paulista, Brasil) e realizada a leitura do pH.

4.2.4 Gradiente de temperatura no painel do silo

Durante o descarregamento do silo, foi determinado o perfil de temperatura do painel do silo em cada período experimental. Imediatamente após a retirada da silagem para alimentação dos animais durante o turno matutino, foram medidos 44 pontos de temperatura (4 coordenadas na vertical e 11 coordenadas na horizontal) na metade esquerda da face do painel do silo (Figura 25). As temperaturas foram monitoradas com termômetros de bulbo, inseridos a uma profundidade de 0,2 m. Foi assumido que as temperaturas da metade direita do painel fossem o espelho da metade esquerda. Foi utilizado o software Surfer 10 (Golden Software®, Golden, USA) para gerar o mapa térmico a partir dos registros de temperatura do painel do silo. A temperatura da região central (núcleo) foi definida como temperatura referência. A diferença entre as temperaturas das amostras de silagens e a temperatura referência foi calculada para cada ponto (dT) e utilizada como um índice de aquecimento associado a deterioração aeróbia (BORREANI et al., 2010). As áreas com dT maior que 5 e 10°C também foram calculados.

Figura 25 - Pontos de controle de temperatura com termômetro de bulbo, no painel do silo

4.2.5 Animais e instalações experimentais

Foram utilizadas vinte e quatro vacas da raça Holandesa com produção de leite média de 30 kg/d e peso corporal (PC) médio de 680 kg e 250 dias em lactação no início do experimento. Os animais foram alojados em confinamento tipo *tie stall* em baias com dimensões de 1,35 m de largura $\times$ 2,0 m de comprimento, cama de areia e equipado com sistema de cochos e bebedouros individuais. A remoção dos dejetos era realizada durante a ordenha, mantendo as instalações sempre limpas. Ainda, as instalações continham sistema de arrefecimento, com sistema de micro aspersão e ventilação.

As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia (6:30 h e 17:30 h). Após cada ordenha, os animais permaneciam em área de descanso por período de 30 a 40 minutos. O experimento compreendeu dois períodos experimentais de 21 dias. Em cada período, 14 dias foram destinados à adaptação dos animais e os últimos sete dias para a coleta de amostras e dados.

4.2.6 Produção e composição do leite

A produção de leite foi registrada entre os dias 15 e 21 de cada período, por meio de medidor mecânico. Na mesma época, amostras compostas de quatro ordenhas consecutivas (ordenha da manhã e ordenha da tarde durante dois dias) foram colhidas e conservadas em bromopol para quantificação dos constituintes do leite. As amostras coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Análise de Leite, da Clínica do Leite do Departamento de Zootecnia da USP/ESALQ. As concentrações de gordura, proteína, lactose e caseína foram determinadas por leitura de absorção infravermelha utilizando-se o equipamento Bentley

2000[®] e a contagem de células somáticas foi realizada por citometria fluxométrica utilizando-se equipamento Somacount 300[®]. As concentrações de nitrogênio ureico do leite (NUL) foram determinadas por leitura de absorção infravermelha utilizando-se o equipamento da marca FOSS[®].

A produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (LC 3,5% G) foi calculada a partir da fórmula (TYRRELL; REID, 1965): $LC\ 3,5\% \ G = (0,4324 \times \text{kg de leite}) + (16,216 \times \text{kg de gordura})$. O teor e a excreção de energia no leite, em Mcal/kg, foram calculadas segundo as equações (NRC, 2001): $EL_L\ (\text{Mcal/kg}) = (0,0929 \times \% \text{ gordura}) + (0,0547 \times \% \text{ proteína}) + (0,0395 \times \% \text{ lactose})$ e $\text{Excreção de } EL_L\ (\text{kg/d}) = \text{Prod. Leite (Mcal/d)} \times EL_L\ (\text{Mcal/kg})$

A excreção urinária de nitrogênio N (g/d) foi estimada a partir da concentração de nitrogênio ureico do leite (NUL, mg/dL) e da produção de leite (kg/d): (Excreção urinária de N = - 127 + 13,1 $\times$ NUL + 6 $\times$ produção de leite), conforme (NOUSIAINEN et al, 2004). Com a perda de N na urina, foi estimada a emissão de óxido nitroso (N₂O, kg/vaca/ano) e seu equivalente em CO₂(CO₂-eq, kg/vaca/ano), usando os valores de referência para o IPCC-2006 (AMEE, 2012).

4.2.7 Digestibilidade aparente *in vivo*

A digestibilidade aparente no trato total das rações experimentais foi avaliada por meio de marcador externo óxido de cromo (Cr₂O₃). Entre os dias 10 e 19 de cada período, os animais receberam diariamente duas capsulas de óxido de cromo via oral, imediatamente antes de cada alimentação (5:30 h e 16:00 h). Amostras de fezes foram coletadas e congeladas, após cada administração das cápsulas entre os dias 15 e 19, totalizando 10 sub-amostras por animal. Ao final do experimento as amostras foram descongeladas e compostas por animal por período, para a determinação do teor de cromo e demais análises bromatológicas, que foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP. Foram avaliados os teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA). As metodologias empregadas foram as mesmas utilizadas nas análises das silagens e rações, conforme verificado no item 4.2.3.

A concentração fecal de cromo foi determinada por fluorescência de raio X com dispersão de energia (EDXRF), no laboratório de Instrumentação Nuclear do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP, Piracicaba, SP. De acordo com Korndorf, Abdalla e Bueno (2001), alíquotas de 1 g de fezes foram inseridas em recipientes próprios

(Polyethylene X-ray Sample Cups. Chemplex Industries. USA) para determinação por meio de EDXRF de forma individual correspondendo a cada animal em cada subperíodos experimental.

As amostras foram agitadas por 50 segundos com tubos de raio X com alvo de molibdênio e filtro de níquel, operando a 10 kV/20 mA. Para a detecção de raios X característicos, foi utilizado um sistema de alta resolução, utilizando um semicondutor de silício ativado com lítio acoplado a um analisador de pulsos multicanal. Os espectros obtidos foram interpretados pelo aplicativo (Analysis of X-Ray Spectra by Iterative Least Square Fitting, AXIL). A produção fecal (PF) foi estimada pela equação (MERCHEN, 1993):

$$Pf \text{ (kg/d)} = \frac{Im \text{ (g/d)}}{Cf \text{ (g/g)}}$$

Sendo:

Pf = produção fecal em kg/dia, em matéria seca;

Im = Ingestão do marcador, em g/dia por dia;

Cf = concentração fecal do marcador, em g/g de matéria seca de fezes.

O coeficiente de digestibilidade aparente (D) dos nutrientes foi calculado segundo a equação (MERCHEN, 1993):

$$D \text{ (\%)} = 100 \times \frac{((CMS \times \%Nr) - (Pf \times \%FEZES_{nutri.}))}{(CMS \times \%Nr)}$$

Sendo:

D = digestibilidade aparente;

CMS = consumo, em kg/dia, em matéria seca;

Pf = produção fecal, em kg/dia, em matéria seca;

%Nr = porcentagem do nutriente na ração;

%FEZES_{NUTRI.} = porcentagem do nutriente nas fezes.

O coeficiente de digestibilidade do amido (DA) também foi predito por equações: 1) DA amido (%) = 99,95 – 1,1367 × (amido fecal) [OWENS e HASSEN, 2011]; 2) DA amido (%) = 95,29 – 1,1667 × (amido fecal) + 0,18559 × (amido da dieta) [OWENS e HASSEN, 2011]; 3) DA amido (%) = 99,63 – 2.2489 × (amido fecal) + 0,02168 × (amido da dieta) +

$0,037546 \times (\text{amido fecal}) \times (\text{amido da dieta})$ [OWENS e HASSEN, 2011]; e 4) DA amido (%) = $100 - (1,25 \times \text{amido fecal})$ [FREDIN et al., 2014].

4.2.8 Determinação de derivados de purinas

Nos dias 17 e 19 foram coletadas amostras de urina de cada animal três horas após a alimentação (coleta *spot*), para estimar o fluxo de proteína microbiana, por meio de derivados de purinas. As amostras foram compostas e acidificadas com ácido sulfúrico (3 mL de ácido/40 mL de amostra) e armazenadas a temperaturas de -20 °C para posterior determinação das concentrações de alantoína, ácido úrico e creatinina por cromatografia líquida Czauderna e Kiwalczyk, (2000), no Laboratório de Nutrição Animal - CENA/USP, Piracicaba/SP.

4.2.9 Análises estatísticas

O delineamento experimental foi blocos casualizados com arranjo em reversão simples. Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o procedimento MIXED do SAS (2003) usando o seguinte modelo: $y_{ijkl} = \mu + B_i + V(B)_{j(i)} + P_k + T_l + \varepsilon_{ijkl}$ onde: μ : média geral; B_i : efeito fixo de bloco ($i = 1$ a 12); $V(B)_{j(i)}$ efeito aleatório de vaca dentro de bloco ($j = 1$ a 24); P_k = efeito fixo de período ($k = 1$ ou 2); T_l = efeito fixo de tratamento ($l = \text{Topo ou Base}$) ε_{ijkl} : resíduo.

4.3 Resultados e Discussão

A composição bromatológica da silagem de milho está apresentada na Tabela 10, para ambos os tratamentos de silagem de milho (Topo e Base). A silagem apresentou valores médios para nutrientes e perfil de fermentação dentro da variação reportada na literatura (KUNG e SHAVER, 2000). A composição das rações experimentais está apresentada na Tabela 11, as dietas dos diferentes tratamentos foram propositalmente formuladas para serem semelhantes, isso possibilitou avaliar as diferentes estratégias de descarregamento do silo sobre o valor nutritivo da silagem de milho para as vacas leiteiras. Os resultados da Tabela 11 sugerem a similaridade entre os tratamentos propostos e a adequação dos ajustes planejados.

A silagem de milho é um componente importante em dietas de gado leiteiro e a determinação dos produtos de fermentação em silagem de milho tem demonstrado grande diversidade de compostos orgânicos voláteis (COV) (CHUNG et al., 2009). Em revisão de

literatura, Hafner et al., (2013) indicou que os álcoois são responsáveis pela maior parte das emissões em silagem de milho, sendo dominante o etanol; os ácidos, principalmente o ácido acético; os aldeídos e ésteres, que são mais voláteis que os ácidos e álcoois. Conforme os autores, esses ácidos, álcoois, aldeídos são provavelmente produzidos por bactérias enquanto que os aldeídos também podem ser produzidos por meio da oxidação dos álcoois e os ésteres formados com reações abióticas.

Nesse sentido, de acordo com a Tabela 12, foram identificados 17 compostos entre ácidos, álcoois, ésteres e cetona a partir de silagem de milho armazenada em silo do tipo trincheira por 190 dias. Embora na silagem de milho do atual experimento não tenha sido testada a aplicação de aditivos microbianos, nas silagens da base, por estarem em melhor condição de armazenamento, em ambiente com maior ausência de oxigênio comparada a silagem do topo, é provável que as condições tenham sido mais adequadas para o desenvolvimento natural da bactéria *L. buchneri*. Essa suposição é suportada pela maior presença dos ácidos acético, propiônico e 1,2 propanodiol em silagens oriundas da base do silo (Driehuis; Oude Elferink; Spoelstra et al., 1999). Ainda, ambas as silagens (topo e base) apresentaram traços do álcool 1-propanol, indicativo da presença da bactéria *Lactobacillus diolivorans* capaz de produzir 1-propanol a partir de 1,2-propanodiol (KROONEMAN et al., 2002).

Essas suposições procedem a partir de estudo realizado conduzido por Driehuis; Oude Elferink; Spoelstra (1999) os quais demonstraram a ocorrência de microrganismos epifíticos (ex. *L. buchneri*). Hafner et al. (2013) relataram que, silagens tratadas com aditivos microbianos, por exemplo a bactéria *Lactobacillus buchneri*, podem apresentar concentrações elevadas de ácido propiônico. No entanto, o ácido propiônico não é o produto final da bactéria *Lactobacillus buchneri*, mas a bactéria *Lactobacillus diolivorans* pode degradar um produto do *Lactobacillus buchneri*, 1,2-propanodiol, em ácido propiônico e 1-propanol (KROONEMAN et al., 2002).

Diferentemente, a maior presença do álcool 2-butanol na silagem topo, pode ser indicativo de fermentações indesejáveis, uma vez que esse álcool segue a rota de produção do etanol e parece estar relacionado com o metabolismo de leveduras (ROOKE e HATFIELD, 2003). Analogamente, a concentração do álcool iso-propílico também conhecido como 2-propanol, foi 196 vezes maior na silagem do topo em relação silagem da base. Provavelmente esse álcool seja derivado de rotas metabólicas de leveduras, sendo mais um indicativo que, embora a vedação e compactação da silagem tenham sido excelentes, silagens

do topo são mais propensas a infiltração de oxigênio pela superfície do silo em relação à silagens da base, podendo ocorrer fermentação por leveduras mesmo em pH baixo (Pahlow et al., 2003) ou ocorrência de outros microrganismos deterioradores. Da mesma forma, a presença de concentrações superiores de 2,3-butanodiol nas silagens do topo podem indicar fermentação indesejável em alguma extensão, sendo esse álcool produzido por enterobactérias, bactérias lácticas, bacilos e clostrídios (McDonald; Henderson e Heron et al., 1991; Siemerink et al., 2011), já a acetona, parece ser um metabolito originado a partir de fermentação clostrídica (ROOKE e HATFIELD, 2003).

Weiss e Auerbach (2012) analisaram as concentrações de ácido láctico, ácido acético, etanol, acetato de etila e lactato de etila de silagens de milho de 11 fazendas comerciais. As silagens foram armazenadas por aproximadamente 90 a 180 dias, e apresentaram concentrações (base MS) variando de 3,75 a 8,69% de ácido láctico; 1,04 a 2,83% de ácido acético; 1,04 a 2,83% de etanol; 12 a 64 mg/kg de acetato de etila e 47 a 1305 mg/kg de lactato de etila. Ainda, os autores verificaram para cada aumento de 0,5% da MS de etanol, as concentrações de ésteres aumentaram 100 mg/kg de MS. Assim, a proporção entre etanol e ésteres totais é de aproximadamente 50:1. Da mesma forma, as concentrações de etanol em silagem de milho, tem sido positivamente correlacionada com a presença de ésteres Weiss et al. (2009), assim como Daniel et al. (2013a) também verificaram correlação positiva entre a concentração de etanol e a concentração de ésteres em silagem de cana-de-açúcar. Esses valores de produtos de fermentação quando comparados aos verificados no atual estudo (Tabela 12), demonstram a grande variabilidade nas suas concentrações, esse fato demonstra a necessidade de mais estudos para compreensão dos mecanismos de produção e seus possíveis efeitos no desempenho animal. Embora seja difícil atribuir a um único composto a queda no consumo voluntário de MS, alguns dos produtos de fermentação verificados em silagens, em especial o ácido acético podem afetar negativamente o consumo de MS (DINIUS; HILL e NONER 1968; HUTCHINSON e WILKINS, 1971; DANIEL et al., 2013b).

Apesar das peculiaridades encontradas para as silagens oriundas do topo e da base no presente estudo, as rações experimentais não promoveram alteração no consumo de matéria seca (CMS) pelas vacas ($P = 0,20$), na produção de leite ($P = 0,69$) e na composição do leite ($P > 0,15$), com exceção do nitrogênio ureico no leite (NUL). Da mesma forma, a eficiência energética para a produção de leite não foi afetada pela dieta ($P = 0,17$; Tabela 13), indicando semelhança no valor nutritivo das silagens de milho oriundas de ambas as regiões (Topo e Base). A silagem armazenada no silo trincheira não apresentou áreas visivelmente deterioradas, dessa forma, toda a silagem foi fornecida aos animais.

Tabela 13 - Composição do leite e desempenho de vacas leiteiras alimentadas com silagem de milho proveniente dos tratamentos Topo ou Base armazenadas em silo trincheira por 190 dias

Item ¹	Tratamentos		EPM ²	P
	Silagem Topo	Silagem Base		
CMS, kg/d	23,26	24,11	0,72	0,20
Leite, kg/d	28,16	28,49	0,90	0,69
Leite 3,5% G, kg/d	29,27	28,05	0,95	0,33
Gordura, %	3,83	3,66	0,12	0,30
Proteína, %	3,54	3,48	0,05	0,24
Gordura:Proteína	1,09	1,05	0,03	0,50
Caseína, %	2,78	2,72	0,05	0,39
Caseína:Proteína, %	77,9	78,1	0,17	0,11
Lactose, %	4,52	4,54	0,03	0,51
NUL, mg/dL	11,35	8,95	0,45	<0,01
CCS, × 1000/mL	124	134	-	-
Log CCS	1,94	1,99	0,06	0,43
Gordura, kg	1,05	0,98	0,04	0,23
Proteína, kg	0,95	0,96	0,03	0,89
Excreção EL _L , Mcal/d	20,03	19,37	0,67	0,39
EL leite:CMS, Mcal/kg	0,85	0,80	0,03	0,17

¹ CMS – consumo de matéria seca; NUL – nitrogênio ureico no leite; CCS – contagem de células somáticas; EL – energia líquida;

² EPM – erro padrão da média.

A concentração do NUL das vacas que consumiram silagem a partir do tratamento Base, foi de 8,95 mg/dL e diminuiu em 21% comparada com a silagem a partir do Topo 11,35 mg/dL. Embora os valores de NUL possam ser considerados baixos, a alta concentração de proteína do leite (~3,5%) e a razão gordura:proteína no leite (~1) indicaram oferta dietética adequada de proteínas (HUTJENS; CHASE, 2010 e NOUSIAINEN et al., 2004). A proteína bruta da dieta e o teor de energia metabolizável são os principais fatores que afetam o NUL (HUTJENS; CHASE, 2010; NOUSIAINEN et al., 2004; OLTNER; WIKTORSSON, 1983). Como as dietas foram semelhantes em termos de proteína bruta (~16,6%), a energia digerida no rúmen poderia ter sido superior para a silagem Base em relação a silagem do Topo, mesmo sendo contrário à estimativa da eficiência energética baseadas na produção de leite. A partição de energia pode ter sido diferente entre as dietas, uma vez que mudanças no peso corporal e escore de condição corporal não foram observadas.

Admitindo que proteólise mais intensa poderia ter ocorrido na silagem do Topo (McDonald, Henderson e Heron, 1991) a ingestão de proteína degradável no rúmen também poderia ter sido aumentada para vacas alimentadas com a referida silagem. Conforme Nousiainen et al. (2004) pode haver efeito da proteólise sobre a concentração de NUL. No entanto, o teor de N-NH₃ médio das silagens foi de 3,46% do N-total, valor considerado aceitável para silagem de milho de acordo com Kung e Shaver (2000) o qual considera teores normais entre 5 a 7% do N-total para silagens de milho. Dessa forma, os teores de N-NH₃ verificados nesse experimento, indicam baixa proteólise, e consequentemente, pequeno efeito sobre a concentração de NUL.

Na Tabela 14 estão apresentadas as variáveis relacionadas à síntese de proteína microbiana no rúmen, indicada pela excreção de derivados de purinas na urina.

Tabela 14 - Excreção urinária de derivados de purina e balanço de nitrogênio no animais alimentados com as silagens experimentais

Item	Tratamentos		EPM ³	P
	Silagem Topo	Silagem Base		
Alantoina/Creatinina	2,24	2,56	0,12	0,90
Ácido úrico/Creatinina	0,78	0,77	0,06	0,84
Alantoina+Ácido úrico/Creatinina	3,02	3,03	0,16	0,98
Consumo N, g/d	615,92 (100%)	645,57 (100%)	19,10	0,11
N fecal, g/d	177,35 (28,7%)	174,59 (27,9%)	5,36	0,58
N urina ¹ , g/d	191,63 (31,2%)	159,84 (24,4%)	7,08	<0,01
N leite, g/d	152,76 (24,7%)	153,06 (23,5%)	5,71	0,95
ΔN^2 , g/d	94,68 (15,4%)	157,74 (24,2%)	12,31	<0,01

¹ Estimativa nitrogênio excretado na urina: N-urina = (-127 + 13,1 × NUL + 6 × produção de leite);

² Balanço de N;

³ EPM – erro padrão da média.

Ao contrário da concentração de NUL, as concentrações de derivados de purinas na urina não foram afetadas pelos tratamentos ($P > 0,84$). No entanto, apesar dos tratamentos não alterarem o consumo de N e a perda fecal de N, as vacas recebendo rações contendo silagem da base do silo, apresentaram maior retenção de N ($P < 0,01$), indicada pelo maior balanço de N (ΔN).

O consumo de nitrogênio por vacas em lactação é utilizado para a produção de proteína do leite, acumulado na carcaça ou excretado nas fezes e na urina. Assim, o nitrogênio pode potencialmente contribuir para a poluição ambiental: na forma de amônia (poluição do ar) ou nitrato (contaminação do solo e águas de lençóis freáticos). Dessa forma, vários trabalhos

sobre excreção de N foram realizados em bovinos de leite em lactação [Castillo et al. (2001); Frank, Persson e Gustafsson (2002); Kulling et al. (2001)] buscando compreender e reduzir as excreções de nitrogênio para o ambiente.

No atual experimento, a partir do conteúdo de NUL e da produção de leite, foi possível estimar a excreção urinária de nitrogênio. As dietas compostas de silagem de milho da Base, sugerem perda de N-urinário ~20% menor ($P < 0,01$), em comparação com a dieta de silagem a partir do Topo (159,84 e 191,63 g/vaca/d), o que resultou em menores perdas de N (menos 11,6 kg N/vaca/ano). Sob a perspectiva de aquecimento global, isto poderia ser traduzido em $<0,35$ kg N_2O /vaca/ano, equivalente a 124 kg CO_2 -eq/vaca/ano (IPCC, 2006). No presente estudo, NUL parece ter sido uma resposta periférica, mas demonstra que silagens bem manejadas podem reduzir a poluição do ar e a emissão de gases de efeito estufa. Em última análise e sob uma perspectiva ambiental, a redução das excreções de nitrogênio para as dietas com silagem da Base, podem vir a tornar-se opção de manejo sustentável de silo para propriedades leiteiras buscando adequação à legislação ambiental.

Recentemente, Borreani, Bernardes e Tabacco (2008); Borreani e Tabacco (2010) avaliaram parâmetros qualitativos em silagens de milho e verificaram que as regiões superficiais e periféricas do silo são as principais áreas com degradação aeróbia, enquanto que em regiões mais ao centro e na base dos silos a degradação é menos evidente. Nas condições de manejo do silo do presente estudo, as imagens termográficas indicaram temperaturas baixas da silagem de milho em todo o painel do silo (Figura 26). Somente 4,8% e 0,4% da área do painel apresentaram temperaturas de referência (dT) maiores que 5 e 10°C, respectivamente. Borreani e Tabacco (2010) encontraram valores semelhantes, 3,7 e 0,8% respectivamente, para os silos que apresentaram bom manejo, em uma pesquisa do norte da Itália. Os autores verificaram temperaturas de até 54,5°C nas regiões periféricas dos silos, como também, quando a temperatura do painel do silo foi maior a 5°C em relação à temperatura de referência, a contagem de leveduras foi superior a 5 log ufc/g e o pH era superior a 4,5.

Recomendações gerais apontam que silagens com contagens de até 10^4 ufc/g de fungos filamentosos são adequadas para o fornecimento aos animais ruminantes, enquanto que contagens maiores a 5×10^6 e 1×10^7 ufc/g devem ser descartadas (CHEN; WEINBERG, 2009). As pesquisas de Chen e Weinberg (2009); Borreani e Tabacco (2010) mostram que aumentos de temperatura no painel dos silos trincheiras em fazendas, estão intimamente relacionados à atividade microbiana, principalmente o crescimento de fungos filamentosos.

Figura 26 - Imagem térmica da face exposta do silo após descarregamento diário (o silo trincheira não apresentou áreas visivelmente degradadas), temperatura máxima (42,0 °C); temperatura mínima (27,0 °C); temperatura de referência (28,8 °C). Escala de temperatura (°C) está apresentada abaixo da imagem

Dessa forma segundo os autores supracitados e conforme os dados de temperatura verificados no presente estudo, o acompanhamento da temperatura, apresentam aplicações práticas, alertando produtores para o risco da deterioração aeróbia. Podem se configurar em índice para identificar as perdas invisíveis e a avaliação conjunta das áreas visíveis de deterioração, com medições de temperatura no painel do silo, também podem se caracterizar como estratégia para estimar a qualidade da forragem destinada ao consumo dos animais.

Ainda com relação à qualidade das silagens, no atual experimento, o TMP na ensilagem foi de 10 mm (Tabela 11) e favoreceu o processo de ensilagem e a fermentação anaeróbia. McDonald, Henderson e Heron, (1991) comentam que TMP inferior a 20-30 mm, favorece a maior quantidade de carboidratos solúveis na silagem e por isso, maior crescimento das bactérias lácticas. A taxa de retirada da silagem semanal foi de 0,18 m/dia ou 1,26 m/semana, estando de acordo com a recomendação de descarregamento para silos trincheiras bem manejados, os quais devem apresentar taxas de remoção de 1,10 a 1,50 m/semana, conforme recomendação de Pitt e Muck (1993) para a face exposta do silo. Em condições sob temperatura ambiente mais elevada e com maior umidade, as taxas de remoção recomendadas

seriam de 1,35 a 2,10 m, podendo chegar a 3,15 m por semana (BERGER; BOLSEN, 2006). Conforme Holmes (2009) o descarregamento de camadas superiores a 0,30 m/dia asseguram perdas inferiores a 3% de MS para uma ampla faixa de densidades, para propriedades com elevado nível de manejo do silo. É possível diminuir a taxa de remoção da silagem para camadas de 0,15 m/dia sem que as perdas de MS elevem-se a 3% de MS.

Estão apresentados na Tabela 15 os coeficientes de digestibilidade aparente para MS, PB, FDN, EE, MM, CNF e amido.

Tabela 15 - Coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes das rações contendo 60% de silagem de milho e 40% de concentrados

Item ¹	Tratamentos		EPM ⁶	P
	Silagem Topo	Silagem Base		
MS, %	70,42	73,40	0,92	0,01
PB, %	71,25	72,96	0,90	0,07
FDN, %	47,78	54,97	1,60	0,01
EE, %	89,67	89,40	0,55	0,75
MM, %	33,53	42,29	3,53	0,18
CNF, %	92,83	93,55	0,75	0,52
Amido, %	87,77	88,12	1,17	0,85
Amido Owens ² , %	91,99	91,45	0,81	0,67
Amido Owens ³ , %	90,26	89,66	0,83	0,64
Amido Owens ⁴ , %	87,48	85,63	1,72	0,50
Amido Fredin ⁵ , %	91,25	90,66	0,89	0,67

¹ MS – matéria seca; PB – proteína bruta; FDN – fibra em detergente neutro; EE – extrato etéreo; MM – matéria mineral; CNF – carboidrato não fibroso;

² Digestibilidade total do amido (%) = $99,95 - 1,1367 \times (\text{amido fecal})$;

³ Digestibilidade total do amido (%) = $95,29 - 1,1667 \times (\text{amido fecal}) + 0,18559 \times (\text{amido da dieta})$;

⁴ Digestibilidade total do amido (%) = $99,63 - 2,2489 \times (\text{amido fecal}) + 0,02168 \times (\text{amido da dieta}) + 0,037546 \times (\text{amido fecal}) \times (\text{amido da dieta})$;

⁵ Digestibilidade total do amido (%) = $100 - (1,25 \times \text{amido fecal})$;

⁶ EPM – erro padrão da média.

Houve diferença estatística para a digestibilidade da MS e FDN ($P < 0,01$) com valores de (70,42 e 73,40%) e (47,78 e 54,97%) para as silagens do Topo e Base respectivamente, todas as demais variáveis não foram afetadas ($P > 0,07$).

Estudo realizado por Schwab et al. (2002) avaliando processamento e híbrido de milho para silagem, verificaram média de digestibilidade aparente da MS e de FDN de 71,6 e 50,9% da MS, respectivamente, sem diferença estatística entre os tratamentos, esses valores são semelhantes ao verificado no presente estudo, contudo, a digestibilidade aparente do amido para silagens de milho não processada foi de 92,5% da MS, valor superior quando comparado a digestibilidade aparente do amido do presente estudo. Tine et al. (2001) em estudo de

balanço energético em vacas leiteiras recebendo dietas semelhantes as observadas nesse experimento com 60% de silagem de milho *brown midrib* e 40% de concentrado, verificaram valores médios de digestibilidade aparente de 69,33; 70,23 e 54,3% para as variáveis MS, PB e FDN respectivamente, contudo, não houve diferença estatística para a produção de leite para os diferentes tratamentos. Com base no exposto, verifica-se que no presente estudo os valores de digestibilidade da MS, FDN e amido podem ser considerados normais em relação a literatura. Era esperado que as dietas formuladas com silagens da Base apresentassem aumento de digestibilidade e valor energético, principalmente porque a silagem da Base estaria melhor preservada em relação às silagens mais próximas a superfície (Topo), porém, os ganhos em digestibilidade e em valor energético da dieta dessas silagens, não refletiram no aumento do CMS e da produção de leite (Tabela 13).

Ainda, na Tabela 15 estão apresentados os valores de digestibilidade aparente do amido e o amido estimado segundo as equações de FREDIN et al. (2014); OWENS e HASSEN (2011). Mesmo não havendo diferença estatística ($P > 0,50$) entre os tratamentos com dietas de silagem Topo e Base, é grande o interesse de monitorar a digestibilidade do amido em vacas durante o período de lactação. Conforme Firkins et al. (2001), aumentos da digestibilidade no trato total estão associados à produção de leite. A digestibilidade no trato total do amido em vacas leiteiras podendo variar de 70 a 100% Ferraretto et al. (2013); Firkins et al. (2001), sendo influenciado por inúmeros fatores, como: tamanho médio da partícula, método de processamento e armazenamento Ferraretto et al. (2013); Firkins et al. (2001), maturidade da colheita, teor de matéria seca, tempo de armazenamento (HOFFMAN et al., 2011), estratégias de vedação Amaral et al. (2012) como também o tipo de endosperma (LOPES et al., 2009).

A concentração de amido fecal provou ser um indicador acurado de digestibilidade do amido no trato total de bovinos em confinamento (CORONA et al., 2005). Sua concentração também foi usada para avaliar a eficácia do processamento de grãos (ZINN et al., 2007). Da mesma forma, Owens e Zinn (2005) relataram relação de $R^2 = 0,73$ entre amido fecal e digestibilidade do amido no trato total para vacas em lactação. No presente experimento não houve diferença ($P > 0,67$) para a variável amido fecal, no entanto os tratamentos com silagem de milho do topo e da base, apresentaram valores absolutos de 7,0 e 7,47% da MS respectivamente. Conforme Owens e Soderlund (2006), concentrações de amido fecal acima de 5% da MS indicam baixa digestão do amido da silagem de milho. Fredin et al. (2014) verificaram teores típicos de amido fecal entre 0 e 5%, resultando em digestibilidade do amido no trato total de vacas de leite acima de 95%. Esses mesmos autores compilaram dados

de 15 experimentos realizados na Universidade de Wisconsin-Madison, totalizando 1,036 amostras de fezes, e verificaram que a maior parte das amostras de fezes (83%) apresentou teor de amido fecal entre 0 e 5% da MS e somente 13% das amostras de fezes apresentaram teor de amido fecal entre 5 e 8% da MS, intervalo onde se encontram os teores de amido fecal do atual estudo.

Sendo assim, uma possível justificativa para os elevados valores de amido fecal verificados no presente estudo, deve-se em parte ao não processamento do grão de milho presente na planta quando colhida para ser ensilada, sendo mínima a fratura do grão. Dessa forma, a digestibilidade do amido no trato total pode ter sido prejudicada, como consequência, maior excreção de amido nas fezes. Contudo, observou-se que em silo do tipo trincheira bem manejado, atendendo os princípios básicos da ensilagem: vedação, compactação, tamanho de partícula e taxa de retirada, toda a forragem pôde ser bem preservada, mantendo a qualidade nutricional com mínimo de perdas de forragem.

Para os valores de energia, houve diferença ($P < 0,01$) para as variáveis, nutrientes digestíveis totais (NDT), energia digestível (ED), energia metabolizável (EM) e energia líquida (EL) (Tabela 16). No entanto, nas condições desse experimento, mesmo os valores de energia sendo maiores para as silagem Base em relação ao Topo, o consumo de matéria seca e produção de leite não foram afetados significativamente.

De modo geral, quando observado os valores absolutos de energia das dietas, esses foram menores em relação ao trabalho de Tine et al. (2001) os quais verificaram valores de energia: 73,45; 3,10; 2,69 e 1,61 para NDT, ED, EM e EL respectivamente para dietas de 60% de silagem de milho 40% de concentrado, dieta essa, com a mesma relação volumoso concentrado do presente experimento.

Tabela 16 - Valores de energia e NDT das dietas em vacas holandesas em lactação alimentadas com silagem de milho contendo 60% de silagem de milho e 40% de concentrado

Item ¹	Tratamentos		EPM ²	P
	Silagem Topo	Silagem Base		
NDT, %	70,95	73,25	0,80	0,01
ED, Mcal/kg MS	2,84	2,94	0,03	0,01
EM, Mcal/kg MS	2,42	2,52	0,03	0,01
EL, Mcal/kg MS	1,51	1,58	0,02	0,01

¹NDT – nutrientes digestíveis totais; ED – energia digestível; EM – energia metabolizável; EL – energia líquida;

² EPM – erro padrão da média.

A dieta com silagem da Base apresentou maior ($P < 0,01$) valor energético em relação ao Topo, provavelmente porque possa ter fornecido adequado suprimento de carboidratos (energia) para os microrganismos do rúmen, promovendo maior equilíbrio entre a razão proteína:energia das dietas com silagem da Base, uma vez que a energia é o componente mais caro em dietas modernas, e a PB e proteína degradável estão normalmente em excesso (MARINI; AMBURGH, 2005). O maior valor energético das dietas com silagem da Base é consequência direta das ótimas condições de fermentabilidade e preservação da forragem.

Não houve diferença ($P > 0,10$) entre os tratamentos com as dietas formuladas com a silagem de milho do Topo e Base para o índice de seleção de partículas (IS) (Tabela 17). Estes dados condizem ao que foi observado durante a retirada das sobras dos cochos dos animais no experimento. De modo geral, era evidente a maior proporção de material volumoso, como pedaços da palha da espiga e sabugo do milho na composição das sobras.

Tabela 17 - Índice de seleção (IS) de vacas leiteiras alimentadas com os tratamentos contendo silagens de milho impostos durante o experimento

Item	Tratamentos		EPM ¹	P
	Silagem Topo	Silagem Base		
19,0 – 8,0 mm	93,40	97,10	2,83	0,22
8,0 – 19,0 mm	101,66	101,57	0,40	0,83
< 8 mm	100,49	99,55	0,51	0,10

¹- Erro padrão da média.

Como esperado, o consumo de partículas com diâmetro inferior a 19 mm foi priorizado pelos animais em experimento, em detrimento das partículas maiores. Conforme Leonardi, Giannico e Armentano (2005); Ferraretto e Shaver (2012); Maulfair et al. (2010); a preferência por partículas de menor tamanho é um comportamento considerado comum em bovinos. Em dietas com volumosos com partículas longas, é elevada a incidência de comportamento seletivo da dieta consumida, comprometendo a ingestão de fibra fisicamente efetiva (ARMENTANO, 2005). O uso de estratégias que uniformizem o tamanho médio de partículas pode diminuir o IS e as diferenças entre a dieta consumida e dieta oferecida.

O maior uso de colhedoras equipadas com processadores Johnson et al., (1999); Carvalho e Jobim (2014) e o crescente interesse em estudar o tamanho médio de partículas Lammers, Buckmaster e Heinrichs, (1996) tem promovido muitas pesquisas sobre os efeitos do processamento e tamanho de partícula em silagens de milho de planta inteira sobre o desempenho da produção de leite em vacas leiteiras. Contudo, Bal et al. (2000) verificaram

aumento de 1,2 kg/d na produção de leite e aumento de 4,2 unidade percentual na digestão do amido no trato total para dietas com planta de milho processada comparado a não processado.

4.4 Conclusão

Sob condições otimizadas de manejo do silo, a estratégia de descarregamento da silagem de milho não afetou o desempenho de vacas leiteiras. A composição químico-bromatológica média e a digestibilidade das frações FDN e amido das silagens Topo e Base estiveram dentro da expectativa para volumosos de alto valor nutritivo.

4.5 Considerações finais

Silagens com valor nutritivo elevado, livre de patógenos e toxinas e com estabilidade aeróbia adequada só são obtidas se todas as etapas do processo de ensilagem forem executadas com critérios. Recomendações tradicionais têm sugerido que silagens de milho devem ser fermentadas por aproximadamente 3 semanas antes de serem fornecidas aos animais. Entretanto, pesquisas recentes sugerem mudanças no valor nutritivo de silagens estocadas por mais tempo. Com base no presente estudo, silagens de milho devem ser estocadas por no mínimo 1 mês, visando ganhos em digestibilidade, mas se o objetivo for maximizar estabilidade aeróbia e digestibilidade, o silo deve ser mantido fechado por no mínimo 2 meses.

Ignorar boas práticas de conservação deve mitigar o potencial de ganho em valor nutritivo, que possivelmente será sobreposto por maiores perdas de nutrientes, culminado em elevação dos custos de produção da forragem e de produtos gerados pelos animais (ex. leite e carne). Quanto maior o tempo de estocagem, maior a exposição do silo a intempéries climáticas (ex. raios UV) e, conseqüentemente, maiores as chances de infiltração de ar na massa ensilada. A adoção de estratégias de vedação com eficiência elevada e o uso de aditivos que melhorem a estabilidade aeróbia devem ser considerados.

Em condições de manejo inadequado de silos de grande porte, é comum a existência de “duas silagens” armazenadas dentro de um mesmo silo, esta constatação ocorre em muitas propriedades rurais que realizam o manejo de diferenciar a silagem armazenada dentro do mesmo silo, com fornecimento dessas distintas silagens para diferentes categorias animais. Durante a condução do experimento II, ficou evidente que boas práticas de manejo em silo do tipo trincheira, como: rápido enchimento, adequada vedação, compactação, tamanho de partícula e taxa de retirada da silagem conferiram elevada qualidade nutricional da massa de forragem ensilada, não havendo necessidade de distinguir a silagem da camada superior para a alimentação de animais de categorias inferiores, ou silagem de camada inferior para animais de categorias superiores, uma vez que é possível atingir níveis elevados de qualidade, com mínima perda no silo e sobretudo, sendo possível que toda a silagem armazenada mantenha-se com qualidade elevada.

Referências

- AMARAL, R.C.; DANIEL, J.L.P.; SÁ NETO, A.; BISPO, A.W.; LIMA, J.R.; GARCIA, E.H.; ZOPOLLATTO, M.; SANTOS, M.C.; BERNARDES, T.F.; NUSSIO, L.G. Performance of Holstein cows fed diets containing maize silage from silos with different covering methods. In: KUOPPALA, K.; RINNE, M.; VANHATALO, A. (Ed.). INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 16., 2012, Hämeenlinna. **Proceedings...** Hämeenlinna, 2012. p. 470-471.
- AMEE,. IPCC methodology for urine and dung deposition onto managed soils, 2012. Disponível em: <AMEE discover.http://discover.amee.com/categories/Animal_associated_soil_N2O_emissions/data/cattle/calculator>. Acesso em: 10 dec. 2012.
- ARMENTANO, L.F. Separação dos alimentos da dieta completa por vacas em lactação. In: Curso novos enfoques na produção e reprodução de bovinos, 9., 2005. Uberlândia. **Anais...** Uberlândia/MG, 2005. p. 281-295.
- ASHBELL, G.; KASHANCHI, Y. In silo losses from wheat ensiled in bunker silos in a subtropical climate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.40, n.2, p. 95-103, 1987.
- ASHBELL, G.; LISKER, N. Aerobic deterioration in maize silage stored in a bunker silos under farm conditions in a subtropical climate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.45, p. 307-315, 1988.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International** 16th. Ed. Washington, USA, 1997.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International** 17th. Ed. Gaithersburg, USA, 2000.
- BAL, M.A.; SHAVER, R.D.; JIROVEC, A.G.; SHINNERS, K.J.; COORS, J.G. Crop processing and chop length of corn silage: Effects on intake, digestion, and milk production by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, p.1264–1273, 2000.
- BERGER, L.L; BOLSEN, K.K. Sealing strategies for bunker silos and drive-over piles. In: SILAGE FOR DAIRY FARMS: GROWING, HARVESTING, STORING AND FEEDING. **Natural Resource, Agriculture, and Engineering Service**, Harrisburg, Jan. 23-25, 2006.
- BERNARDES, T.F.; DO RÊGO, A.C. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.97, p.1852-1861, 2014.
- BOLSEN, K.K. Issues of top spoilage losses in horizontal silos. In: _____ **Silage: Field to the feedbunk**, 1., 1997. Hershey, 2003. **Proceedings...** Hershey: NRAES, 1997. p.251-304.

BORREANI, G.; BERNARDES, T.F.; TABACCO, E. Aerobic deterioration influences the fermentative, microbiological and nutritional quality of maize and sorghum silages on farm in high quality milk and cheese production chains. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.37, (Supl. Esp.) p.68-77, 2008.

BORREANI, G.; TABACCO E. The relationship of silage temperature with the microbiological status of the face of corn silage bunkers. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v.93, p.2620-2629, 2010.

CAI, Y.; BENNO, Y.; OGAWA, M.; KUMA, S. Effect of applying lactic acid bacteria isolated from forage crops on fermentation characteristics and aerobic deterioration of silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, p. 520-526, 1999.

CARVALHO, I.Q.; JOBIM, C.C. Impacto da tecnologia de ensilagem no valor nutricional da silagem e na resposta animal. In: JOBIM, C.C.; CECATO, U.; CANTO, M.W.; BANKUTI, F.I. (Ed.). SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 5., 2014. Maringá. **Anais...** Maringá, 2014. p.265-285.

CASTILLO, A.R.; KEBREAB, E.; BEEVER, D.E.; BARBI, J.H.; SUTTON, J.D.; KIRBY, H.C.; FRANCE, J. The effect of protein supplementation on nitrogen utilization in lactating dairy cows fed grass silage diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, p.247–253, 2001.

CENTRO DE PESQUISAS METEOROLÓGICAS E CLIMATICAS APLICADAS A AGRICULTURA – CEPAGRI. 2014. Cidade Universitária “Zeferino Vaz” – Campinas/SP. Disponível em: < http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima_muni_436.html > Acesso em: 10 abr. 2014.

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

CHEN, Y.; WEINBERG, Z.G. Changes during aerobic exposure of wheat silages. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.154, p.76–82, 2009.

CHUNG, M.Y.; BEENE, M.; ASHKAN, S.; KRAUTER, C.; HASSON, A.S. Evaluation of nonenteric sources of non-methane volatile organic compound (NMVOC) emissions from dairies. **Atmospheric Environment**, Oxford, v.44, p.786-794, 2009.

CORONA, L.; RODRIGUEZ, S.; WARE, R.A.; ZINN, R.A. Comparative effects of whole, ground, dry-rolled, and steam-flaked corn on digestion and growth performance in feedlot cattle. **The Professional Animal Scientist**, Champaign, v. 21, p.200–206, 2005.

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

DANIEL, J.L.P.; AMARAL, R.C.; SÁ NETO, A.; CABEZAS-GARCIA, E.H.; BISPO, A.W.; ZOPOLLATTO, M.; CARDOSO, T.L.; SPOTO, M.H.F.; SANTOS, F.A.P.; NUSSIO, L.G. Performance of dairy cows fed high levels of acetic acid or ethanol. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.96, p.398–406. 2013b.

DANIEL, J.L.P.; WEISS, K.; CUSTÓDIO, L.; SÁ NETO, A.; SANTOS, M.C.; ZOPOLLATTO, M.; NUSSIO, L. Occurrence of volatile organic compounds in sugarcane silages. Short communication: **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.185, p.101– 105, 2013a.

DINIUS, D.A.; HILL, D.L.; NONER, C.H. Influence of supplemental acetate feeding on the voluntary intake of cattle fed green corn and corn silage. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.51, p.1505-1507, 1968.

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

FERRARETTO, L.F.; SHAVER, R.D. Effect of bovine on lactation performance by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.96, (E-Suppl. 1), (Abstr.). 2013, p.11.

FERRARETTO, L.F.; SHAVER, R.D. Effect of corn shredlage on lactation performance and total tract starch digestibility by dairy cows. **The Professional Animal Scientist**, Champaign v.28, p.639–647, 2012.

FIRKINS, J. L.; EASTRIDGE, M.L.; ST-PIERRE, N.R.; NOFTSGER, S.M. Effects of grain variability and processing on starch utilization by lactating dairy cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.79.(E. Suppl.), p.218–238, 2001.

FRANK, B.; PERSSON, M.; GUSTAFSSON, G. Feeding dairy cows for decreased ammonia emission. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v.76, p.171–179, 2002.

FREDIN, S.M.; FERRARETTO, L.F.; AKINS, M.S.; HOFFMAN, P.C.; SHAVER, R.D. Fecal starch as an indicator of total-tract starch digestibility by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.97, p.1862–1871, 2014.

HAFNER, S.D.; HOWARD, C.; MUCK, R.E.; FRANCO, R.B.; MONTES, F.; GREEN, P.G.; MITLOEHNER, F.; TRABUE, S.L.; ROTZ, C.A. Emission of volatile organic compounds from silage: compounds, sources, and implications. **Atmospheric Environment**, Oxford, v.77, p.827-839, 2013.

HALL, M.B. Determination of starch, including maltooligosaccharides, in animal feeds: comparison of methods and a method recommended for AOAC collaborative study. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 92, n. 1, p.42-49, 2009.

HALL, M.B. **Neutral detergent-soluble carbohydrates, nutritional relevance and analysis**: a laboratory manual. Gainesville: University of Florida, 2000. 42p. (Bulletin, 339).

HOFFMAN, P.C.; ESSER, N.M.; SHAVER, R.D.; COBLENTZ, W.K.; SCOTT, M.P.; BODNAR, A.L.; SCHMIDT, R.J.; CHARLEY, R.C. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starchprotein matrix in high-moisture corn **Journal of Animal Science**, Champaign, v.94, p.2465–2474, 2011.

HOLDEN, L.A. Comparison of methods of *in vitro* dry matter digestibility for ten feeds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.82, n.8, p.1791-1794, 1999.

HOLMES, B.J. Software applications for sizing silos to maximize silage quality. In: ZOPOLLATTO, M.; MURARO, G.B.; NUSSIO, L.G. (Eds.). **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION**, 1., 2009. São Pedro, **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2009. p.189-208.

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

HUTJENS, M.; CHASE, L.E. Interpreting milk urea nitrogen (MUN) values extension, 2010, Lincoln, Disponível em: <<http://www.extension.org/pages/11322/interpreting-milk-urea-nitrogen-mun-values>> Acesso em: 02 fev. 2012.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE – IPCC. Guidelines for national greenhouse gas inventories: N₂O emissions from managed soils, and CO₂ emissions from lime and urea application, **Agriculture, Forestry and Other Land Use**, v.4, Chapter, 11, 2006.

JOHNSON, L.; HARRISON, J.H.; HUNT, C.; SHINNERS, K.; DOGGETT, C.G.; SAPIENZA, D. Nutritive value of corn silage as affected by maturity and mechanical processing: A contemporary review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.82, p.2813–2825, 1999.

KÖPPEN, W. **Climatologia**: con um estudio de los climas de la tierra. México:Fondo de Cultura Economica, 1948. 478p.

KORNDORFER, C.M.; ABDALLA, A.L.; BUENO, I.C.S., NASCIMENTO FILHO, V.F.; OWEN, E.; SUTTON, J.D. Estudo da cinética digestiva em ovinos alimentados com braquiária e alfafa, usando a técnica de fluorescência de raios X. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.7, p.113-121, 2001.

KROONEMAN, J.; FABER, F.; ALDERKAMP, A.; ELFERINK, S.; DRIEHUIS, F.; CLEENWERCK, I.; SWINGS, J.; GOTTSCHAL, J.; VANCANNEYT, M. *Lactobacillus diolivorans* sp nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.52, p.639-646, 2002.

KULLING, D.R.; MENZI, H.; KROBER, T.F.; NEFTEL, A.; SUTTER, F.; LISHCER, P.; M. KREUZER, M. Emissions of ammonia, nitrous oxide and methane from different types of dairy manure during storage as affected by dietary protein content. **Journal of Agricultural Science**, Toronto, v.137, p.235–250, 2001.

KUNG, L. Jr.; GRIEVE, D.B.; THOMAS, J.W.; HUBER, J.T. Added ammonia or microbial inoculate for fermentation and nitrogenous compounds of alfafa ensiled at various percents of dry matter **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 67, p.299–306, 1984.

KUNG, L. Jr.; R. SHAVER, R. Interpretation and use of silage fermentation analysis report. Madison, n.13, v. 3, 5p. 2000. Disponível em: <<http://fyi.uwex.edu/forage/files/2014/01/Fermentation.pdf>>. Acesso em: 19 jun. 2014.

KUNG, L. Jr., SHEPERD, A.C.; SMAGALA, A.M.; ENDRES, K.M.; BESSETT, C.A.; RANJIT, N.K.; GLANCEY, J.L. 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**, Savoy, v. 81, p. 1322-1330, 1998.

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

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

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

LINDGREN, S.; OLDENBURG, E.; PAHLOW, G. Influences of microbes and their metabolites on feed and food quality. In: GENERAL MEETING OF THE EUROPEAN GRASSLAND FEDERATION, 19, 2002. La Rochelle. **Proceedings...** La Rochelle, 2002. p. 503-511.

LOPES, J.C.; SHAVER, R.D.; HOFFMAN, P.C.; AKINS, M.S.; BERTICS, S.L.; GENCOGLU, H.; COORS, J.G. Type of corn endosperm influences nutrient digestibility in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.92, p.4541–4548, 2009.

MARINI, J.C.; AMBURGH, M.E. Partition of nitrogen excretion in urine and the feces of Holstein replacement heifers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.88, p.1778-1784, 2005.

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

MCDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2nd ed. Marlow: Chalcombe Publication, 1991. 340p.

MERCHEN, N.R. Digestion, absorption and excretion in ruminants. In: CHURCH, D.C. (Ed.). **THE RUMINANT ANIMAL DIGESTIVE PHYSIOLOGY AND NUTRITION**, Propect Heights, IL:Waveland, Press, 1993. p.172-201.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**, Washington, 7th.ed. National Academy Press, 2001. 381p.

NOUSIAINEN, J.; SHINGFIELD, K.J.; HUHTANEN, P. Evaluation of milk urea nitrogen as a diagnostic of protein feeding. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87, p.386-398, 2004.

OLTNER, R.; WIKTORSSON, H. Urea concentrations in milk and blood as influenced by feeding varying amounts of protein and energy to dairy cows. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 10, p.457-467, 1983.

OWENS, F.N.; HASSEN, A.T. Calculating starch digestibility by lactating dairy cows from starch concentrations in feed and feces. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.89,(E-Suppl.2):p.26 (Abstr.) 2011.

OWENS, F.N.; SODERLUND, S. Ruminant and postruminal starch digestion by cattle. In: Cattle grain processing symposium. **Proceeding...** 2006, Stillwater. Disponível em: http://beefextension.com/proceedings/cattle_grains06/06-17.pdf. Acesso: 11 de mai. De 2014.

OWENS, F.N.; ZINN, R.A. Corn grain for cattle: Influence of processing on site and extent of digestion. In: SOUTHWEST NUTRITION CONFERENCE, 2005. Tempe, AZ. :University of Arizona, Tucson; New Mexico State University. **Proceeding...** Las Cruces, 2005. p. 86–112.

PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H.(Ed.). **Silage science and technology**, (Ed Madison, Wisconsin, USA: American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America, 2003. p. 31–93.

PITT, R.E.; MUCK, R.E. A diffusion model of aerobic deterioration at the exposed face of bunker silos. **Journal of Agricultural Engineering Research**, Easton, v.55, p.11-26, 1993.

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

ROOKE, J.A.; HATFIELD, R.D. Biochemistry of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H.(Ed.) **Silage science and technology**. Madison, Wisconsin, USA: American Society of Agronomy, ; Crop Science Society of America, ; Soil Science Society of America, 2003. p. 95–139.

SCHWAB, E.C.; SHAVER, R.D.; SHINNERS, K.J.; LAUER, J.G.; COORS, J.G. Processing and chop length effects in brown-midrib corn silage on intake, digestion, and milk production by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85, p.613–623, 2002.

SIEMERINK, M.A.J.; KUIT, W.; LOPEZ CONTRERAS, A.M.; EGGINK, G.; VAN DER OOST, J.; KENGEN, S.W.M. D 2,3-butanediol production due to heterologous expression of an acetoin reductase in *Clostridium acetobutylicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 2, p. 2582-2588, 2011.

TINE, M.A.; MCLEOD, K.R.; ERDMAN, R.A.; BALDWIN, R.L. Effects of brown midrib corn silage on the energy balance of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.84, p.885–895, 2001.

TYRRELL, H.F.; REID, J.T. Prediction of the energy value of cow's milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.48, n.9, p.1215–1223, 1965.

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

WEISS, K.; AUERBACH, H. Occurrence of volatile organic compounds and ethanol in different types of silages. In: KUOPPALA, K.; RINNE, M.; VANHATALO, A. (Ed.).

INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 16., 2012. **Proceedings...** July 2-4, Hämeenlinna, Finland, 2012. p.128-129.

WEISS, K.; KALZENDORF, C.; ZITTLAU, J.; AUERBACH, H. 2009. Novel results on the occurrence of volatile compounds in maize silages. In: BRODERICK, G.A.; ADESOGAN, A.A.T.; BOCHER, L.W.; BOLSEN, K.K.; CONTRERAS-GOVEA, F.E.; HARRISON, J.H.; MUCK, R.E. (Ed.). INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 15., 2009. **Proceedings...** July 27-29, Madison, 2009. p.33-34.

WEISSBACH, F. Correction of dry matter content of silages used as substrate for biogas production. In: BRODERICK, G.A.; ADESOGAN, A.A.T.; BOCHER, L.W.; BOLSEN, K.K.; CONTRERAS-GOVEA, F.E.; HARRISON, J.H.; MUCK, R.E. (Ed.). INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 15, 2009. Madison, **Proceedings...** July 27-29, Madison, 2009. p.483-484.

WILES, P.G.; GRAY, I.K.; KISSLING, R.C. Routine analysis of protein by Kjeldahl and Dumas methods: review and interlaboratory study dairy products. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, Washington, v.81, p.620–632, 1998.

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