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

**Estratégias de vedação e adição de benzoato de sódio no controle de perdas
em silagens de milho e desempenho de vacas leiteiras**

João Pedro Pereira Winckler

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

**Piracicaba
2015**

João Pedro Pereira Winckler
Zootecnista

**Estratégias de vedação e adição de benzoato de sódio no controle de perdas em silagens
de milho e desempenho de vacas leiteiras**

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

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

**Piracicaba
2015**

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

Winckler, João Pedro Pereira

Estratégias de vedação e adição de benzoato de sódio no controle de perdas em silagens de milho e desempenho de vacas leiteiras / João Pedro Pereira Winckler. - - Piracicaba, 2015.

68 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Aditivos 2. Dieta total 3. Estabilidade aeróbia 4. Microbiologia 5. Bovinos leiteiros
6. Produção de leite I. Título

CDD 636.08552
W762e

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

Aos meus pais, Patrícia Fernandes Pereira e Graan Winckler, que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos e trabalharam muito para que eu pudesse realizá-los.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por estar sempre presente em minha vida, me guiando e protegendo, por ter me abençoado com uma família maravilhosa que me dá força para seguir em frente.

Ao Prof. Luiz Gustavo Nussio pelo apoio, orientação, confiança em meu trabalho e pela oportunidade à qual sou muito grato.

A minha família, principalmente meus pais e irmão, pelo amor e por estarem sempre do meu lado, me apoiando nas dificuldades e incentivando a prosseguir com paciência e sabedoria. Amo vocês!

Aos colegas do grupo de Qualidade e Conservação de Forragens (QCF) da ESALQ/USP pela amizade, companheirismo e por terem me ajudado em todo o mestrado, foi uma honra trabalhar com vocês.

Ao João Luiz Pratti Daniel, pela amizade, por compartilhar seu grande conhecimento comigo, por me orientar durante todas as etapas do meu experimento e na elaboração desse trabalho.

A minha colega de mestrado e grande amiga Janielen da Silva, pela amizade e apoio, graças ao seu desespero com relação a prazos eu não deixei de entregar nenhum dos trabalhos e relatórios.

Aos amigos que fiz em Piracicaba, em especial aos companheiros da saudosa república Mamoeiro, vou sentir falta de todos vocês, espero reencontrá-los em breve.

Ao Programa Ciência Animal e Pastagens da ESALQ/USP, pelo suporte ao meu trabalho.

Aos professores do departamento de Zootecnia da ESALQ/USP pelos ensinamentos.

A FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro concedido.

O meu muito obrigado a todos vocês!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 O processo de ensilagem	23
2.2 O processo de deterioração aeróbica	25
2.3 Fatores que influenciam na deterioração aeróbia	25
2.3.1 Influxo de ar no silo	25
2.3.2 A vedação da massa ensilada	26
2.3.3 A abertura do silo	26
2.3.4 Fatores físicos e de manejo	27
2.4 Microrganismos envolvidos na deterioração aeróbia	28
2.5 Aditivos usados no controle da deterioração aeróbia em silagens	29
3 OBJETIVOS E HIPÓTESE	33
3.1 Objetivo geral	33
3.1.1 Objetivos específicos	33
3.2 Hipótese	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Ensilagem e tratamentos	35
4.2 Amostras e variáveis analisadas na forragem fresca	36
4.3 Avaliações dos silos	37
4.4 Ensaio de lactação	41
4.4 Análises estatísticas	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 Avaliações dos silos	45
5.1 Desempenho de vacas em lactação	55
6 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	63

RESUMO

Estratégias de vedação e adição de benzoato de sódio no controle de perdas em silagens de milho e desempenho de vacas leiteiras

Estratégias de vedação tem sido adotadas com o intuito de reduzir a entrada de oxigênio para o interior dos silos. Aditivos químicos como o benzoato de sódio, que apresenta funções antimicrobianas também pode ser empregado para melhoria da estabilidade aeróbia de silagens. Porém, ainda não se sabe se pode causar efeitos adversos no consumo ou metabolismo dos animais alimentados e, conseqüentemente levar a alterações no desempenho animal. Desta forma no presente estudo, objetivou-se avaliar a influência de estratégias de vedação de silos trincheira sobre as perdas de MS e valor nutritivo de silagens de milho e, a adição de benzoato sódio na ração total no valor nutritivo para vacas leiteiras. O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP). A cultura do milho foi colhida com aproximadamente 35% de matéria seca (MS) e ensilada em silos trincheira (capacidade de 40 t). No momento do fechamento dos silos, dois tratamentos foram impostos: (1) lona dupla-face 200 μ m protegida com bagaço de cana-de-açúcar (camada com espessura de 10 cm) (BG) e, (2) aplicação superficial de benzoato de sódio 150 g/m² (diluído em água 1:4) imediatamente antes da vedação com lona dupla-face 200 μ m (BZ). Vinte vacas Holandesas em lactação foram alocadas em cinco Quadrados Latinos 4 $\times$ 4 em períodos de 21 dias (14 d adaptação). As dietas experimentais continham (%MS): 8% de caroço de algodão, 9,5% de polpa cítrica, 18% de farelo de soja, 9,0% de milho moído seco, 2,5% premix mineral + vitaminas e 53% de silagem de milho: BG ou BZ ou silagem de milho BG + 0,15% de benzoato de sódio ou silagem de milho BZ mais 0,15% de benzoato de sódio. O benzoato de sódio foi diluído em água (0,3:1) e aspergido na ração total imediatamente antes de cada trato. Os dados foram submetidos à análise utilizando-se o procedimento MIXED do SAS, através de arranjo fatorial 2 $\times$ 2. A silagem com cobertura de bagaço de cana foi mais eficiente em reduzir a entrada de oxigênio durante o processo de fermentação e, conseqüentemente levou ao menor crescimento de microrganismos deterioradores e melhor conservação dos nutrientes da silagem, resultando em maior digestibilidade da MS. A adição de benzoato de sódio na dose de 0,15% na MN não altera o desempenho de vacas leiteiras.

Palavras-chave: Aditivos; Dieta total; Estabilidade aeróbia; Microbiologia; Bovinos leiteiros; Produção de leite

ABSTRACT

Sealing strategies and addition of sodium benzoate on losses control of corn silage and nutritive value for lactating dairy cows

Sealing strategies have been adopted to reduce oxygen entrance to silo. Chemical additives such as sodium benzoate have antimicrobial activity and it can also promote an aerobic stability on silage. Nevertheless it is still unknown if sodium benzoate supplementation on silage may affect animal consumption or cause deleterious effect on metabolism with influence on animal performance. The objective of this study was using different sealing strategies to assess dry matter loss and nutritional value on corn silage, and the influence of supplementing sodium benzoate on total mixed ration for dairy cattle. This trial was conducted at Animal Science Department of Luiz de Queiroz College of Agriculture (ESALQ/USP). Corn crop was harvested with 35% of dry matter (DM) and ensiled on horizontal silos (40 t capacity). A factorial design (2x2) for silo sealing and benzoate as an additive on dietary feed were evaluated. Silo sealing strategies were confected as follows: (1) Plastic film doubled-sized 200 μm covered with bagasse (layer thickness 10 cm) (BG) and 2) application of sodium benzoate on top surface of ensiled mass pulverizing 150 g m⁻² (dilution of 1:4) sealing it immediately with plastic film double-sided 200 μm (BZ). After 343 days of storage, the silos were open and the lactation trial started. Two dietary treatments evaluated the addition sodium benzoate on feed mixture of total ration. Sodium benzoate was incorporated (+ 0.15 % on total feed) on corn silage from BG and BZ and no incorporation to BG and BZ were used as control treatment. Dietary sodium benzoate was diluted on water (0.3:1 ratio) and pulverized on total ration immediately before each meal. Feed formulation: 8% cottonseed meal, 9.5% citric pulp, 18% soybean meal, 9% dry corn meal, 2.5 % vitamin and mineral premix, and 53% of corn silage. Twenty Holstein cows lactating were allocated in five Latin squares (4 x 4) during 21 days (14 days to acclimate) and fed twice a day. Dry matter intake (DMI), milk yield and quality were recorded between day 15th and 21st from each experimental period. Data were subjected to MIXED procedure from SAS for factorial design (2x2). The silage with sugarcane bagasse coverage was more effective in reducing the oxygen input during the fermentation process and consequently led to lower growth of spoilage microorganisms and better conservation of silage nutrients, resulting in increased digestibility of dry matter. Adding 0.15 % of sodium benzoate on fresh matter diet doesn't affect the performance of dairy cows.

Keywords: Additives; Total mixed ration; Aerobic stability; Microbiology; Dairy cattle; Microbiology; Milk yield

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Revestimento dos silos com filme de polietileno preto, cobertura com filme dupla face, fixação com sacos de pedra e adição de bagaço de cana sobre a lona.....	35
Figura 2 - Representação dos pontos de coleta de temperatura nos silos.....	38
Figura 3 - Representação dos pontos de coleta de pH nos silos	38
Figura 4 - Média de pH registrada nos diferentes pontos do silo (BG).....	47
Figura 5 - Média de pH registrada nos diferentes pontos do silo (BZ)	47
Figura 6 - Temperatura média registrada (°C) nos diferentes pontos do silo (BG).....	48
Figura 7 - Temperatura média registrada (°C) nos diferentes pontos do silo (BZ)	48
Figura 8 - Imagens termográficas registradas do painel dos silos BG e BZ respectivamente .	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características da forragem no momento da ensilagem	37
Tabela 2 - Composição química das dietas experimentais	43
Tabela 3 - Composição bromatológica de silagens de milho oriundas de silos com cobertura de bagaço de cana-de-açúcar ou aplicação de benzoato de sódio	45
Tabela 4 - Perdas na camada superficial de silagens de milho oriundas de silos com cobertura de bagaço de cana-de-açúcar ou aplicação de benzoato de sódio	46
Tabela 5 - Perfil fermentativo do centro e topo de silagens de milho oriundas de silos com cobertura de bagaço de cana-de-açúcar ou aplicação de benzoato de sódio.	51
Tabela 6 - Densidade média das regiões do centro e topo de silagens de milho oriundas de silos com cobertura de bagaço de cana-de-açúcar ou aplicação de benzoato de sódio.....	52
Tabela 7 - Características microbiológicas das regiões do centro e topo de silagens de milho oriundas de silos com cobertura de bagaço de cana-de-açúcar ou aplicação de benzoato de sódio	52
Tabela 8 - Estabilidade aeróbia das regiões do centro e topo de silagens de milho oriundas de silos com cobertura de bagaço de cana-de-açúcar ou aplicação de benzoato de sódio	54
Tabela 9 - Comportamento ingestivo de vacas leiteiras alimentadas com silagens de milho oriundas de silos com cobertura de bagaço de cana-de-açúcar ou aplicação de benzoato de sódio	56
Tabela 10 - Consumo de matéria seca, produção e composição do leite, digestibilidade da matéria seca do leite e utilização da energia por vacas leiteiras alimentadas com silagens de milho oriundas de silos com cobertura de bagaço de cana-de-açúcar (com e sem aditivo).....	57
Tabela 11 - Estabilidade aeróbia das rações totais contendo silagens de milho oriundas de silos com cobertura de bagaço de cana-de-açúcar (com e sem adição de benzoato de sódio na dieta) ou aplicação de benzoato de sódio (com ou sem adição de benzoato de sódio na dieta)	59
Tabela 12 - Microbiologia das fezes de vacas alimentadas com silagens de milho oriundas de silos com cobertura de bagaço de cana-de-açúcar (com e sem adição de benzoato de sódio na dieta) ou aplicação de benzoato de sódio (com ou sem adição de benzoato de sódio na dieta)	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

°C - Grau Celsius

BAL - Bactéria lácticas

cm – Centímetro

CO₂ - Dióxido de carbono

EE- Estrato etéreo

FDN- Fibra em detergente neutro

g – Grama

H⁺ - íon hidrogênio

kg - quilograma

L – Litros

LB - *Lactobacillus buchneri*

m - Metro

mg - Miligrama

min - Minutos

mL - Mililitro

mm - Milímetro

MM- matéria mineral

MO- matéria orgânica

MS - Matéria Seca

NH₃ - Amônia

O₂ - Oxigênio

PB- Proteína Bruta

pH - Potencial Hidrogeniônico

rpm - Rotações por Minuto

ufc - Unidades formadoras de colônias

1 INTRODUÇÃO

A conservação de forragens por meio de ensilagem é uma importante prática na pecuária, pois permite conservar as forragens em condições de clima adversas, como períodos de frio extremo, seca ou quando as culturas de forrageiras são incapazes de serem cultivadas; aproveitar os excedentes de culturas armazenando-as, facilitar o acesso dos animais a forrageiras que seriam de difícil pastejo, além de proporcionar facilidade de manejo, não sendo necessário o corte diário para fornecimento (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK, 2000).

Todas as etapas de ensilagem devem ser feitas de maneira adequada para obtenção de silagens de boa qualidade. Dentre as etapas, a vedação do silo é importante para estabelecimento de um ambiente com mínimas concentrações de oxigênio (PITT et al., 1984). Após a vedação, quando o oxigênio residual é consumido, acontece a fase de fermentação. Nesse momento o ambiente interno do silo torna-se anaeróbio e nessas condições ocorre o rompimento da parede celular das plantas, o conteúdo celular rico em carboidratos solúveis e compostos nitrogenados é extravasado e, servem de substrato para o crescimento microbiano. Esta condição é necessária para o crescimento dos microrganismos desejáveis ao processo de conservação (bactérias láticas) que produzem ácido lático que levam a redução rápida do pH e inibição de outros microrganismos indesejáveis (MUCK, 1991).

Mesmo com uma vedação eficiente, o silo não se torna um ambiente hermético, podendo ocorrer entrada de oxigênio durante o processo de fermentação, principalmente nas zonas do topo e laterais do silo, devido a maior exposição ao oxigênio e menor possibilidade de compactação do material (MUCK et al., 2003). A entrada de oxigênio possibilita o crescimento de microrganismos deterioradores, como fungos e leveduras que podem causar perdas de matéria seca (MS), redução no valor nutritivo das silagens e redução do consumo pelos animais (LINDGREN et al., 1985). Características como elevação da temperatura e presença de mofos são normalmente vistas no campo como sinais de deterioração no momento em que o silo é aberto (WILKINSON; DAVIES, 2012).

Na fase em que o silo é aberto para alimentação dos animais, é inevitável a entrada de oxigênio e, conseqüentemente crescimento de microrganismos indesejáveis. Leveduras são geralmente os iniciadores do processo de deterioração aeróbia, pois podem crescer em baixo pH e, têm a capacidade de degradar ácido lático. A utilização do ácido lático promove elevação do pH e, possibilita o crescimento de outros microrganismos, como bactérias aeróbias e fungos (WOOLFORD, 1990).

No entanto, o processo de deterioração devido à entrada de oxigênio no silo, tanto durante o período de fermentação, como durante a abertura dos silos, pode ser minimizada através da utilização de diferentes estratégias de controle. Dentre estas, estratégias de vedação, como a utilização de diferentes lonas e colocação de materiais de cobertura para reduzir a entrada de oxigênio podem ser utilizadas. Além disso, aditivos químicos como o benzoato de sódio, que apresenta funções antimicrobianas também pode ser empregado para melhoria da estabilidade aeróbia de silagens. Porém, ainda não se sabe se pode causar efeitos adversos no consumo ou metabolismo dos animais alimentados e, consequentemente levar a alterações no desempenho animal.

Desta forma no presente estudo, objetivou-se avaliar a influência de estratégias de vedação de silos trincheira sobre as perdas de MS e valor nutritivo de silagens de milho e, a adição de benzoato sódio na ração total no valor nutritivo para vacas leiteiras.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O processo de ensilagem

O principal objetivo da ensilagem é maximizar a preservação dos nutrientes da forragem para ser fornecida posteriormente. Ao tomar decisões quanto às quais técnicas de manejo aplicar no processo de ensilagem é importante conhecer os eventos que ocorrem durante a preservação da silagem.

O processo de ensilagem pode ser dividido em quatro fases, na fase inicial ou fase aeróbia quando a forragem picada é armazenada no silo, dois processos ocorrem: a respiração e a proteólise. A respiração consiste no consumo dos açúcares da planta convertendo-os em dióxido de carbono e água, utilizando oxigênio e liberando calor. Simultaneamente, as proteases das plantas degradam as proteínas a aminoácidos e amônia, e em menor escala, em peptídeos e amidas. (McDONALD et al., 1991).

A perda de açúcar é essencial do ponto de vista da conservação da forragem. Os açúcares são o principal substrato para as Bactérias Ácido Láticas (BAL) que vão produzir os ácidos para preservar a forragem. Produção de calor em excesso (temperaturas entre 42-44°C) pode resultar em reação de Maillard, que reduz a digestibilidade de componentes das proteínas e a fibra. As principais perdas ocorrem durante a exposição ao ar, antes do fechamento do silo de forma impermeável.

A fase de fermentação ocorre quando é conseguida uma condição de anaerobiose na massa ensilada, nesse momento acontece a proliferação de microrganismos anaeróbicos. As BAL são as mais importantes, pois a forragem é preservada pelo ácido láctico, metabólito destes microrganismos. Outros microrganismos, principalmente membros da família das enterobactérias, esporos de clostrídeos, leveduras e bolores, tem efeitos negativos sobre a silagem. Eles competem com as BAL pelos carboidratos fermentáveis, e muito de seus produtos não tem efeito na ação de preservação.

As enterobactérias tem o pH ótimo entre 6-7, e a maioria das cepas não vão crescer abaixo do pH 5,0. Consequentemente, a população de enterobactérias, que normalmente é alta na forragem pré-ensilada, tem atuação somente durante as primeiras 12-36 horas de ensilagem (LIN et al., 1992) A partir disso o seu número cai rapidamente, dessa forma elas não são um fator importante depois dos primeiros dias da fase de fermentação.

O crescimento de esporos de clostrídeos pode ter grande efeito sobre a qualidade da silagem. Estes microrganismos podem gerar uma fermentação secundária que converte os açúcares e ácidos orgânicos em ácido butírico que resulta em grandes perdas de matéria seca e energia digestível. Clostrídeos proteolíticos fermentam aminoácidos em uma variedade de produtos, incluindo amônia, aminas e ácidos orgânicos voláteis. Assim como as enterobactérias, os esporos clostrídianos são sensíveis a baixo pH, além disso requerem umidade para seu efetivo desenvolvimento. O crescimento de clostrídeos é raro em forragens ensiladas com menos de 65% de umidade, em função da suficiente quantidade de açúcares normalmente presentes para reduzir o pH rapidamente a uma faixa entre 4,6-4,8, faixa esta em que o clostrídeo não se desenvolve (BOLSEN et al., 1993).

O período de fermentação efetiva dura entre 7-21 dias. Forragens ensiladas com umidade superior a 65% normalmente fermentam rapidamente, ao passo que a fermentação é mais lenta quando a umidade é menor que 50%. Para forragens ensiladas com umidade considerada normal (55-75%), a fermentação é completa em 7-14 dias. A partir disso, a fermentação dos açúcares pelas BAL é cessada, em função do baixo pH (entre 4,0-4,2) e/ou devido a falta de açúcares para a fermentação.

No momento em que o crescimento das bactérias ácido lácticas cessa, a massa ensilada entra na fase estável. Se o silo está bem vedado e o pH caiu a níveis baixos, a atividade biológica é quase inexistente nessa fase. Entretanto, reações de quebra de hemicelulose e liberação de alguns açúcares podem ocorrer em pequena quantidade. Se a fermentação cessou devido à falta de carboidratos solúveis, as BAL podem fermentar os açúcares provenientes da quebra da hemicelulose, causando uma nova queda no pH.

Outro fator importante que afeta a qualidade da silagem durante a fase estável, é a permeabilidade do silo ao ar. O oxigênio que entra no silo é utilizado pelos microrganismos aeróbicos e geram aumentos nas populações de leveduras e fungos, perdas na matéria seca e aquecimento da massa ensilada (PAHLOW et al., 2003).

A quantidade de perdas pela entrada de ar nessa fase não se dá somente pela permeabilidade do silo, mas também pela densidade da silagem (BOLSEN et al., 1993). Estas perdas podem ser atenuadas cobrindo a superfície da massa ensilada com lonas de polietileno, o oxigênio pode passar pela lona, mas em uma velocidade muito menor (DICKERSON et al., 1992).

2.2 O processo de deterioração aeróbica

O ponto final da fermentação da silagem é atingido quando os suprimentos de substratos disponíveis terminam, quando o pH da massa ensilada cai até uma faixa onde o crescimento microbiano é inibido, ou quando faltar água disponível na forragem. Estes fatores limitam de forma acentuada o desenvolvimento das bactérias e em menor intensidade bolores e leveduras (AUERBACH, 2003).

A concentração dos produtos da fermentação na silagem é determinada pela composição inicial da forragem e também pelos tipos de microrganismos que se desenvolvem durante o período de armazenamento (BUXTON; O'KIELY, 2007; PAHLOW et al., 2003). Quando a deterioração é causada pela exposição ao ar, o valor nutritivo é reduzido, devido à perda de substratos potencialmente digeríveis no processo de fermentação (HONIG et al., 1999; POPE et al., 2000). A saúde dos animais e a qualidade do leite também podem ser afetados negativamente pelo desenvolvimento de esporos microbianos indesejáveis (Pahlow et al., 2003) e toxinas (PITT, 1995; WILKINSON, 1999; CAVALLARIN et al., 2011). Muitos fatores interagem para determinar o quanto uma silagem pode manter-se estável em exposição ao ar, dos quais o mais importante é a fluxo de oxigênio no interior do silo. (WOOLFORD, 1990; PAHLOW; MUCK, 2009).

2.3 Fatores que influenciam na deterioração aeróbia

2.3.1 Influxo de ar no silo

Os efeitos do ar na qualidade da silagem acontecem de duas formas, primeiramente sobre a camada superficial durante o armazenamento, muitas vezes visível pelo crescimento de fungos. O segundo está relacionado com a estabilidade aeróbia, durante o período de remoção e fornecimento da massa ensilada, normalmente caracterizada pelo aumento da temperatura (SAVOIE; JOFRIET, 2003).

As trocas gasosas durante o período de estocagem são caracterizadas por dois efeitos físicos, segundo o modelo de McGechan e Williams (1994): O fluxo volumétrico e a difusão. O fluxo volumétrico é dependente dos gradientes de pressão, sendo que estes são influenciados principalmente pelo movimento do CO₂ (produzido no processo de fermentação) entre o silo e o ar. Após a fermentação ter ocorrido, a concentração interna de

CO₂ é de 90%, muito superior a externa (McGECHAN; WILLIAMS, 1994), devido ao diferente gradiente de concentração o gás sai por difusão. Se o silo apresenta algum ponto de escape, esse CO₂ é substituído por O₂ e N₂ (ASHBELL; LISKER, 1988). A intensidade com que isso ocorre varia de acordo com a temperatura, presença de fendas na parede do silo, do filme plástico utilizado na vedação e da compactação da silagem. (WEINBERG; ASHBELL, 2003).

2.3.2 A vedação da massa ensilada

As lonas de polietileno utilizadas na cobertura dos silos possuem permeabilidade ao oxigênio e com elevação da temperatura ocorre aumento das trocas gasosas (DEGANO, 1999). Dessa forma, durante no verão as silagens estão mais propensas a deterioração aeróbia, mesmo o silo estando bem vedado, devido ao aumento de permeabilidades das lonas, com consequente movimento gasoso devido à diferença de temperatura e pressão entre o silo e o ambiente externo.

A lona utilizada para a vedação do silo quando protegida com terra, areia, bagaço de cana ou outro material aumenta a adesão entre esta e a massa reduzindo as trocas gasosas com o ambiente e a incidência de raios solares.

Num estudo de quatro anos, realizado por Bolsen (1997) onde 127 silos de diferentes fazendas foram avaliados a perda de matéria orgânica nos 50 cm próximos a superfície dos silos, 47% e 20% do material ensilado foi perdido em silos não selados e silos cobertos com lona de polietileno preta respectivamente.

2.3.3 A abertura do silo

No momento da abertura do silo e a quebra da vedação, a face frontal do silo permanece exposta ao O₂. A partir deste evento, a anaerobiose que anteriormente era o principal fator que determinava a estabilidade da silagem é perdida e a massa se torna instável (WEINBERG; ASHBELL, 2003). A entrada do O₂ é determinada pela densidade alcançada no processo de ensilagem, dessa forma regiões mais periféricas, que são mais porosas, tem maior risco de deterioração aeróbica. (D'AMOURS; SAVOIE, 2004).

A deterioração aeróbia é ocasionada por microorganismos aeróbios, dessa forma o tempo de exposição da silagem ao O₂ (WEINBERG; ASHBELL, 2003), a disponibilidade de

nutrientes e a temperatura ambiental (ASHBELL et al., 2002) e, segundo (OHYAMA et al., 1975), estes três fatores são interdependentes.

A rota fermentativa desejável para a conservação da forragem em forma de silagem é a do tipo homolática onde uma molécula de glicose é convertida em duas de ácido láctico, esse processo não propicia perdas de MS ou de energia, fatores estes que podem favorecer o consumo dos animais (McDONALD et al., 1991). Entretanto, este perfil de fermentação nem sempre evita perdas após a abertura dos silos, sendo que em alguns casos pode aumentá-las (KUNG; STOKES; LIN, 2003).

2.3.4 Fatores físicos e de manejo

A densidade é um dos fatores mais importantes para o controle a deterioração aeróbia, quando a silagem está bem compactada pouco oxigênio permanece entre as partículas e o remanescente é eliminado rapidamente por microrganismos que o utilizam em seu metabolismo. A densidade de silos trincheira é tipicamente menor na superfície e nas laterais, isso ocorre porque no processo de enchimento dos silos a compactação feita por tratores é menos eficaz nas laterais em comparação ao centro do silo. No estudo de Craig et al. (2009) densidades de 113 silos preenchidos com silagem de milho foram quantificadas e verificaram que em média as laterais têm densidade 8% menor em relação ao centro da massa ensilada.

A porosidade é outro fator importante e tem relação direta com a quantidade de ar que irá penetrar no silo, quanto mais porosa for a massa ensilada, mais facilmente o ar entrará. A densidade e a porosidade são relacionadas e dependentes da umidade, estrutura da forragem, estágio de maturidade e tamanho de partícula (HONIG, 1991).

Altas temperaturas ambientais tornam-se um desafio para a produção de silagem, especialmente em relação ao crescimento de microrganismos indesejáveis como clostrídeos e enterobactérias (ADESOGAN, 2009). Apesar da redução da relação ácido láctico/acético em silagens de milho ensiladas a 40°C comparada com 20°C, silagens feitas com temperaturas mais elevadas tem redução na estabilidade aeróbia (KIM; ADESOGAN, 2006). A população de leveduras e a perda de matéria seca foram menores, além disso houve aumento na estabilidade aeróbia nas silagens armazenadas em silos com lona de polietileno preta 150 µm cobertos por camada de terra em comparação aos silos sem cobertura de terra (BERNARDES et al., 2009). Durante o período de armazenagem a massa ensilada sem a camada de terra apresentou temperaturas superiores a 45°C, a camada de terra sobre a lona do outro tratamento

forneceu proteção contra a insloção direta o que provavelmente reduziu a permeabilidade da lona ao oxigênio (BORREANI et al., 2007)

2.4 Microrganismos envolvidos na deterioração aeróbia

As leveduras são normalmente os iniciadores do processo de deterioração de silagens, pois são resistentes ao baixo pH (<4) e baixas concentrações de oxigênio, consomem o ácido láctico produzido durante o processo de fermentação, resultando em compostos como CO₂, água e calor (McDONALD et al., 1991). O problema é que o consumo do ácido láctico leva a elevação do pH e, permite o crescimento de microrganismos indesejáveis resultando em perdas de matéria seca. As áreas superficiais dos silos são mais sujeitas a infiltração de ar, devido a menor compactação e porosidade da massa, bem como dos materiais utilizados na cobertura. Nessas condições a multiplicação de leveduras pode ocorrer durante todo o período de estocagem e no momento de abertura do silo a população pode ser elevada. Segundo Kung et al. (1998) silagens com contagens de leveduras acima de 10⁵ ufc/g são mais propensas a deterioração aeróbia, podendo quebrar a estabilidade em poucas horas.

As condições encontradas durante o processo de conservação da forragem (anaerobiose e baixo pH) são desfavoráveis para o desenvolvimento da grande maioria dos fungos. Entretanto, caso o silo seja passível de entrada de ar, como perfurações na lona ou durante o período de abertura do silo, o desenvolvimento destes microrganismos se torna viável, principalmente em regiões que estão mais em contato com o ar (CAVALLARIM et al., 2004).

Os fungos filamentosos podem ser considerados coadjuvantes na deterioração aeróbia de silagens, pois, durante o desabastecimento do silo, o desenvolvimento deles acontece em sucessão ao crescimento das leveduras (McDONALD et al., 1991). Contudo, a deterioração aeróbia dos alimentos de uso zootécnico causado por fungos filamentosos determina perda de elementos nutritivos e de energia, além do risco de contaminação com micotoxinas (LINDGREN; OLDENBURG; PAHLOW, 2002).

Recentemente, tem-se observado um grande interesse a despeito da origem e qualidade dos produtos destinados à alimentação humana. Dessa forma, um segmento que vem crescendo atualmente é o relacionado com triagem de micotoxinas em vários tipos de alimentos. Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos com diferentes níveis de toxicidade em várias espécies animais, incluindo a espécie humana. A incidência destes metabólitos nos organismos animais pode causar problemas de saúde e,

conseqüentemente, perdas econômicas em sistemas de produção animal (NEDELNÍK; MORAVCOVÁ, 2006). Isto se dá pelo efeito residual ao longo da cadeia alimentar, isto é, transferindo as micotoxinas ingeridas pelo animal aos alimentos (carne e leite) destinados à alimentação humana (OLDENBURG, 1991).

Segundo Nedelník e Moravcová (2006), os efeitos das micotoxinas no organismo animal são diversos, podendo gerar danos às membranas mucosas, e assim, reduzir a absorção de nutrientes, com também, diminuir a atividade do fígado, rins, órgãos reprodutivos e sistema imunológico.

Os gêneros *Clostridium* e *Bacillus* são formadores de esporos, o que os torna resistentes ao oxigênio, ao calor, ácidos orgânicos e enzimas digestivas, fatores estes que favorecem a passagem dessas bactérias de um ambiente para outro (LINDGREN; OLDENBURG; PAHLOW, 2002).

As bactérias do gênero *Bacillus*, podem ser aeróbias ou aeróbias facultativas. A ação desses microrganismos esta relacionada a redução de estabilidade aeróbia em silagens devido a utilização de carboidratos solúveis e produção de ácidos orgânicos que não tem efeito protetor para a silagem (LINDGREN; OLDENBURG; PAHLOW, 2002).

Bactérias do gênero *Clostridium* são estritamente anaeróbios, porém durante a deterioração aeróbia eles podem se multiplicar devido a formação de nichos de baixa concentração de oxigênio e pH elevado na massa de silagem (TABACCO; BORREANI, 2002). Estes nichos são produzidos por microrganismos como as leveduras que consomem o ácido láctico na presença de oxigênio (DRIEHUIS; Te GIFFEL, 2005).

A presença de esporos na silagem pode levar a contaminação do leite, pois quando são ingeridos passam pelo trato digestório e chegam até as fezes dos animais. O leite produzido na glândula mamária é praticamente estéril, porém os microrganismos presentes no ambiente e nas fezes o contaminam, o grau de contaminação está diretamente relacionado a população de *Clostridium* e *Bacillus* nas fezes (LINDGREN; OLDENBURG; PAHLOW, 2002).

2.5 Aditivos usados no controle da deterioração aeróbia em silagens

O principal objetivo em produzir silagem é conservar da melhor forma possível a qualidade original da cultura ensilada, para esse fim, aditivos vem sendo utilizados como alternativas para restringir a fermentação e/ou a deterioração aeróbia (KUNG; STOKES; LIN, 2003).

Os aditivos podem ser classificados de acordo com a sua habilidade de influenciar a fermentação, sendo classificados da seguinte forma: estimuladores de fermentação, inibidores de fermentação, inibidores de deterioração, nutritivos ou absorventes. A utilização de cada um deles é determinada pelas características da planta a ser ensilada (KUNG; STOKES; LIN, 2003).

Os inoculantes bacterianos, classificados aditivos biológicos são estimuladores de fermentação e podem ser divididos em duas categorias: homofermentativos que produzem ácido láctico a partir de carboidratos solúveis e os heterofermentativos que degradam esses substratos a ácido láctico, acético e propiônico, entre outros (MUCK, 2010)

Recentemente as pesquisas eram voltadas a obtenção de inoculantes para alta produção de ácido láctico por meio da utilização de bactérias homofermentativas, porém estas não são eficientes em manter a estabilidade aeróbia após abertura do silo (RIBEIRO; QUEIROZ; NUSSIO, 2005). Silagens inoculadas com bactérias homofermentativas apresentam maior contagem de leveduras que na presença de oxigênio consomem o ácido láctico e favorecem a deterioração aeróbia.

Atualmente as pesquisas são focadas em inoculantes heterofermentativos que além de ajudar na redução do pH da massa ensilada, produzem ácidos orgânicos com efeito antifúngico como o ácido acético, aumentando assim a estabilidade aeróbia pós abertura dos silos. (DANNER et al., 2003).

Dentre as alternativas para controle da deterioração de silagens, os aditivos químicos estão entre as principais. O ácido benzoico oriundo do sal benzoato de sódio é largamente utilizado na indústria de alimentos para controle de leveduras e fungos (MAKENI CHEMICALS, 2004). Recentemente, a ação positiva deste aditivo vem sendo testada em silagens com intuito de melhorar as características fermentativas e a estabilidade aeróbia; (KLEINSCHMIT; SCHIMIDT; KUNG, 2005; PEDROSO et al., 2006; SIQUEIRA et al., 2007). No entanto, apesar dos benefícios encontrados nas características fermentativas e na estabilidade aeróbia de uma diversidade de silagens, os trabalhos que demonstram a influência do consumo deste aditivo, nas doses normalmente empregadas, sobre o desempenho de animais são escassos.

Woolford (1975) verificou o poder inibidor do sorbato de potássio e benzoato de sódio sobre clostrídeos, leveduras e fungos filamentosos. A concentração de benzoato de sódio necessária para a inibição de leveduras e fungos é reduzida à medida que o pH é reduzido. Em pH 6 são necessários 110 e 55mM de benzoato de sódio para inibir leveduras e fungos, respectivamente. Em pH de 3 a 4, essa necessidade foi reduzida a 2 e 3 mM.

Pedroso et al. (2007) avaliando silagem de cana-de-açúcar, observou que a aplicação de 0,1% de benzoato de sódio inibiu a população de leveduras, além de conservar a concentração de carboidratos solúveis. Bernardes et al. (2004) ao testar a inclusão de benzoato de sódio na ensilagem do campim-Marandu em diferentes doses, observaram menor perda de matéria seca na abertura do silo a partir da dose de 0,1%.

No estudo realizado por Bernades et al. (2014), foram testadas duas doses de aplicação de sorbato de potássio e benzoato de sódio em silagem de milho, nas concentrações de 0,1 e 0,2% da matéria natural. Ambos os aditivos tornaram as silagens mais estáveis e reduziram a deterioração aeróbia, sendo que a adição de 0,2% manteve o pH mais baixo com menores contagens de leveduras e foi mais efetiva em aumentar a estabilidade aeróbia.

Da Silva et al. (2014) avaliaram o efeito de duas cepas de *L. buchneri* e adição de benzoato de sódio 0,2% em silagem de milho. O tratamento com benzoato de sódio apresentou maior concentração de carboidratos solúveis residuais, menor perda de MS, maiores coeficientes de digestibilidade e maior estabilidade aeróbia (161 horas contra 40,8 horas do tratamento controle).

3 OBJETIVOS E HIPÓTESE

3.1 Objetivo geral

Determinar a influência de diferentes estratégias de vedação de silos e adição de benzoato de sódio na dieta total no valor nutritivo de silagens de milho e desempenho de bovinos leiteiros.

3.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar a qualidade química, nutricional e a estabilidade aeróbia de silagens de milho provenientes de silo vedado com lona dupla-face 200 μm protegida com bagaço de cana-de-açúcar (BG) ou de silagem de milho proveniente do silo vedado com lona dupla-face 200 μm e aplicação superficial de benzoato de sódio 150 g/m^2 (BZ).
- Avaliar o desempenho de vacas leiteiras alimentadas com silagens de milho provenientes dos tratamentos BG e BZ e, suplementadas ou não com benzoato de sódio 0,15%.

3.2 Hipótese

Diferentes estratégias de vedação podem reduzir o processo de deterioração das silagens durante a fase de fermentação, aumentar a estabilidade aeróbia e melhorar a conservação dos nutrientes e, consequentemente melhorar o desempenho de vacas leiteiras. A adição de benzoato de sódio na ração total pode aumentar a estabilidade aeróbia da mesma, porém pode alterar o metabolismo e o desempenho destes animais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ensilagem e tratamentos

O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), em Piracicaba - SP (22°42'17" S; 47°37'16" W). A cultura do milho (híbrido Agrocere AG 1051) foi plantada nas dependências do mesmo local e colhida com aproximadamente 35% de matéria seca. Para isso, foi utilizada uma colhedora de duas linhas acoplada a um trator. O equipamento foi regulado para corte com tamanho médio de partícula de 10 mm. A compactação feita utilizando um trator com peso equivalente a 40% da massa trazida ao silo por hora. Ao fechamento, duas estratégias de vedação foram impostas:

- 1) Lona dupla-face (face interna preta e externa branca) com 200 µm de espessura, protegida com bagaço de cana-de-açúcar (camada com espessura de 10 cm) (BG);
- 2) Aplicação superficial de benzoato de sódio 150 g/m² (diluído em água, 1:4) imediatamente antes da vedação com lona dupla-face (face interna preta e externa branca) com 200 µm (BZ).

Os dois silos experimentais do tipo trincheira foram escavados em área de declive, sem revestimento de alvenaria. O fundo e as laterais foram revestidos com filme preto de polietileno, de modo a evitar o contato da forragem com o solo. As dimensões dos silos eram de aproximadamente 4,0 m de largura, 1,5 de altura e 15 m de profundidade, com capacidade para cerca de 45 t de forragem fresca (Figura 1). A operação de ensilagem foi realizada durante os dias 26/02/2013 e 01/03/2013. Ambos os silos foram abastecidos e fechados de forma simultânea.

Figura 1 - Revestimento dos silos com filme de polietileno preto, cobertura com filme dupla face, fixação com sacos de pedra e adição de bagaço de cana sobre a lona

4.2 Amostras e variáveis analisadas na forragem fresca

Amostras da forragem fresca foram coletadas para determinação da composição bromatológica (Tabela 1), para isso, as amostras foram desidratadas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas para determinação da matéria seca. Após a secagem as amostras foram moídas em moinho do tipo Wiley em peneira com orifício de 1,0 mm. A partir das amostras pré-secadas e moídas, as concentrações de matéria seca a 105°C, matéria mineral (MM), e extrato etéreo (EE) foram determinadas conforme Association of Official Analytical Chemists – AOAC (1990) e a concentração de proteína bruta (PB) segundo o método descrito por Wiles, Gray e Kissling (1998), por meio da combustão das amostras segundo o método de Dumas, utilizando-se auto-analisador de nitrogênio, marca LECO modelo FP-528.

As concentrações de fibra em detergente neutro (FDN) foram analisadas conforme método proposto pela ANKON® Fiber Analyser (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY). Os altos valores de FDN obtidos nas análises de amostras de alimentos concentrados e forragens contendo amido indicam que o detergente neutro não é eficiente na solubilização dos mesmos. Por isso, foram adicionados ao detergente amilase termooestável e sulfito de sódio.

O teor carboidratos solúveis das silagens foi determinado pelo método Fenol-Sulfúrico (HALL, 2000). Para isso, foram produzidos extratos com 0,5 g de amostra seca e moída em peneira com orifício de 1,0 mm em balões tipo erlenmeyer e 100 mL de solução alcoólica (solução etanol 80%). As aberturas dos balões foram vedadas e em seguida foram submetidos a agitação durante 4 horas. Após o período de agitação os extratos foram filtrados em papel Whatman Nº 541. Padrões foram feitos com diferentes concentrações de sacarose e a absorbância registrada, para posterior comparação com as amostras analisadas. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro MARCONI® Janway 6305, com $\lambda=490$ nm e o açúcar utilizado como padrão foi a sacarose.

Tabela 1 - Características da forragem no momento da ensilagem

Item ¹	Tratamentos ²	
	BG	BZ
MS, %MN	35,22	35,03
MM, %MS	1,80	1,82
PB, %MS	6,13	6,18
EE, %MS	2,41	2,57
FDN, %MS	54,48	54,15
CNF, %MS	35,15	35,28
CHOsol, %MS	5,61	5,96

¹ MS: matéria seca; MM: matéria mineral; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; FDN: fibra em detergente neutro; CNF: carboidratos não fibrosos; CHOsol: carboidratos solúveis

² BG: Silagem de milho proveniente do silo vedado com lona dupla-face 200 µm protegida com bagaço de cana-de-açúcar (camada com espessura de 10 cm); BZ: silagem de milho proveniente do silo vedado com aplicação superficial de benzoato de sódio 150 g/m² (diluído em água, 1:4) imediatamente antes da vedação com lona dupla-face 200 µm

4.3 Avaliações dos silos

Após 343 dias de armazenamento os silos foram abertos e a silagem foi utilizada para alimentar 20 vacas em lactação. Diariamente nos períodos da manhã (06:00) e da tarde (16:00), foram retiradas manualmente camadas de $17 \pm 2,8$ cm de espessura do painel de cada silo, sendo que metade do painel foi retirado pela manhã e metade a tarde, as medidas de avanço do silo foram tomadas semanalmente. As perdas decorrentes da deterioração superficial foram quantificadas e expressas como porcentagem do total da silagem retirada. A silagem foi julgada como deteriorada quando apresentou coloração diferenciada, presença de fungos ou temperatura elevada.

Avaliações da temperatura dos painéis dos silos foram feitas uma vez por período, imediatamente após a retirada da silagem para ser fornecida aos animais. Com o auxílio de uma câmera termográfica Fluke Corporation® foram registradas imagens em cada período de avaliação e em seguida utilizando termômetros de bulbo, foram mensurados 42 pontos da metade do painel de cada silo, a 15 cm de profundidade, sendo sete pontos na vertical (0, 10, 20, 30, 50, 100 e 150 cm no sentido da superfície em contato com a lona para o fundo do painel) e cinco pontos na horizontal (0, 40, 80, 120, 160 e 200 cm no sentido da parede lateral para o centro do painel) (Figura 1). A coleta de mais pontos próximos a superfície dos silos se

deu em função de que nesse local é maior a entrada de oxigênio, dessa forma a variação de temperatura também é superior.

Figura 2 - Representação dos pontos de coleta de temperatura no painel dos silos

Nos quatro períodos do experimento, uma vez a cada período, amostras de 25 g foram coletadas de cinco pontos na vertical (0, 20, 50, 100 e 150 cm no sentido da superfície em contato com a lona para o fundo do painel) e cinco pontos na horizontal (0, 50, 100, 150 e 200 cm no sentido da parede lateral para o centro do painel) totalizando 25 pontos (Figura 2). As amostras foram diluídas em 225 mL de água destilada e o valor do pH foi medido por potenciômetro digital (DIGMED®- DM20).

Figura 3 - Representação dos pontos de coleta de pH no painel dos silos

A cada período foi mensurada a densidade do topo e do centro dos silos. Para isso foi utilizada motosserra da marca Stihl®, cubos da parte superior e central dos silos foram retirados, suas arestas medidas e a silagem retirada pesada.

Amostras das silagens do topo e do centro dos silos foram coletadas a cada período para determinação do perfil microbiológico. Os extratos das silagens foram preparados a partir de 25 g de amostra e 225 mL de água destilada autoclavada, homogeneizados durante quatro minutos em velocidade de 150 rpm no equipamento Lab-Blender Stomacher (Steward Laboratory, London). A partir dos extratos filtrados em gaze foram feitas as demais diluições em solução Ringer (decimal seriada, 10⁻² a 10⁻⁶) colocada em tubos do tipo Falcon. Em seguida foi realizado o plaqueamento em profundidade (pour plate) em placas de Petri descartáveis contendo (Malt Extract Agar Base – Himedia®) para contagens de leveduras e fungos filamentosos. As placas permaneceram em BOD com temperatura ajustada em 30°C e as contagens foram feitas após 48 e 72 horas respectivamente. A contagem de bactérias ácido lácticas (BAL) seguiu procedimento semelhante, foi utilizado para esta cultura o meio seletivo (Lactobacilli MRS Agar - Acumedia®), as placas foram colocadas em BOD com temperatura ajustada em 30°C por 48 horas e foram consideradas as contagens das placas que apresentaram mais de 20 e menos de 300 unidades formadoras de colônia (UFC), os resultados foram expressados como logaritmo na base 10 (KUNG et al., 1984).

Para o plaqueamento de clostrídios e bacillus, extratos das amostras do topo e do centro dos silos foram preparados (25g de amostra e 225 mL de água destilada autoclavada), homogeneizados durante quatro minutos e diluídos em solução Ringer, assim como feito para as culturas de leveduras, fungos filamentosos e bactérias ácido lácticas. Após serem feitas as diluições, os tubos Falcon foram megulhados em banho maria a 80°C por 13 minutos, ou seja, exatamente 10 minutos após o líquido contido nos tubos atingir 80°C. O objetivo de se fazer o tratamento térmico foi eliminar todos os microrganismos exceto os formadores de esporos termo tolerantes (Clostridium, Bacillus). O meio utilizado para o plaqueamento de clostrídios foi o Reinforced Clostridial Medium (RCM) com adição de agar, diluídos em água destilada e pré-aquecido em micro-ondas. Após autoclavar o meio, foi feita a adição do vermelho neutro e ciclocerina pré-diluídos em 50 mL de água destilada autoclavada. Para a cultura de bacillus foi utilizado o Plate Count Agar diluído em água destilada, pré-aquecido em micro-ondas e autoclavado. As placas de clostrídios foram alocadas em BOD em 37°C de temperatura e a contagem foi feita após 120 horas. As placas de bacillus foram colocadas em BOD em 34°C e a contagem foi feita após 48 horas. As unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas e os resultados foram expressos em logaritmo na base 10.

Os extratos das silagens produzidos para determinação do perfil microbiológico, foram centrifugados durante 15 minutos a $10.000\times g$, a porção sobrenadante foi armazenada em tubos do tipo eppendorff de 1,5 mL e mantidas congeladas a -20°C para posterior análise dos produtos de fermentação (acetona, acetato de etila, álcool isopropílico, etanol, acetato de propila, 2-butanol, 1-propanol, lactato de etila, ácido acético, 2,3-butanoldiol, ácido propiônico, ácido butírico, propilenoglicol, ácido iso-valérico, ácido valérico) utilizando-se 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 recomendação do fabricante.

A determinação da concentração de ácido láctico foi realizada por método colorimétrico, proposto por Pryce (1969). Padrões com diferentes diluições de ácido láctico foram feitas para obtenção da curva-padrão. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro MARCONI® Janway 6305, com $\lambda=565\text{ nm}$.

Nos quatro períodos foi realizado ensaio de estabilidade aeróbia de amostras de silagem dos silos. Em sala com temperatura controlada, permitindo variação de $\pm 1^{\circ}\text{C}$ em relação a temperatura média, amostras de 3 kg do topo e do centro dos silos foram alocadas em baldes plásticos, sem que houvesse compactação da massa. Em cada balde, no centro da massa, foi adicionado um “datalogger” calibrado para aferir a temperatura a cada 30 minutos por 10 dias. Utilizando o software (Novus Produtos Eletrônicos Ltda) os dados foram recuperados ao final do período de avaliação. Os parâmetros avaliados foram o tempo necessário para a quebra da estabilidade, ou seja, o tempo necessário para a massa eleve sua temperatura 2°C acima da temperatura ambiente (KUNG; STOKES; LIN, 2003), acúmulo da variação da temperatura aos 5 e 10 dias, temperatura máxima e tempo para atingir a temperatura máxima.

Diariamente foi quantificada as perdas decorrentes da deterioração superficial, expressas como porcentagem do total da silagem retirada. Toda a silagem retirada do silo foi pesada, a fração deteriorada foi separada e não fornecida aos animais. A silagem foi julgada como deteriorada quando apresentou coloração diferenciada, presença de fungos ou temperatura elevada.

4.4 Ensaio de lactação

O ensaio de lactação foi realizado com vinte vacas da raça holandesa (peso vivo médio de $640,47 \pm 118,88$ kg), com média de 236 dias de lactação. Os animais foram mantidos em sistema de confinamento do tipo “tie stall”, com cocho individual, e bebedouro comum a cada duas vacas, a instalação era dotada de sistema de arrefecimento composto por micro aspersores e ventiladores. O delineamento experimental adotado foi o fatorial 2x2 disposto em quadrado latino com quatro períodos de 21 dias, sendo 14 dias de adaptação e 7 de coleta. As vacas foram agrupadas quanto a produção de leite e número de partos, posteriormente alocadas aleatoriamente a um dos 5 quadrados (4 animais por quadrado).

A ordenha dos animais e o fornecimento da ração era realizado duas vezes ao dia (06:00h e 16:00h). As dietas foram misturadas em vagão auto propelido (Super Callan, American Callan, USA) por período de 10 minutos. A ração era fornecida ad libitum, permitindo sobra de 10% do ofertado, o ajuste da quantidade foi feito diariamente.

As dietas experimentais foram formuladas de acordo com o NRC Gado de Leite (2001) visando produção de 35 kg/dia. As dietas continham (%MS): 8% de caroço de algodão, 18% de farelo de soja, 9,5% de polpa cítrica, 9% de milho moído, 2,5% de premix vitamínico e mineral e 53% de silagem de milho proveniente de um dos silos com diferentes estratégias de vedação. Além disso foi feita ou não a adição de benzoato de sódio (0,15%) aspergido nos dos dois tratamentos, totalizando quatro dietas.

1) Dieta com silagem de milho proveniente do silo com a estratégia de vedação: Lona dupla-face (face interna preta e externa branca) com 200 μ m de espessura, protegida com bagaço de cana-de-açúcar (camada com espessura de 10 cm) (BG);

2) Dieta com silagem de milho proveniente do silo com a estratégia de vedação: Lona dupla-face (face interna preta e externa branca) com 200 μ m de espessura, protegida com bagaço de cana-de-açúcar (camada com espessura de 10 cm) (BG) + Adição de Benzoato de Sódio (0,15%);

3) Dieta com silagem de milho proveniente do silo com a estratégia de vedação: Aplicação superficial de benzoato de sódio 150 g/m² (diluído em água, 1:4) imediatamente antes da vedação com lona dupla-face (face interna preta e externa branca) com 200 μ m (BZ).

4) Dieta com silagem de milho proveniente do silo com a estratégia de vedação: Aplicação superficial de benzoato de sódio 150 g/m² (diluído em água, 1:4) imediatamente antes da vedação com lona dupla-face (face interna preta e externa branca) com 200 μ m (BZ) + Adição de Benzoato de Sódio (0,15%);

Em cada período amostras das silagens e concentrados dos tratamentos, bem como as sobras do que foi fornecido aos animais foram analisadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP. Primeiramente as amostras foram secas em estufa com ventilação forçada com temperatura de 55°C por 72 horas para determinação da MS. Posteriormente essas amostras foram moídas em moinho do tipo Willey em peneira com orifício de 1,0 mm, as concentrações de EE, MM e MS (105°C) foram determinadas conforme metodologia proposta por AOAC (1990). Para determinação da PB foi utilizado o método descrito por Wiles, Gray e Kissling (1998), por meio de combustação das amostras e utilizando auto analisador de nitrogênio, marca LECO modelo FP-528. A análise de FDN foi feita pelo método ANKON® Fiber Analyser (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY) utilizando amilase termoestável e sulfito de sódio para solubilização do nitrogênio e do amido. A determinação da matéria orgânica (MO) foi calculada subtraindo o teor de MM do teor de MS. Os carboidratos não fibrosos (CNF) presentes nas amostras foram calculados utilizando a seguinte formula: $100 - MM - PB - FDN - EE$ (NRC, 2001). A composição química das dietas experimentais é apresentada na tabela 2.

O consumo de matéria seca (CMS) e a produção de leite foram registrados nos períodos de coleta (15° ao 21° dia). Amostras de leite foram coletadas e quatro ordenha (duas da manhã e duas da tarde) e encaminhadas ao laboratório de análise de leite da Clínica do Leite do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP em Piracicaba – SP. As concentrações de gordura, proteína, lactose e caseína foram determinadas por leitura de absorção infravermelha utilizando-se o equipamento Bentley 2000®, a contagem de células somáticas foi realizada por citometria fluxométrica utilizando-se o equipamento Somacont 300®. As concentrações de nitrogênio ureico do leite (NUL) foram determinadas por absorção infravermelha com o equipamento da marca Foss®.

A excreção de energia líquida no leite (ELL leite, Mcal/d) foi obtida multiplicando-se a produção de leite em (kg) pelo teor de energia líquida, calculado pela seguinte fórmula (NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC, 2001): $ELL \text{ leite (Mcal/kg)} = 0,0929 \%gordura + 0,0547 \times \%proteína + 0,0395 \times \%lactose$. Além disso, foi calculada a exigência de energia para manutenção [ELL manutenção (Mcal/d) = $0,08 \times PV^{0,75}$] segundo (NRC, 2001). O CMS foi obtido por meio da diferença entre a quantidade de matéria seca fornecida e a de sobras, que foram coletadas e congeladas a -20 °C para avaliação da composição químico-bromatológica.

Tabela 2 - Composição química das dietas experimentais

Item ¹	Tratamentos ²			
	BG	BG + Benz	BZ	BZ + Benz
MS, %	45,32	44,72	42,30	41,04
PB, % MS	16,52	16,52	16,30	16,30
FDN, % MS	44,83	44,83	44,39	44,38
FDNi, % MS	9,60	9,59	9,68	9,68
EE, % MS	4,77	4,76	4,74	4,73
MM, % MS	5,34	5,32	5,52	5,51
CNF, % MS	28,54	28,58	29,06	29,08

¹MS: Matéria seca; PB: Proteína Bruta; FDN: Fibra em detergente neutro; FDNi: Fibra em detergente neutro indigestível; EE: Extrato Etéreo; MM: Matéria mineral; CNF: Carboidratos não fibrosos;

²BG: Silagem de milho proveniente do silo vedado com lona dupla-face 200 µm protegida com bagaço de cana-de-açúcar (camada com espessura de 10 cm); BG + Benz: Silagem de milho proveniente do silo vedado com lona dupla-face 200 µm protegida com bagaço de cana-de-açúcar (camada com espessura de 10 cm) mais adição de benzoato de sódio 1,5g/kg no momento da mistura do ingredientes; BZ: silagem de milho proveniente do silo vedado com aplicação superficial de benzoato de sódio 150 g/m² (diluído em água, 1:4) imediatamente antes da vedação com lona dupla-face 200 µm; BZ + Benz: Silagem de milho proveniente do silo vedado com aplicação superficial de benzoato de sódio 150 g/m² (diluído em água, 1:4) imediatamente antes da vedação com lona dupla-face 200 µm mais adição de benzoato de sódio 1,5g/kg no momento da mistura do ingredientes

Os tratamentos oferecidos aos animais poderiam apresentar alterações quanto à estabilidade aeróbia, devido as diferenças entre as silagens de cada tratamento e a adição ou não de benzoato de sódio na mistura dos ingredientes. Por isso, foi realizado o ensaio de estabilidade aeróbia das dietas experimentais fornecidas aos animais. Da mesma forma como foi feito para a silagem, as amostras foram alocadas em sala com temperatura controlada, permitindo variação de $\pm 1^{\circ}\text{C}$ em relação a temperatura média, amostras de 3 kg de cada um dos tratamentos foram colocadas em baldes plásticos, sem que houvesse compactação da massa. Em cada balde, no centro da massa, foi adicionado um “datalogger” calibrado para aferir a temperatura a cada 30 minutos por 10 dias. Os parâmetros avaliados foram o tempo necessário para a quebra da estabilidade, ou seja, o tempo necessário para a massa eleve sua temperatura 2°C acima da temperatura ambiente (KUNG; STOKES; LIN, 2003), acúmulo da variação da temperatura aos 5 e 10 dias, temperatura máxima e tempo para atingir a temperatura máxima.

A digestibilidade aparente no trato total foi determinada por meio de marcador interno, FDN indigestível (FDNi) (HUHTANEN; KAUSTELL; JAAKKOLA, 1994). Amostras dos ingredientes das dietas experimentais bem como das fezes foram secas e moídas a 1 mm, em

seguida foram alocadas em sacos de para análise de fibra ANKOM® Fiber Analyser, selados e incubados por 288 horas, em uma vaca canulada em lactação que recebia dieta a base de silagem de milho, semelhante a ofertada aos animais do ensaio de lactação. Após esse período os sacos foram lavados em solução FDN, seguindo recomendações propostas pela ANKOM® Fiber Analyser (ANKOM Technology Corporation, Faiport, NY).

4.4 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado para as avaliações dos animais foi o Quadrado Latino 4 x 4 em arranjo fatorial 2 x 2. Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância, com procedimento MIXED do SAS (2003), utilizando o seguinte modelo:

$$y_{ijkl} = \mu + Q_i + V(Q)_{j(i)} + P_k + S_l + B_m + SB_{lm} + \epsilon_{ijkl}$$

Onde:

μ = média geral;

Q_i = efeito fixo de Quadrado Latino ($i = 1$ a 5);

$V(Q)_{j(i)}$ = efeito aleatório de vaca dentro de Quadrado Latino ($j = 1$ a 20);

P_k = efeito fixo de período ($k = 1$ a 4);

S_l = efeito fixo do silo ($l = BG$ ou BZ);

B_m = efeito da adição de benzoato de sódio;

SB_{lm} = efeito da interação entre silo e proporção de forragem;

ϵ_{ijkl} = resíduo.

As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey-Kramer ($\alpha=0,05$ e $\alpha=0,10$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliações dos silos

As características bromatológicas das silagens oriundas dos silos protegidos com bagaço de cana-de-açúcar (BG) ou dos silos que receberam benzoato de sódio na camada superficial (BZ) foram muito semelhantes para os teores de MM, PB, EE, FDN, CNF e CHOsol (Tabela 3). Embora sem diferença estatística, a silagem que recebeu benzoato de sódio apresentou menor teor de MS quando comparada a silagem BG (Tabela 3). Este resultado pode ser explicado pela maior eficiência do tratamento BG no controle da deterioração com menos formação de água e menor perda de MS durante a fase de fermentação.

Tabela 3 - Composição bromatológica de silagens de milho oriundas de silos com cobertura de bagaço de cana-de-açúcar ou aplicação de benzoato de sódio

Item ¹	Tratamentos	
	BG ²	BZ ²
MS, %MN	32,7	28,6
MM, %MS	4,09	4,13
PB, %MS	7,23	6,81
EE, %MS	3,82	3,77
FDN, %MS	53,66	52,82
CNF, %MS	31,21	32,48
CHOsol, %MS	1,18	1,14

¹MS: matéria seca; MM: matéria mineral; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; FDN: fibra em detergente neutro; CNF: carboidratos não fibrosos; CHOsol: carboidratos solúveis;

²BG: Silagem de milho proveniente do silo vedado com lona dupla-face 200 µm protegida com bagaço de cana-de-açúcar (camada com espessura de 10 cm); ²BZ: silagem de milho proveniente do silo vedado com aplicação superficial de benzoato de sódio 150 g/m² (diluído em água, 1:4) imediatamente antes da vedação com lona dupla-face 200 µm.

Ao observar-se as perdas decorrentes de deterioração na camada superficial dos silos nos quatro períodos do experimento pode-se perceber que, embora sem diferença estatística, a silagem oriunda do tratamento que foi protegido com bagaço de cana-de-açúcar (BG) apresentou menor porcentagem de silagem deteriorada e, conseqüentemente, maior porcentagem de recuperação de silagem de boa qualidade quando comparado ao tratamento que recebeu benzoato de sódio (BZ) (Tabela 4). O processo de deterioração das silagens ocorre quando o oxigênio penetra no silo, que pode acontecer durante o processo de fermentação ou após a abertura do silo durante o período de fornecimento da silagem aos

animais. Na fermentação, a deterioração ocorre pelo fato do silo não ser um ambiente hermético, possibilitando, portanto, a entrada de oxigênio, principalmente no topo e nas zonas laterais (MUCK et al., 2003). Características como elevação do pH, da temperatura e presença de mofos são normalmente vistas no campo como sinais de deterioração no momento em que o silo é aberto (WILKINSON; DAVIES, 2012).

Microrganismos indesejáveis ao processo de conservação dos nutrientes da forragem são os causadores do processo de deterioração, sendo as leveduras, fungos e bactérias aeróbias os principais agentes microbianos (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). O desenvolvimento destes microrganismos é dependente da oxidação de ácidos orgânicos e carboidratos solúveis a dióxido de carbono (CO_2), água e calor resultando em aumento do pH (RANJIT; KUNG, 2000). O silo BG apresentou pH menor em relação ao BZ (Figura 4 e 5), e com o aumento do pH os microrganismos indesejáveis, que antes eram controlados pelo baixo pH, passaram a atuar na massa ensilada.

Tabela 4 - Perdas na camada superficial de silagens de milho oriundas de silos com cobertura de bagaço de cana-de-açúcar ou aplicação de benzoato de sódio

Item ¹	Tratamentos	
	BG ²	BZ ²
Silagem satisfatória, %MN	98,46	93,27
Silagem deteriorada, %MN	1,54	6,73

¹%MN: Porcentagem da matéria natural;

²BG: Silagem de milho proveniente do silo vedado com lona dupla-face 200 µm protegida com bagaço de cana-de-açúcar (camada com espessura de 10 cm); BZ: silagem de milho proveniente do silo vedado com aplicação superficial de benzoato de sódio 150 g/m² (diluído em água, 1:4) imediatamente antes da vedação com lona dupla-face 200 µm

Figura 4 - Média de pH registrado nos diferentes pontos do painel do silo (BG)

Figura 5 - Média de pH registrado nos diferentes pontos do painel do silo (BZ)

O aumento do pH das silagens pode explicar os resultados de temperatura encontrados que, embora não diferentes estatisticamente, foram menores para os silos com tratamento BG em relação ao tratamento BZ, principalmente na parte superficial dos silos (Figuras 6 e 7). A adição de bagaço de cana-de-açúcar na cobertura parece ter resultado em maior adesão entre a lona e a massa ensilada, além de redução na incidência direta da radiação solar sobre a lona, o que resultou em menor entrada de oxigênio no interior do silo, menor deterioração da silagem e consequentemente menor temperatura.

Figura 6 – Temperatura (°C) média registrada nos diferentes pontos do painel do silo (BG)

Figura 7 – Temperatura (°C) média registrada nos diferentes pontos do painel do silo (BZ)

As imagens termográficas registradas do painel dos silos logo após a retirada da silagem, apresentam os mesmos resultados encontrados com a aferição da temperatura utilizando termômetros de bulbo a 15 cm de profundidade, deixando evidente o aumento de temperatura nas regiões periféricas dos silos, avançando mais para a região central no silo BZ (Figura 8).

Figura 8 - Imagens termográficas registradas do painel dos silos BG e BZ respectivamente

Kleinschmit e Kung (2005) pesquisaram os efeitos de vários aditivos sobre as características de fermentação, recuperação de matéria seca e estabilidade aeróbia de silagens de milho. Os aditivos aplicados foram: *Lactobacillus Buchneri* (4×10^5 ufc/g); *L. buchneri* (1×10^5 ufc/g); *L. Plantarum* (1×10^5 ufc/g); Metabissulfito de sódio e amilase (0,05% do peso da forragem fresca); Aditivo à base de ácido propiônico tamponado (0,1%); Benzoato de sódio (0,1% do peso fresco); Sorbato de potássio: EDTA (1: 1) (0,1% de peso fresco). Silagens tratadas com benzoato de sódio e sorbato de potássio apresentaram as maiores concentrações de carboidratos solúveis em água, as maiores recuperações de MS, e as menores concentrações de etanol. Além disso, esses tratamentos juntamente com o tratamento com *L.buchneri* na dose de 4×10^5 ufc/g, foram os que promoveram maiores estabilidades aeróbias quando comparados aos demais tratamentos. Segundo os autores, estes resultados indicam a inibição de leveduras e não de bactérias lácticas pelo benzoato de sódio, já que as concentrações de ácido láctico não foram afetadas pela sua adição, mas as concentrações de etanol foram reduzidas em relação a silagem controle. A diferença entre as melhorias encontradas com a aplicação de benzoato de sódio no experimento anterior e as respostas encontradas no presente trabalho pode ser explicada pelo fato da aplicação do aditivo ter sido realizada somente na camada superficial e não em toda silagem como no experimento de Kleinschmit e Kung (2005).

Com relação ao perfil fermentativo das silagens, não houve diferença para os valores de pH entre os diferentes tratamentos, porém, as silagens do centro do painel do silo

apresentaram pH menor quando comparadas as silagens do topo (Tabela 5). Como já mencionado anteriormente, as silagens do topo são mais propensas a entrada de oxigênio e ocorrência de deterioração (MUCK et al., 2003). As leveduras que são os principais microrganismos envolvidos no processo de deterioração da silagem têm como substratos para seu crescimento o ácido lático e carboidratos solúveis residuais. O consumo do ácido lático eleva o pH da massa e possibilita o crescimento dos demais microrganismos indesejáveis ao processo de conservação (WOOLFORD, 1990). Os valores de ácido lático das silagens do centro e do topo do silo corroboram com essa explicação, já que foram menores para as silagens do topo, quando comparadas às silagens do centro, em ambos os tratamentos (Tabela 5).

Bispo (2013) também encontraram diferenças na concentração de ácido lático no centro dos silos quando comparadas as regiões do topo para silagens de milho independente dos tratamentos empregados (Filme de polietileno dupla face (200 μm); Filme de polietileno dupla face (200 μm) recoberto com bagaço de cana-de-açúcar; Filme co-extrusado de polietileno e poliamida (125 μm).

Bernardes (2006) comparou a região central e periférica dos silos em relação ao perfil fermentativo de silagens de milho e, também encontrou menores concentrações de ácido lático para a região periférica (5,0% MS) do que para a região central (6,5% MS). O autor também relatou maiores perdas de MS para a região periférica e, associou isto a menor fermentação láctica e consequentemente maior população de microrganismos deterioradores que consomem os nutrientes da silagem para seu desenvolvimento. No presente experimento também ocorreu diferenças na porcentagem de matéria seca para as regiões de centro e topo dos silos, sendo que as regiões do topo apresentaram menores porcentagens de MS e MS_{corr} quando comparadas as regiões do centro (Tabela 5).

Segundo Bernardes (2006), a menor densidade (kg/m^3) da região periférica (509 kg/m^3) quando comparada com a região do centro (628 kg/m^3) das silagens expressas em matéria natural, ajuda a explicar a maior porosidade e a maior entrada de oxigênio com consequente maior deterioração e perdas de MS para as silagens da região periférica. No presente experimento os valores de densidade das silagens da região do topo e do centro também foram diferentes, sendo menores para as regiões do topo (471,6 e 575,9 kg/m^3 para tratamentos BG e BZ, respectivamente) do que para as regiões do centro (584,2 kg e 687,2 kg/m^3 para BG e BZ, respectivamente) (Tabela 6).

Vários fatores interferem no processo de compactação: Teor de matéria seca, quanto maior a umidade maior é a facilidade de compactação; Tamanho de partícula, partículas

menores favorecem a compactação; Peso do veículo utilizado no processo e o tempo de compactação são os principais fatores influenciam na densidade dos silos. Nesse estudo o silo BZ apresentou maior densidade, devido o menor teor de MS, resultado de fermentação indesejável onde é produzido CO₂ e água, uma vez que ambas as silagens apresentaram MS semelhante no momento da ensilagem.

Tabela 5 - Perfil fermentativo do centro e topo de silagens de milho oriundas de silos com cobertura de bagaço de cana-de-açúcar ou aplicação de benzoato de sódio

Item	BG ¹		BZ ¹		EPM	P		
	Centro	Topo	Centro	Topo		Trat ²	Local ²	Trat×Local ²
pH	3,72	3,87	3,85	4	0,05	0,11	<0,01	0,96
MS, %	33,2	31,7	28,36	26,58	1,52	0,1	<0,01	0,56
MScorr, %	34,55	32,92	29,95	27,32	1,59	0,1	<0,01	0,14
Ác. láctico %	2,71x	2,30xy	3,15x	1,00y	0,34	0,3	0,02	0,07
Ác. acético %	2,46	1,96	3,2	1,76	0,39	0,58	0,04	0,23
1,2-propanodiol %	1,01	0,35	1,52	0,52	0,35	0,51	<0,01	0,46
Etanol %	0,34	0,18	0,3	0,09	0,07	0,42	0,03	0,72
Ác. propiônico %	0,22	0,31	0,39	0,2	0,09	0,76	0,64	0,19
1- propanol %	0,19	0,1	0,18	0,06	0,03	0,46	0,02	0,64
2,3-Butanodiol %	0,1	0,14	0,18	0,09	0,04	0,81	0,55	0,14
Ác. butírico %	0,01	0,2	0,04	0,31	0,13	0,67	0,13	0,74
Lactato de etila, mg/kg	70	43,5	68,25	28	16,12	0,62	0,08	0,68
Álcool isoprop., mg/kg	67,75	51,25	188,25	76	14,68	0,02	<0,01	<0,01
Acetato de etila, mg/kg	27,25	10,75	27	5	4,27	0,53	<0,01	0,54
Ác. valér., mg/kg	26	35,57	64	528,5	250,91	0,39	0,38	0,4
Acetato de prop., mg/kg	18,25	6,86	16	13,75	4,88	0,69	0,18	0,34
Butanol, mg/kg	15	30,75	16,25	29,75	5,22	0,99	<0,01	0,59
Ác. iso-valér., mg/kg	14,25	55,66	18	43,25	8,79	0,66	0,01	0,4
Acetona, mg/kg	8,5	36,75	16,25	113,75	34,74	0,31	0,12	0,36

Letras (x,y) indicam que médias diferem (Tukey-Kramer, $\alpha = 0,10$)

¹BG: Silagem de milho proveniente do silo vedado com lona dupla-face 200 μ m protegida com bagaço de cana-de-açúcar (camada com espessura de 10 cm); BZ: silagem de milho proveniente do silo vedado com aplicação superficial de benzoato de sódio 150 g/m² (diluído em água, 1:4) imediatamente antes da vedação com lona dupla-face 200 μ m

²Trat: Efeito de tratamento na ensilagem; Local: Efeito do local do silo; Trat x Local: Efeito da interação entre tratamento na ensilagem e local do silo

Embora as concentrações de ácido butírico das silagens não tenham sido diferentes estatisticamente entre os tratamentos ou locais de avaliação dos silos, pode-se observar que as concentrações deste ácido nas regiões de topo foram altas e consideradas fora do padrão para fermentação de silagens satisfatórias. Estas maiores concentrações para as regiões do topo são resultado das maiores contagens de Clostrídios encontradas (Tabela 7). Concentrações de

ácido butírico acima de 0,1% são consideradas inadequadas do ponto de vista fermentativo (FERREIRA, 2001), pois estão relacionadas ao crescimento de bactérias do gênero *Clostridium*, que fermentam carboidratos solúveis ou ácido láctico produzindo ácido butírico, CO₂ e H₂O, ou ainda, quebram proteínas produzindo compostos indesejáveis ao processo de conservação como amônia, CO₂ e aminas biogênicas, que inclusive podem deprimir o consumo dos animais (PAHLOW et al., 2003). O maior crescimento de clostrídios na região de topo está relacionado às baixas concentrações de ácido láctico e o maior pH encontrado, resultado do consumo de ácido láctico por microrganismos deterioradores (JONSSON; PAHLOW, 1984).

Tabela 6 - Densidade média das regiões do centro e topo de silagens de milho oriundas de silos com cobertura de bagaço de cana-de-açúcar ou aplicação de benzoato de sódio

Item ¹	BG ²		BZ ²	
	Centro	Topo	Centro	Topo
KgMN/m3	584,20	471,60	687,20	575,90
KgMS/m3	191,00	154,20	196,60	164,70

¹MN: Matéria Natural; MS: Matéria Seca; ²BG: Silagem de milho proveniente do silo vedado com lona dupla-face 200 µm protegida com bagaço de cana-de-açúcar (camada com espessura de 10 cm); ²BZ: silagem de milho proveniente do silo vedado com aplicação superficial de benzoato de sódio 150 g/m² (diluído em água, 1:4) imediatamente antes da vedação com lona dupla-face 200 µm.

Tabela 7 - Características microbiológicas das regiões do centro e topo de silagens de milho oriundas de silos com cobertura de bagaço de cana-de-açúcar ou aplicação de benzoato de sódio

Item ¹	BG ²		BZ ²		EPM	P		
	Centro	Topo	Centro	Topo		S ³	L ³	S x L ³
pH	3,72	3,87	3,85	3,96	0,06	0,12	0,02	0,59
BAL, log ufc/g	4,36	4,08	4,69	4,12	0,19	0,27	0,04	0,34
Leveduras, log ufc/g	2,99b	2,82b	2,25b	3,98a	0,48	0,74	0,02	0,01
Fungos, log ufc/g	2,48	3,12	2,83	3,51	0,68	0,39	0,15	0,96
Clostrídeos, log ufc/g	2,30	3,35	2,31	3,52	0,39	0,83	0,06	0,85
Bacillus, log ufc/g	3,34	4,30	3,00	4,30	0,30	0,62	0,02	0,60

¹BAL: Bactérias ácido lácticas; ²BG: Silagem de milho proveniente do silo vedado com lona dupla-face 200 µm protegida com bagaço de cana-de-açúcar (camada com espessura de 10 cm); ²BZ: silagem de milho proveniente do silo vedado com aplicação superficial de benzoato de sódio 150 g/m² (diluído em água, 1:4) imediatamente antes da vedação com lona dupla-face 200 µm; ³S= Efeito do tratamento na ensilagem; L = Efeito do local do silo; S x L = Efeito da interação entre tratamento na ensilagem e local do silo

Devido a menor possibilidade de entrada de oxigênio e crescimento de microrganismos deterioradores, as regiões do centro das silagens são mais propícias ao

crescimento de bactérias lácticas (BAL), isto pode ser evidenciado pelos resultados de ácido láctico já mencionados anteriormente, mas também pelas maiores concentrações dos produtos de BAL heterofermentativas, como o ácido acético, 1,2-propanodiol e 1-propanol. Realmente as regiões do centro das silagens apresentaram maiores contagens de BAL quando comparadas as regiões de topo (Tabela 7). Ambiente de anaerobiose é imprescindível para o desenvolvimento de bactérias lácticas que fermentam os carboidratos solúveis produzindo ácidos que reduzem o pH da massa (MUCK, 1991). Assim, segundo, McDonald, Henderson e Heron (1991) silagens com maior teor de ar residual apresentam redução na produção de ácidos orgânicos e maior valor de pH.

Com relação a contagem de leveduras, o tratamento BZ apresentou paradoxalmente maior contagem na região do topo quando comparada a região do centro. Já para o tratamento BG não houve diferenças na contagem de leveduras para as diferentes regiões. E, se comparados os tratamentos, o BZ apresentou maior contagem de leveduras no topo do que o BG. Segundo Pedroso (2003) a aplicação de benzoato de sódio em silagens está relacionada ao controle de leveduras e conservação de carboidratos solúveis das silagens. No entanto, no presente experimento este efeito não foi observado, sendo que a cobertura com bagaço de cana-de-açúcar foi mais eficiente em reduzir o crescimento de leveduras na região de topo. A menor penetração de oxigênio em BG pode ter resultado em menor população de leveduras e, menor consumo de ácido láctico o que manteve o pH mais baixo, inibindo assim, o desenvolvimento de outros microrganismos deterioradores.

A população de esporos aeróbios (representados principalmente por *Bacillus*) foi maior para as regiões de topo do que para as regiões do centro em ambos os tratamentos. Os bacilos são aeróbios ou aeróbios facultativos e, estão relacionados com a deterioração inicial de silagens (PEREIRA; REIS, 2001). Por isso, maiores contagens de esporos têm sido encontradas nas camadas superficiais dos silos (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK, 2000; GIFFEL et al., 2002).

A estabilidade aeróbia das diferentes regiões do silo BG e BZ estão apresentadas na Tabela 8. O tratamento BZ apresentou menor estabilidade aeróbia tanto para as regiões de centro e topo quando comparadas ao BG. O tempo para atingir a temperatura máxima também foi menor para o tratamento BZ no centro e no topo do que BG. As regiões de topo tiveram a quebra de estabilidade bem antecipada e isto ocorre devido a maior possibilidade de entrada de oxigênio, maior população de leveduras e conseqüentemente menor tempo para deterioração. Segundo Lindgren et al. (1985) a difusão de oxigênio durante o armazenamento

da silagem parece ser importante para o estabelecimento de leveduras que metabolizam ácido láctico.

Esperava-se que o tratamento com adição de benzoato de sódio apresentasse maior tempo de estabilidade aeróbia, pois este é um aditivo alimentar largamente empregado na indústria de alimentos, sendo efetivo contra o crescimento de leveduras e fungos (WOOLFORD, 1975). Seu mecanismo de ação está relacionado com a passagem de sua forma não dissociada que ao atravessar a membrana de fungos e leveduras e, libera seus prótons no meio intracelular, acidificando-o. No entanto, seu benefício na melhoria da estabilidade aeróbia não foi encontrado no presente experimento.

Silva (2013) testou a aplicação de *L.buchneri* (1×10^6 ufc/g) e 0,2% de benzoato de sódio no topo de silagens de milho e, encontrou maior estabilidade aeróbia para o tratamento que teve aplicação de benzoato de sódio (261 horas) quando comparado ao tratamento controle (92,2 horas) e *L.buchneri* (141 horas). A diferença do experimento anterior para presente experimento pode estar na dose aplicada que pode ter sido maior e mais eficiente para melhorar a estabilidade aeróbia.

Tabela 8 - Estabilidade aeróbia das regiões do centro e topo de silagens de milho oriundas de silos com cobertura de bagaço de cana-de-açúcar ou aplicação de benzoato de sódio

¹ Item	BG ²		BZ ²		EPM	P		
	Centro	Topo	Centro	Topo		S ³	L ³	S × L ³
Ac 5 dias, °C	44,94	42,52	46,64	27,52	14,49	0,75	<0,01	<0,01
Ac 10 dias, °C	83,58	70,95	84,98	40,59	15,18	0,56	<0,01	<0,01
Quebra, Horas	28,05	25,5	19,33	3,94	16,12	0,38	0,01	0,06
Temp. Máx., °C	41,38	42,21	43,2	39,79	2,68	0,92	0,04	0,01
Tempo Máx, Horas	102,5	101	60,89	24	44,4	0,34	0,03	0,04

¹Ac 5 dias, °C: Variação de temperatura (°C) em relação ao ambiente acumulada em 5 dias; Ac 10 dias, °C: Variação de temperatura (°C) em relação ao ambiente acumulada em 10 dias; Quebra, Horas: Tempo em horas para a temperatura variar 2°C acima do ambiente; Temp. Máx., °C: Temperatura (°C) máxima registrada nos 10 dias de avaliação; Tempo Máx, Horas: Tempo para atingir a temperatura máxima.

²BG: Silagem de milho proveniente do silo vedado com lona dupla-face 200 µm protegida com bagaço de cana-de-açúcar (camada com espessura de 10 cm); ²BZ: silagem de milho proveniente do silo vedado com aplicação superficial de benzoato de sódio 150 g/m² (diluído em água, 1:4) imediatamente antes da vedação com lona dupla-face 200 µm; ³S= Efeito do tratamento na ensilagem; L = Efeito do local do silo; S x L = Efeito da interação entre tratamento na ensilagem e local do silo

5.1 Desempenho de vacas em lactação

Dentre as fontes de forragem utilizadas para a produção de silagem, o milho é particularmente susceptível ao processo de deterioração aeróbia quando entra em contato com oxigênio, por apresentar normalmente maiores concentrações de ácido lático que é subproduto para o crescimento de leveduras (TAYLOR et al., 2002; MUCK, 2010). Isto resulta em perdas de MS altamente digestíveis, produção de micotoxinas e outros microrganismos patogênicos (BOLSEN et al., 1993; BORREANI et al., 2005), o que pode tornar a silagem menos palatável para os animais. Dentre as alternativas para reverter este quadro, a utilização de diferentes estratégias de vedação e adição de benzoato de sódio como aditivo na mistura dos ingredientes foram testadas no presente experimento. Porém, mesmo com melhorias na estabilidade aeróbia das silagens, os trabalhos na literatura que mostram a influência dos aditivos químicos, como o benzoato de sódio sobre o desempenho de vacas leiteiras ainda são escassos.

No presente experimento, o comportamento ingestivo dos animais não foi influenciado pela adição de benzoato na dieta e pelos diferentes tratamentos (BG e BZ) (Tabela 9) o consumo de matéria seca (CMS), a produção de leite e a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura não foram alterados pela adição de benzoato de sódio em ambos os tratamentos (BG e BZ) (Tabela 10). Também não houve diferenças para os tratamentos BG e BZ para as mesmas variáveis. Mesmo o tratamento BG tendo apresentado uma maior digestibilidade da MS do que o tratamento BZ (Tabela 10) isto não levou a uma maior produção de leite para este tratamento. Esta maior digestibilidade para o tratamento BG pode ser explicada pelo menor processo de deterioração e menor consumo de nutrientes das silagens por microrganismos deterioradores. Mesmo sendo uma diferença somente numérica, o tratamento BZ teve maior CMS e pode ter compensado a produção de leite mesmo com uma menor digestibilidade da MS. Além disso, a falta de resposta em produção de leite para o tratamento que apresentou maior digestibilidade pode ter acontecido em função de que o rebanho utilizado para o experimento (maioria dos animais) estava em estágio final de lactação (acima de 200 dias de lactação). Nessa fase, os animais depositam mais reservas corporais para recuperar o que foi perdido durante o início e meio da lactação, além disso, ocorre o 1/3 final da gestação e a maior parte do desenvolvimento fetal, esses fatores desviam nutrientes que seriam utilizados para a produção de leite, mascarando o efeito dos tratamentos.

Tabela 9 - Comportamento ingestivo de vacas leiteiras alimentadas com silagens de milho oriundas de silos com cobertura de bagaço de cana-de-açúcar ou aplicação de benzoato de sódio

Item ¹	BG ²		BZ ²		EPM	P ⁴		
	C ³	B ³	C ³	B ³		S ⁴	B ⁴	SxB ⁴
Ingestão, min	195,47	189,64	193,43	180,36	10,79	0,52	0,68	0,28
Ruminação, min	498,08	491,98	506,81	518,37	15,83	0,24	0,86	0,56
Mastigação, min	693,54	681,62	685,45	709,99	19,92	0,53	0,70	0,26
Mastigação/CMS, min/kg	33,58	33,80	32,65	35,16	1,13	0,85	0,23	0,31

¹Mastigação/CMS, min/kg: Relação entre tempo de mastigação e o consumo de matéria seca; ²BG: Silagem de milho proveniente do silo vedado com lona dupla-face 200 µm protegida com bagaço de cana-de-açúcar (camada com espessura de 10 cm);

²BZ: silagem de milho proveniente do silo vedado com aplicação superficial de benzoato de sódio 150 g/m² (diluído em água, 1:4) imediatamente antes da vedação com lona dupla-face 200 µm;

³C: Silagem controle; ³B: Adição de benzoato de sódio na dieta total (0,15%)

⁴S = Efeito do tratamento na ensilagem; B = Efeito do benzoato de sódio na dieta total; S x B = Efeito da interação entre o tratamento na ensilagem e adição de benzoato de sódio na dieta total

Amaral (2011) testou diferentes estratégias de vedação em silagem de milho e também, encontrou menores perdas de matéria seca para o tratamento com lona de polietileno (200 µm) recoberta com 10 cm de bagaço de cana, quando comparado com outros tipos de lonas. O autor também comparou silagens do topo e do centro dos silos e, encontrou maior digestibilidade *in vitro* da MS para as regiões do centro do silo. Segundo o autor, as menores contagens de leveduras, menor deterioração e consequentemente maior concentração de carboidratos solúveis residuais pode explicar este resultado. A maior digestibilidade *in vitro* resultou em maior produção de leite pelas vacas quando comparada aos demais tratamentos.

A partir dos resultados do presente experimento e do experimento citado anteriormente pode-se inferir que a vedação com lona (200 µm) protegida com bagaço de cana-de-açúcar é uma boa opção para controlar o processo de deterioração da silagem durante a fase de armazenamento e, pode resultar em aumento da digestibilidade e produção de leite pelos animais, já que maior produção de leite no presente experimento pode não ter sido encontrada devido ao estágio avançado de lactação dos animais.

Custódio (2013) testou as seguintes estratégias de vedação para silagem de cana-de-açúcar: Filme de poliamida 45 µm, recoberta com manta de polietileno para proteção contra raios ultravioleta e danos físicos; Filme de polietileno coextrusado com poliamida, dupla face; Filme de polietileno, dupla face (200 µm). As diferentes estratégias não influenciaram o consumo, digestibilidade e, desempenho de vacas leiteiras. Segundo a autora, a falta de resultado positivo para o desempenho pode ser explicada pela semelhança entre as silagens,

sendo que todos os tratamentos foram efetivos em controlar o processo de deterioração e, pela baixa inclusão dietética de silagem (37% MS).

A composição do leite não foi influenciada pelos diferentes tratamentos (BG ou BZ) ou pela adição de benzoato de sódio na dieta (Tabela 10). O maior consumo de matéria seca do tratamento BG não foi suficiente para alterar a composição do leite.

Tabela 10 - Consumo de matéria seca, produção e composição do leite, digestibilidade da matéria seca do leite e utilização da energia por vacas leiteiras alimentadas com silagens de milho oriundas de silos com cobertura de bagaço de cana-de-açúcar (com e sem aditivo)

Item ¹	BG ²		BZ ²		EPM	P ⁴		
	C ³	B ³	C ³	B ³		S ⁴	B ⁴	S × B ⁴
CMS, kg/d	25,7	25,99	25,83	26,14	1	0,75	0,5	0,99
Leite, kg/d	25,7	25,99	25,83	26,13	25,09	0,76	0,5	0,98
Leite 3,5% gord, kg/d	26,33	27,13	26,93	26,43	26,7	0,92	0,77	0,23
Gordura, %	3,69	3,61	3,7	3,68	0,1	0,58	0,48	0,75
Proteína, %	3,53	3,52	3,49	3,5	0,07	0,34	0,94	0,73
Lactose, %	4,42	4,41	4,38	4,37	0,05	0,22	0,56	0,99
ST, %	12,64	12,36	12,5	12,43	0,17	0,77	0,14	0,37
ESD %	8,91	8,79	8,85	8,81	0,06	0,66	0,06	0,3
CCS x 1000 cel./mL	274,87	241,44	283,32	260,65	56,52	0,62	0,31	0,84
NU mg/dL	12,96	12,99	12,59	11,97	0,53	0,11	0,49	0,45
CAS %	2,7	2,67	2,66	2,66	0,06	0,45	0,6	0,71
Dig MS, %	70,12	70,81	68,83	68,90	0,78	0,02	0,57	0,65
ELleite/CMS	0,86	0,91	0,86	0,87	0,03	0,43	0,16	0,31
ELl/kg leite, Mcal/kg	0,71	0,70	0,71	0,70	0,01	0,75	0,72	0,96
ELleite, Mcal/d	18,04	18,55	18,37	18,04	0,62	0,79	0,78	0,23

¹CMS: Consumo de matéria seca; Leite: Produção de leite; Leite 3,5%de gord, Kg/d: Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura; ²BG: Silagem de milho proveniente do silo vedado com lona dupla-face 200 µm protegida com bagaço de cana-de-açúcar (camada com espessura de 10 cm); ²BZ: silagem de milho proveniente do silo vedado com aplicação superficial de benzoato de sódio 150 g/m² (diluído em água, 1:4) imediatamente antes da vedação com lona dupla-face 200 µm; ³C: Silagem controle; ³B: Adição de benzoato de sódio na dieta total (0,15%); ⁴S = Efeito do tratamento na ensilagem; ⁴B = Efeito do benzoato de sódio na dieta total; ⁴S x B = Efeito da interação entre o tratamento na ensilagem e adição de benzoato de sódio na dieta total

Amaral (2011) encontrou maiores valores de lactose (kg/d) para o tratamento com lona de polietileno reciclada preta (200 µm) recoberta por 10 cm de bagaço de cana e para o tratamento com lona de polietileno dupla face (200 µm). Para o restante dos componentes (kg/d) (gordura, proteína, sólidos totais e extrato seco desengordurado) não foi encontrada diferença estatística para os diferentes tratamentos.

Bispo (2013) também não encontrou diferenças na composição do leite (kg/d) para os tratamentos empregados (Filme de polietileno dupla face (200 μm); Filme de polietileno dupla face (200 μm) recoberto com bagaço de cana-de-açúcar; Filme co-extrudado de polietileno e poliamida (125 μm)). Os valores médios foram de: gordura (0,95 kg); proteína (0,94 kg); lactose (1,25 kg); sólidos totais (3,38 kg); extrato seco desengordurado (2,44 kg).

No presente estudo, com o objetivo de avaliar se a adição de benzoato de sódio seria eficiente em reduzir a deterioração e contribuir para o aumento da estabilidade aeróbia da dieta, ampliando assim o tempo em que essa permanece estável no cocho dos animais, o benzoato de sódio foi aplicado na dieta total antes da alimentação das vacas. No entanto, a adição de benzoato de sódio não foi eficiente em controlar a deterioração aeróbia da dieta total (Tabela 11). Existe a possibilidade de que o tempo de 4 horas entre a retirada da silagem para alimentar os animais e a montagem do ensaio de estabilidade pode ter contribuído para esse resultado negativo; o ensaio foi montado sempre após o trato da manhã as 10:00 e a silagem era retirada as 6:00, esse tempo de exposição pode ter afetado os resultados. Outra possibilidade é que a diluição do benzoato de sódio em água 1:3 aumentou a umidade da ração e, conseqüentemente, a atividade de água da mistura, favorecendo o desenvolvimento de microrganismos, por último a concentração de 0,15% ou 1,5g/kg de benzoato de sódio na dieta total pode não ter sido suficiente para controlar a deterioração.

Muck (2002) comparou a estabilidade aeróbia de silagem de milho com inoculantes homofermentativos ou heterofermentativos ou com benzoato de sódio e, verificou que aplicação de benzoato de sódio não teve efeito sobre a fermentação da silagem, mas fez diminuir a contagem de fungos e leveduras em relação a silagem controle. Embora tenha sido encontrada melhoria da estabilidade aeróbia, esta foi considerada pequena e, segundo o autor, mais pesquisas sobre este aditivo são necessárias para verificar o mecanismo de ação exato e determinar o nível ideal para equilibrar custo e eficácia.

Tabela 11 - Estabilidade aeróbia das rações totais contendo silagens de milho oriundas de silos com cobertura de bagaço de cana-de-açúcar (com e sem adição de benzoato de sódio na dieta) ou aplicação de benzoato de sódio (com ou sem adição de benzoato de sódio na dieta)

Item ¹	BG ²		BZ ²		EPM	P		
	C ³	B ³	C ³	B ³		S ⁴	B ⁴	S × B ⁴
Ac 5 dias, °C	75,61	74,04	78,24	78,29	2,96	0,17	0,76	0,74
Ac 10 dias, °C	151,70	154,40	156,38	153,81	3,25	0,55	0,98	0,44
Quebra, Horas	5,40	3,96	5,23	4,75	1,40	0,72	0,30	0,58
Temp. Máx., °C	46,95	47,85	47,34	48,77	0,83	0,11	0,009	0,51
Tempo Máx, Horas	12,65	39,57	63,40	41,62	24,12	0,08	0,86	0,11

¹Ac 5 dias, °C: Variação de temperatura (°C) em relação ao ambiente acumulada em 5 dias; Ac 10 dias, °C: Variação de temperatura (°C) em relação ao ambiente acumulada em 10 dias; Quebra, Horas: Tempo em horas para a temperatura variar 2°C acima da ambiente; Temp. Máx., °C: Temperatura (°C) máxima registrada nos 10 dias de avaliação; Tempo Máx, Horas: Tempo para atingir a temperatura máxima; ²BG: Silagem de milho proveniente do silo vedado com lona dupla-face 200 µm protegida com bagaço de cana-de-açúcar (camada com espessura de 10 cm); ²BZ: silagem de milho proveniente do silo vedado com aplicação superficial de benzoato de sódio 150 g/m² (diluído em água, 1:4) imediatamente antes da vedação com lona dupla-face 200 µm; ³C: Silagem controle; ³B: Adição de benzoato de sódio na dieta total (0,15%); ⁴S = Efeito do tratamento na ensilagem; ⁴B = Efeito do benzoato de sódio na dieta total; ⁴S x B = Efeito da interação entre o tratamento na ensilagem e adição de benzoato de sódio na dieta total

Bactérias formadoras de esporos como é o caso das do gênero *Bacillus* e *Clostridium* não são problemáticas somente do ponto de vista de perdas de matéria seca em silagens, mas também porque seus esporos podem sobreviver à passagem no trato digestório dos animais e chegarem as fezes. Essa maior contaminação ambiental pode resultar em menor qualidade e tempo de prateleira dos produtos lácteos (DRIEHUIS; GIFFEL, 2005). Com o objetivo de avaliar a contaminação das fezes dos animais com esporos de clostrídios e bacilos foram realizadas análises microbiológicas das fezes (Tabela 12). A contagem de clostrídios não diferiu entre os tratamentos (BG ou BZ) e também para a aplicação de benzoato de sódio na dieta total. A contagem de bacilos também não diferiu com a adição de benzoato de sódio na dieta, mas foi menor para o tratamento BZ quando comparado ao BG.

Tabela 12 - Microbiologia das fezes de vacas alimentadas com silagens de milho oriundas de silos com cobertura de bagaço de cana-de-açúcar (com e sem adição de benzoato de sódio na dieta) ou aplicação de benzoato de sódio (com ou sem adição de benzoato de sódio na dieta)

Item ¹	BG ²		BZ ²		EPM	P		
	C ³	B ³	C ³	B ³		S ⁴	B ⁴	S × B ⁴
pH	6,76	6,87	6,78	6,87	0,04	0,91	0,02	0,76
Clostrídeos, log ufc/g	5,20	4,94	5,03	4,98	0,11	0,59	0,16	0,33
Bacillus, log ufc/g	6,41	6,35	6,20	6,16	0,09	0,04	0,57	0,91

¹ufc: Unidade formadora de colônia; ²BG: Silagem de milho proveniente do silo vedado com lona dupla-face 200 µm protegida com bagaço de cana-de-açúcar (camada com espessura de 10 cm); ²BZ: silagem de milho proveniente do silo vedado com aplicação superficial de benzoato de sódio 150 g/m² (diluído em água, 1:4) imediatamente antes da vedação com lona dupla-face 200 µm; ³C: Silagem controle; ³B: Adição de benzoato de sódio na dieta total (0,15%); ⁴S = Efeito do tratamento na ensilagem; ⁴B = Efeito do benzoato de sódio na dieta total; ⁴S x B = Efeito da interação entre o tratamento na ensilagem e adição de benzoato de sódio na dieta total

6 CONCLUSÕES

A silagem com cobertura de bagaço de cana foi mais eficiente em reduzir a entrada de oxigênio durante o processo de fermentação e, conseqüentemente levou ao menor crescimento de microrganismos deterioradores e maior conservação dos nutrientes da silagem, resultando em maior digestibilidade da matéria seca. A adição de benzoato de sódio na dose de 0,15% da matéria natural na dieta total não altera o desempenho de vacas leiteiras.

REFERÊNCIAS

- ADESOGAN, A.T. Challenges of tropical silage production. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 15., 2009, Madison. **Proceedings...** Wisconsin, 2009. p. 139–154.
- AMARAL, C.R. **Estratégias de controle da deterioração aeróbia em silagens de milho e seu valor alimentício para vacas em lactação.** 2011. 173 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- ASHBELL, G.; LISKER, N. Aerobic deterioration in maize silage stored in a bunker silo under farm conditions in a subtropical climate. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** v. 45, p. 307-315. 1988.
- ASHBELL, G.; WEINBERG, Z.G.; HEN, Y.; FILYA, I. The effects of temperature on the aerobic stability of wheat and corn silages. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,** New York, v. 28, p. 261-263, 2002.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis.** 15th ed. Arlington, 1990. v. 1, 1117 p.
- AUERBACH, H. Moulds and mycotoxins in silages. In: ALLTECH ANNUAL SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, 19., 2003, Bad Segeberg. 2003. **Proceedings...** Bad Segeberg, 2003. p. 247–266.
- BERNARDES, T.F. **Controle da deterioração aeróbia em silagens.** 2006. 103 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.
- BERNARDES, T.F.; NUSSIO, L.G.; AMARAL, R.C.; SCHOGOR, A.L.B. Sealing strategies to control the top losses of corn silage. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 15., 2009, Madison. **Proceedings...** Wisconsin, 2009. p. 213–214.
- BERNARDES, T.F.; REIS, R.A.; SIQUEIRA, G.R.; AMARAL, R.C.; PIRES, A.J.V. Fermentative profile, aerobic stability, and nutritive value of marandu grass silages using additives at ensiling. In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF ANIMAL SCIENCES, 41., 2004, Campo Grande. 2004. **Proceedings...**
- BERNARDES, T.F.; DE OLIVEIRA, I.L.; LARA, M.A.S.; CASAGRANDE, D.R.; ÁVILA, C.L.S.; PEREIRA, O.G. Effects of potassium sorbate and sodium benzoate at two application rates on fermentation and aerobic stability of maize silage. **Grass and Forage Science,** Malden, v. 68, p. 133, 2014.
- BISPO, W.A. **Qualidade de silagens de milho confeccionadas com diferentes filmes de vedação e desempenho produtivo de vacas em lactação.** 2013. 104 p. Tese (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

BOLSEN, K.K. Issues of top spoilage losses in horizontal silos. In: POPOW, J.S. (Ed.). **Silage: field to feedbunk**. Ithaca: Northeast Regional Agricultural Engineering Service, 1997. p. 137–150. (Publication, NRAES-99).

BOLSEN, K.K.; ASHBELL, G.; WILKINSON, J.M. Silage additives. In: **BIOTECHNOLOGY IN ANIMAL FEEDS AND ANIMAL FEEDING**, 1995, New York. **Proceedings...** New York: VCH Weinheim, 1995. p. 33-54.

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

BORREANI, G.; TABACCO, E.; ANTONIAZZI, S.; CAVALLARIN, L. Zearalenone contamination in farm maize silage. **Italian Journal of Animal Science**, Torino, v. 4, p. 162–165, 2005.

BUXTON, D.R.; O'KIELY, P. Preharvest plant factors affecting ensiling. **Silage Science and Technology**, Madison, v. 5, p. 199-250, 2007.

CAVALLARIN L., TABACCO E., ANTONIAZZI, S.; BORREANI, G. Aflatoxin accumulation in whole crop maize silage as result of aerobic exposure. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York, v. 91, p. 2419–2425, 2011.

CRAIG, P.H.; GRISWOLD, K.E.; DINH, S.K. Six years of corn silage density evaluations in south central Pennsylvania. In: In: In: **INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE**, 15., 2009, Madison. **Proceedings...** Wisconsin, 2009. p. 223–224.

CUSTÓDIO, L. **Estratégias de controle de perdas em silagens de cana-de-açúcar**. 2013. 90 p. (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

D'AMOURS, L.; SAVOIE, P. Density profile of corn silage in bunker silos. In: **ANNUAL INTERNATIONAL MEETING SPONSORED**, 14., 204, Ontario. **Proceedings...**

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

DA SILVA, N.C.; SANTOS, J.P.; CASAGRANDE, D.R.; EVANGELISTA, A.R.; BERNARDES, T.F. Evaluation of the effects of two *Lactobacillus buchneri* strains and sodium benzoate on the characteristics of corn silage in a hot-climate environment. **Grassland Science**, London, v. 60, p. 169-177, 2014.

DEGANO, L. Improvement of silage quality by innovative covering system. **INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE**, 1999, Uppsala. 1999. **Proceedings...** p. 296-297.

DICKERSON, J.T.; ASHBELL, G.; BOLSEN, K.K.; BRENT, B.E.; PFAFF, L.; NIWA, Y. Losses from top spoilage in horizontal silos in western Kansas. **Kansas Agricultural Experimental Station**, Manhattan, n. 651, p. 127-129, 1992.

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

DRIEHUIS, F.; Te GIFFEL, M.C. Butyric acid bacteria spores in whole crop maize silage. In: THE INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 14., 2005, Belfast. **Proceedings...** Belfast: R.S. Park and M.D. Stronge, 2005. p. 271.

FERREIRA, J.J. Estágio de maturação ideal para ensilagem do milho e sorgo. In: CRUZ, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A. (Ed.). **Produção e utilização de silagem de milho e sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2001. p. 405-428.

GIFFEL, M.C.; WAGENDORP, M.E.; HERREWEGH, A.; DRIEHUIS, F. Bacterial spores in silage and raw milk. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 81, p. 625-630-2002.

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

HONIG H. Reducing losses during storage and unloading of silage. In: PAHLOW, G.; HONIG, H. (Ed.). **Forage conservation towards 2000**. Braunschweig: Landbauforschung Volkenrode, 1991. p. 116-136. (Sonderheft, 123).

HONIG H., PAHLOW G.; THAYSEN J. Aerobic instability: effects and possibilities for its prevention. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 12., 1999, Uppsala. **Proceedings...** p. 288-289.

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

JONSSON, A.; PAHLOW, G. Systematic classification and biochemical characterization of yeast growing in grass silage inoculated with *Lactobacillus* culture. **Animal Research and Development**, Tübingen, v. 20, p. 7-22, 1984.

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.; 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.

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

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: American Society of Agronomy, 2003. p. 305-360.

KUNG JR, L.; 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 total mixed ration. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, p. 1322-1330, 1998.

LIN, C.; BOLSEN, K.K.; BRENT, B.E.; HART, R.A.; DICKERSON, J.T.; FEYERHERM, A.M.; AIMUTIS, W.R. Epiphytic microflora on alfalfa and whole-plant corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.75, p.2484-2493, 1992.

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

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

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

McGECHAN, M.B.; WILLIAMS, A.G. A model of air infiltration losses during silage storage. **Journal of Agricultural Engineering Research**, New York, v. 57, p. 237-249, 1994.

MUCK, R.E. Silage fermentation. In: ZEIKUS, G.; JOHNSON, E.A. (Ed.). **Mixed cultures in biotechnology**. New York: McGraw-Hill, 1991. p. 171-204.

_____. Effects of corn silage inoculants on aerobic stability. In: ASAE ANNUAL INTERNATIONAL MEETING; CIGR WORLD CONGRESS, 15., 2002, Chicago. **Proceedings...** Chicago: ASAE; CIGR Hyatt Regency, 2002. p. 1-13.

_____. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p. 183-199, 2010.

MUCK, R.E.; MOSER, L.E.; PITT, R.E. Postharvest factors affecting ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H (Ed). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 251-304.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients requirements of dairy cattle**. 7th ed. Washington: National Academic Press, 2001. 381p.

NEDÉLNÍK, J.; MARAVCOVÁ, H. Mycotoxins and forage: problems of the occurrence of mycotoxins in animal feeds. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM FORAGE CONSERVATION, 12, 2006, Brno. **Proceedings...** p. 13-25.

OHYAMA, Y.; MASAKI, S.; HARA, S. Factors influencing aerobic deterioration of silages and changes in chemical composition after opening silos. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York, v. 26, p. 1137-1147, 1975.

OLDENBURG, E. Mycotoxins in conserved forage. In: PAHLOW, G; HONIG, H. (Ed.) **Forage conservation towards 2000**. Braunschweig: European Grassland Federation, 1991. p. 191-205.

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

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

PEDROSO, A.F.; NUSSIO, L.G.; LOURDES, D.R.S.; PAZIANI, S.F.; IGARASI, M.S.; COELHO, R.M.; HORII, J.; RODRIGUES, A.A. Effect of chemical and bacterial additives on losses and quality of sugar cane silages. **Brazilian Journal of Animal Science**, Brasília, v. 36, p. 558-564, 2007.

PEDROSO, A.F.; NUSSIO, L.G.; BARIONI JR., W.; RODRIGUES, A.A.; LOURES, D.R.S.; CAMPOS, F.; RIBEIRO, J.L.; MARI, L.J.; ZOPOLLATTO, M.; JUNQUEIRA, M.; SCHMIDT, P.; PAZIANI, S.F.; HORII, J. Performance of Holstein heifers fed sugarcane silages treated with urea, sodium benzoate or *Lactobacillus buchneri*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 649-654, 2006.

PEREIRA, J.R.A.; REIS, R.A. Produção e utilização de forragem pré-secada. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS. TEMAS EM EVIDÊNCIA. 2., 2001, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2001. p. 235-254.

PITT, R.E. A model of aflatoxin formation in stored products. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineering**, St. Joseph, v. 38, p. 1445–1453. 1995

PITT, R.E.; MUCK, R.E.; LEIBENSPERGER, R.Y. A quantitative modelo f the ensilage process in lactate silages. **Grass and Forage Science**, Malden, v. 40, p. 279-303, 1984.

POPE, R.S.; BRENT, B.E.; BOLSEN, K.K. Effect of surface spoiled silage on nutritive value of corn silage-based rations. In: KANDAS STATATE UNIVERSITY AGRICULTURAL. **Experimental Station Report of Progress 861**. Manhattan: Kansas State University, 2000. p. 36-38.

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.

RIBEIRO, J.L.; QUEIROZ, O.C.; NUSSIO, L.G. Desenvolvimento de aditivos microbianos para ensilagem: realidade e perspectivas. In: SIMPÓSIO DE VOLUMOSOS NA PRODUÇÃO DE RUMINANTES, 2., 2005, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 2005. p. 1-23.

SAVOIE, P.; JOFRIET, J.C. Silage storage. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America, 2003. p. 405-468.

SIQUEIRA, G.R.; REIS, R.A.; SCHOCKEN-ITURRINO, P.; PIRES, A.J.V.; BERNARDES, T.F.; AMARAL, R.C. Perdas de silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e bacterianos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, p. 2000-2009, 2007.

SILVA, N.C. **Aditivos como controladores da deterioração aeróbia em silagem de milho na região periférica de silis trincheira**. 2013. 69 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

TABACCO, E.; BORREANI, G. Extent of aerobic deterioration in farm maize silage as affected by silo management. In: THE INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 13., 2002, Auchincruive. **Proceedings...** Auchincruive: Scotland SAC, 2002. p. 178-179.

TAYLOR, C.C.; RANJIT, N.J.; MILLS, J.A.; NEYLON, J.M.; KUNG JR, L. The effect of treating whole-plant barley with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, p. 1793-1800, 2002.

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

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

WILKINSON, J.M. Silage and animal health. **Natural Toxins**, New York, v. 7, p. 212-230, 1999.

WILKINSON, J.M.; DAVIES, D.R. The aerobic stability of silage: key findings and recent developments. **Grass and Forage Science**, Malden, v. 68, p. 1-19, 2012.

WOOLFORD, M.K. Microbiological screening of food preservatives, cold sterilants and specific antimicrobial agents as potential silage additives. **Journal of the Science of Food and Agricultural**, London, v. 26, p. 229-237, 1975.

_____. The detrimental effect of air on silage. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 68, p. 101-116, 1990.

WOOLFORD, M.K.; SAWCZYK, M.K. An investigation into the effect of cultures of lactic acid bacteria on fermentation in silage. 1. Strain selection, **Grass and Forage Science**, Malden, v. 39, p. 139-148, 1984.