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

**Associação de aditivos químicos e microbianos no controle da
fermentação e estabilidade aeróbia em silagens de cana-de-açúcar
(*Saccharum officinarum* L.)**

José Guillermo Muñoz Maldonado

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

**Piracicaba
2007**

José Guillermo Muñoz Maldonado

Zootecnista

**Associação de aditivos químicos e microbianos no controle da fermentação e
estabilidade aeróbia em silagens e cana-de-açúcar
(*Saccharum officinarum* L.)**

Orientador:

Prof. Dr. LUIZ GUSTAVO NUSSIO

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

Piracicaba

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Muñoz Maldonado, José Guillermo

Associação de aditivos químicos e microbianos no controle de fermentação e estabilidade aeróbica em silagens de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) / José Guillermo Muñoz Maldonado. - - Piracicaba, 2007.

99 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Aditivos alimentar para animais 2. Cana-de-açúcar 3. Silagem I. Título

CDD 636.08552

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

A Deus,
que é a razão das nossas vidas.

Aos meus pais,
William Muñoz Perez e Maria Consuelo Maldonado Cala
pelo apoio incondicional, carinho e por ser os melhores pais.

Aos meus Irmãos,
Ana Maria Muñoz e Juan Carlos Muñoz
pelo seu carinho e exemplo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, pela oportunidade oferecida para realização do curso.

Ao programa internacional de estudantes-convênio de Pós-Graduação (PEC-PG) e ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Luiz Gustavo Nussio pelo apoio na vinda ao Brasil e pela orientação na condução de projeto e exemplo de dedicação profissional.

Aos professores Dr. Alexandre Vaz Pirez e Dr. Wilson Mattos R.S. pelo apoio para a realização do curso de Pós-graduação.

À Dra. Carla M. Bittar pelo auxílio nos trabalhos laboratoriais e pelo continuo acompanhamento na condução de projeto.

Ao Prof. Dr. Gerson Barreto Mourão pelas sugestões e auxílio nas análises estatísticas.

A toda equipe de qualidade e conservação de forragens: Patrick Schmidt, Lucas José Mari, José Leonardo Ribeiro, Maity Zopollato, Mateus Castilho Santos, Oscar Müller Queiroz, Jhones Onorino Sarturi, Vanessa Pillon Santos, Sérgio Gil Toledo Filho, Ana Luiza B. Schogor, Bruna da Conceição Mattos, Rodrigo Silva Goulart, Thiago Fernandes Bernardes, Mariana Galo e Gisele Bonato Muraro pela amizade e hospitalidade, além dos constantes aportes para a realização do projeto.

Aos amigos Alexandre Arias, Alexandro Bona, Daniel Renato Lammel, Samuel Silva Silvestre, Miguel Sungai, Gabriel Bart, Marconi Batista Texeira, Lucas Silveira Ferreira, Junior Cezar Cruz, Marcos Pinto Lima e o pessoal da Republica Taverna, pela sua valiosa amizade.

A todos os funcionários do Departamento de Zootecnia, a Carlos C. Alves e Tânia Aparecida Ferri Armelindo.

SUMARIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
RESUMEN	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 AVALIAÇÃO DE ADITIVOS QUÍMICOS E MICROBIANOS NO PERFIL DA FERMENTAÇÃO E VALOR NUTRITIVO DE SILAGENS DE CANA-DE-AÇÚCAR (<i>Saccharum officinarum</i> L.)	13
Resumo	13
Abstract	14
Resumen	15
2.1 Introdução	16
2. 2 Desenvolvimento	17
2.2.1 Revisão Bibliográfica	17
2.2.1.1 Valor Nutritivo da cana-de-açúcar	17
2.2.1.2 Silagem da cana-de-açúcar: fermentação alcoólica e perdas de matéria seca	19
2.2.1.3 Aditivos na ensilagem de cana-de-açúcar	23
2.2.1.3.1 Aditivos microbianos: bactérias produtoras de ácido láctico (BAL)	25
2.2.1.3.2 <i>Lactobacillus plantarum</i> em silagens de cana-de-açúcar	27
2.2.1.3.3 Aditivos químicos: benzoato de sódio na conservação de forragens	28
2.2.2 Material e métodos	31
2.2.2.1 Local do experimento	31
2.2.2.2 Silos experimentais e confecção da silagem	31
2.2.2.3 Tratamentos e aplicação dos aditivos	32
2.2.2.4 Avaliação das perdas durante o período de estocagem	33
2.2.2.4.1 Determinação da produção de efluente	33
2.2.2.4.2 Estimativa das perdas por gases	34
2.2.2.4.3 Determinação da perda total de matéria seca	35
2.2.2.5 Amostras	35
2.2.2.5.1 Amostras durante ensilagem	35

2.2.2.5.2 Amostras na abertura dos silos experimentais	36
2.2.2.6 Análises químico-bromatológicas	36
2.2.2.6.1 Amostras secas em estufa	36
2.2.2.6.2 Amostras de forragem fresca	38
2.2.2.7 Análise estatística	39
2.2.3 Resultados e Discussão	40
2.2.3.1 Caracterização da cana-de-açúcar utilizada durante as ensilagens	40
2.2.3.2 Avaliação das perdas durante o processo de conservação	45
2.2.3.3 Perfil fermentativo das silagens.....	50
2.2.3.4 Valor nutritivo das silagens após a abertura.....	55
2.3 Conclusões.....	60
REFERENCIAS.....	61
3 AVALIAÇÃO DE ADITIVOS QUÍMICOS E MICROBIANOS NA ESTABILIDADE AEROBIA E RECUPERAÇÃO DE MATÉRIA SECA EM SILAGENS DE CANA-DE- AÇÚCAR (<i>Saccharum officinarum</i> L.)	69
Resumo	69
Abstract	70
Resumen	71
3.1 Introdução	72
3.2 Desenvolvimento	73
3.2.1 Revisão Bibliográfica	73
3.2.1.1 Estabilidade aeróbia de silagens	73
3.2.1.2 Estabilidade aeróbica em silagens de cana-de-açúcar	74
3.3 Material e métodos	75
3.3.1 Local do experimento	75
3.3.1.2 Tratamentos e aplicação dos aditivos	75
3.3.1.3 Ensaio de estabilidade aeróbia	76
3.3.2 Amostras	76
3.3.2.1 Amostras durante as ensilagens	76
3.3.2.2. Amostras na abertura dos silos experimentais	77
3.3.2.3 Análises químico-bromatológicas	77

3.3.2.4 Amostras secas em estufa	77
3.3.2.5 Amostras de forragem fresca	79
3.3.3 Análise estatística	79
3.4 Resultados e Discussão	80
3.4.1 Estabilidade aeróbia das silagens de cana-de-açúcar	80
3.4.2 Valor nutritivo das silagens de cana-de-açúcar durante a fase aeróbia	91
3.5 Conclusões.....	97
REFERENCIAS.....	98

RESUMO

Associação de aditivos químicos e microbianos no controle da fermentação e estabilidade aeróbia em silagens de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de aditivos químicos e microbianos sobre as perdas de matéria seca, perfil fermentativo, valor nutritivo e estabilidade aeróbia da silagem de cana-de-açúcar. A variedade utilizada para confeccionar os silos laboratoriais foi RB-72454 com 12 meses de idade fisiológica. O experimento foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado, sendo seis tratamentos, com quatro repetições cada. Além da silagem de cana-de-açúcar controle, foram utilizados dois aditivos microbianos: *Lactobacillus plantarum* e o conjunto de bactérias *L. plantarum* + *Streptococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* (BAL). Esses dois aditivos microbianos também foram aplicados associados a duas doses de benzoato de sódio, 0,01 e 0,05% da massa verde (MV). Os aditivos microbianos foram aplicados à contagem de 5×10^4 ufc/g de forragem. As variáveis analisadas foram: perdas totais e gasosas, produção de efluente, recuperação de matéria seca, perfil fermentativo, estabilidade aeróbia e valor nutritivo no momento da abertura dos silos e durante o ensaio de estabilidade aeróbia. As maiores perdas fermentativas e gasosas foram observadas para o tratamento da associação de *L. plantarum* com benzoato de sódio na dosagem de 0,05% da MV. No entanto, não houve diferença entre os tratamentos para as variáveis do perfil fermentativo. Com relação ao valor nutritivo, as silagens que foram tratadas com associação de *L. plantarum* com benzoato de sódio na dosagem de 0,05% da MV, apresentaram no momento da abertura maior concentração de componentes fibrosos e menores coeficientes de digestibilidade da matéria seca. A maioria dos tratamentos apresentou desempenho semelhante ao tratamento controle no valor nutritivo no momento da abertura dos silos. Com relação ao ensaio de estabilidade aeróbia na associação de *L. plantarum* com benzoato de sódio na dosagem de 0,05% da MV, foi observado o menor acúmulo de temperatura nos primeiros cinco dias após abertura (ADITE-5) e menor pico de temperatura da massa exposta ao ar. Da mesma forma, as silagens tratadas com esses aditivos mantiveram estável o valor de pH e apresentaram maior recuperação de matéria seca das silagens nos primeiros cinco dias pós-abertura. Todavia, não houve diferenças significativas entre os tratamentos para as outras variáveis analisadas na fase aeróbia. Com relação ao valor nutritivo das silagens no momento da abertura, associação de *L. plantarum* com benzoato de sódio na dosagem de 0,05% da MV apresentou menores valores da fração fibrosa e maior digestibilidade da matéria seca nos primeiros cinco dias da fase aeróbia. Para a avaliação químico-bromatológicas, não foram encontradas diferença nos teores de carboidratos solúveis e proteína bruta entre os tratamentos. De forma geral, a análise conjunta dos experimentos mostra que as silagens tratadas com associação de *L. plantarum* com benzoato de sódio na dosagem de 0,05% da MV, apresentaram melhor desempenho na fase aeróbia que na fase fermentativa.

Palavras-chave: aditivos, associação, benzoato de sódio, cana-de-açúcar, silagens

ABSTRACT

Chemical and microbial additives association on fermentation and aerobic stability of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) silages

The objective of this study was to evaluate the effect of chemical and microbial additives on dry matter losses, fermentative profile, nutritive value and aerobic stability of sugarcane silages. The variety used to ensiling was RB-72454, harvested with 12 months of regrowth. It was analyzed as a completely randomized model, with six treatments and four replications for each treatment. Besides the control sugarcane silage, were tested two types of microbial additives: *Lactobacillus plantarum* and the association of *L. plantarum* and *Streptococcus faecium* and *Pediococcus acidilactici* (BAL). Moreover these two microbial additives were associated with two levels of sodium benzoate, 0.01 or 0.05% of fresh matter. The microbial additives were applied trying to reach 5×10^4 UFC/g of forage. The variables analyzed were: total dry matter losses, gases losses, effluent yield, dry matter recovery rate, fermentative profile, aerobic stability and nutritive value when the silos were opened and during the aerobic stability trial. The greatest fermentative and gaseous losses were observed in silages treated with *L. plantarum* associated with 0.05% of sodium benzoate. However, there is no difference among treatments regarding the fermentative profile. The silages added with *L. plantarum* associated to 0.05% of sodium benzoate showed highest cell wall content and lowest *in vitro* dry matter digestibility. Most of the treatments showed similar nutritive value as control silages. Regarding the aerobic stability assay, *L. plantarum* associated to 0.05% of sodium benzoate had highest accumulated temperature in the first five days (ADITE-5) and the lowest temperature pick. Similarly, these silages remained the pH stable and showed highest dry matter recovery rate in the first five days during aerobic trial. Although, there were no differences in the other variables in aerobic assay. In terms of nutritive value, the treatment of *L. plantarum* associated 0.05% of sodium benzoate, showed lowest fiber content and highest *in vitro* dry matter digestibility during the first five days of aerobic stability trial. There were no differences in the water soluble carbohydrates and crude protein content among treatments. In general, considering the whole trial, the treatment with *L. plantarum* associated with 0.05% of sodium benzoate had better performance during the aerobic phase than the fermentative one.

Key words: Additives, association of additives, silage, sodium benzoate, sugarcane

RESUMEN

Asociación de aditivos químicos y microbianos para el control de la fermentación y estabilidad aerobia de ensilajes de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.)

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de aditivos químicos y microbianos sobre la pérdida de materia seca, perfil fermentativo, valor nutritivo y estabilidad aerobia de ensilajes de caña de azúcar. La variedad utilizada para elaborar los silos experimentales fue RB-72454 con 12 meses de edad fisiológica. El experimento fue desarrollado en delineamiento enteramente casualizado, siendo seis tratamientos con cuatro repeticiones. Fuera del tratamiento control, los aditivos microbianos utilizados los fueron: *Lactobacillus plantarum* y el conjunto de bacterias *L. plantarum* + *Streptococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* (BAL). Estos aditivos microbianos también fueron aplicados asociados a dos dosis de benzoato de sodio, 0,01 y 0,05% de de forraje verde (FV). Los aditivos microbianos fueron aplicados para conteo bacterias de $5,0 \times 10^4$ UFC/g. Las mayores pérdidas fermentativas y gaseosas se observaron para el tratamiento de la asociación de *L. plantarum* con benzoato de sodio en la dosis de 0,05% da FV. Sin embargo, no hubo diferencia entre los tratamientos para las variables del perfil fermentativo. Con relación al valor nutritivo de los ensilajes donde fue aplicada la asociación de *L. plantarum* con benzoato de sodio en una dosis de 0,05% da FV, estos presentaron en el momento de la abertura mayor concentración de componentes fibrosos y menores coeficientes de digestibilidad de materia seca. La mayoría de los tratamientos presento desempeño semejante al tratamiento control para el valor nutritivo en el momento de la abertura de los silos. Con relación al ensayo de estabilidad aerobia, la asociación de *L. plantarum* con benzoato de sodio en la dosis de 0,05% da FV fue observado el menor acumulo de temperatura en los primeros cinco días después de la abertura (ADITE-5) y menor pico de temperatura de la masa expuesta al aire. De la misma forma, los ensilajes que fueron aplicados éstos aditivos, mantuvieron estable el valor de pH y presentaron mayor recuperación de materia seca en los primeros cinco días después de la abertura. No obstante, no hubo diferencias significativas entres los tratamientos para las otras variables analizadas en la fase aerobia. Con relación a el valor nutritivo de los ensilajes en el momento de la abertura, la asociación de *L. plantarum* con benzoato de sodio en la dosis de 0,05% da FV presento menores valores de la fracción fibrosa y mayor digestibilidad de la materia seca en los primeros cinco días de la fase aerobia. Para las evaluaciones químico-bromatológicas, no fueron encontradas diferencias para los concentración de carbohidratos solubles y proteína bruta entre os tratamientos. En general, al analizar en conjunto los experimentos, éstos indican que los ensilajes que fueron aplicada la asociación de *L. plantarum* con benzoato de sodio en la dosis de 0,05% da FV, resultaron en mejor desempeño en la fase aerobia, que en la fase fermentativa.

Palabras – clave: aditivos, asociación, benzoato de sodio, caña de azúcar, ensilajes

1 INTRODUÇÃO

O setor canavieiro é de grande relevância para o agronegócio brasileiro apresentando altos índices de crescimento e com elevados investimentos em tecnologia. Além disso, é considerado como uma das opções mais promissoras para o desenvolvimento sócio-econômico de varias regiões onde esta cultura encontra-se em expansão. Atualmente, a produção mundial de cana-de-açúcar esta perto de 1,28 bilhões de toneladas, sendo que o Brasil situa-se como o primeiro produtor mundial. Na safra 2005 foram produzidas quase 455 milhões de toneladas, utilizando uma área de 6,1 milhões de hectares. O Estado de São Paulo se destaca por apresentar a maior produção total de cana-de-açúcar chegando a 266 milhões de toneladas.

A grande disponibilidade da cana-de-açúcar em regiões que são tradicionalmente de exploração pecuária tem consistido em um fator que vem estimulando o uso desta cultura na alimentação animal. Além disso, devido ao grande incentivo a partir de década setenta, com o programa Proálcool, observou-se intenso desenvolvimento tecnológico no processo de cultivo e aumento no numero de variedades disponíveis no mercado. Dessa forma, obtiveram-se variedade com maior potencial de produção e aumento no teor de açúcares das plantas. Portanto, estes fatores somados aos baixos custos relativos a outras culturas e a sua disponibilidade nos períodos de escassez de pastagens, motivaram a utilização deste volumoso nos programas de alimentação animal.

Com relação à forma de utilização da cana-de-açúcar nas fazendas, vem sendo observadas mudanças nos últimos anos. Tradicionalmente a cana-de-açúcar vem sendo fornecida em forma de capineira, no entanto, o corte diário estabelece limitações logísticas e operacionais, principalmente em grandes confinamentos. Portanto, novas estratégias vêm sendo adotadas para diminuir a freqüência de colheita da forragem e entre estas tem aumentado o interesse pelo uso da cana-de-açúcar na forma ensilada. A concentração da colheita em curto espaço de tempo, o melhor manejo do talhão e o incremento da eficiência operacional na fazenda, são fatores importantes para a escolha dessa técnica de conservação, além dos benefícios que esta representa nas condições de trabalho dos operários envolvidos nos processos de colheita.

Dessa forma, o interesse de pesquisa na conservação de cana-de-açúcar tem aumentado por parte da comunidade científica, fato que pode ser constatado no crescente número de publicações nesta área. Além disso, contínuos esforços vêm sendo realizados para viabilizar a conservação deste volumoso, apresentando como principais desafios o entendimento da dinâmica entre as características intrínsecas da planta como teor de carboidratos e composição da fração fibrosa, bem como as características da população de microrganismos epifíticos.

Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da inclusão de aditivos contendo bactérias produtoras de ácido láctico exclusivamente ou em associação ao benzoato de sódio no controle das perdas fermentativas, valor nutritivo e a estabilidade aeróbia das silagens de cana-de-açúcar.

2 AVALIAÇÃO DE ADITIVOS QUÍMICOS E MICROBIANOS NO PERFIL DA FERMENTAÇÃO E VALOR NUTRITIVO DE SILAGENS DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de aditivos químicos e microbianos sobre as perdas de matéria seca, perfil fermentativo e valor nutritivo da silagem de cana-de-açúcar. A ensilagem foi realizada em silos experimentais de 20 litros, adaptados com válvulas para eliminação dos gases e dispositivo para mensuração de efluentes produzidos, após 90 dias de conservação. A variedade de cana-de-açúcar utilizada para o experimento foi RB-72454, colhida após 12 meses de crescimento fisiológico. O experimento foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado, sendo sete tratamentos, com quatro repetições cada. Além da silagem de cana-de-açúcar controle, foram utilizados dois aditivos microbianos: *Lactobacillus plantarum* e o conjunto de bactérias *L. plantarum* + *Streptococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* (BAL). Esses dois aditivos microbianos também foram aplicados associados a duas doses de benzoato de sódio, 0,01 e 0,05% da massa verde. Os aditivos microbianos foram aplicados à contagem de 5×10^4 ufc/g de forragem. As variáveis analisadas foram: perdas totais e gasosas, produção de efluente, recuperação de matéria seca, perfil fermentativo e valor nutritivo no momento da abertura dos silos. As maiores perdas fermentativas e gasosas foram observadas para o tratamento da associação de *L. plantarum* com benzoato de sódio na dosagem alta (0,05% da MV), resultando na menor taxa de recuperação de matéria seca. No entanto, não houve diferença entre os tratamentos para as variáveis do perfil fermentativo. Com relação ao valor nutritivo, as silagens que foram tratadas com associação de *L. plantarum* com benzoato de sódio na dosagem alta (0,05% da MV) apresentaram, no momento da abertura maior concentração de componentes fibrosos e menores coeficientes de digestibilidade da matéria seca. A maioria dos tratamentos apresentou desempenho semelhante ao tratamento controle no valor nutritivo no momento da abertura dos silos. De forma geral, a análise conjunta dos resultados mostra que nem a inoculação com aditivos microbianos, nem sua associação com aditivos químicos trouxeram benefícios para a fase fermentativa.

Palavras-chave: Aditivos, associação, benzoato de sódio, cana-de-açúcar, silagens

2 EVALUATION OF CHEMICAL AND MICROBIAL ADDITIVES ON THE FERMENTATIVE PROFILE AND NUTRITIVE VALUE OF SUGARCANE (*Saccharum officinarum* L.) SILAGES

Abstract

This trial aimed to evaluate the effect of chemical and microbial additives on the dry matter losses, fermentative profile and nutritive value of sugarcane silages. The ensiling process occurred in 20L buckets provided with a Bunsen-type valve and a dispenser to collect the effluent yielded. The silos remained closed for 90 days. The variety used to ensiling was RB-72454, harvested with 12 months of regrowth. It was analyzed as a completely randomized model, with six treatments and four replications for each treatment. Besides the control sugarcane silage, were tested two kinds of microbial additives: *Lactobacillus plantarum* and the association of *L. plantarum* and *Streptococcus faecium* and *Pediococcus acidilactici*. Moreover these two microbial additives were associated with two levels of sodium benzoate, 0.01 or 0.05% of fresh matter. The microbial additives were applied trying to reach 5×10^4 UFC/g of forage. The parameters analyzed were: total dry matter and gases losses, effluent yield, dry matter recovery rate and nutritive value of sugarcane silages. The highest fermentative losses were observed in the *L. plantarum* associated with 0.05% of sodium benzoate treatment, resulting in the lowest dry matter recovery rate. Although, there were no difference among the treatments regarding all other variables of fermentative profile. In terms of nutritive value, the silages treated with *L. plantarum* associated with 0.05% of sodium benzoate showed the highest fiber content and the lowest *in vitro* dry matter digestibility. Most of the treatments showed similar performance as the control silages regarding the nutritive value. In general, neither the use of microbial, nor the uses of chemical additives were efficient during the fermentative phase of sugarcane silages.

Key words: Additives: Association of additives, silages, sodium benzoate, sugarcane

2 EVALUACIÓN DE ADITIVOS DE QUÍMICOS Y MICROBIANOS EN EL PERFIL DE FERMENTACIÓN Y VALOR NUTRITIVO DE ENSILAJES DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de aditivos químicos y microbianos sobre las pérdidas de materia seca, perfil fermentativo y valor nutritivo de ensilajes de caña de azúcar. Los ensilajes fueron realizados en silos experimentales de 20 litros, adaptados con válvulas para eliminación de gases y dispositivo para medir la producción de efluentes, después de 90 días de conservación. La variedad de caña de azúcar utilizada para el experimento fue RB-72454, cosechada con de 12 meses de crecimiento fisiológico. El experimento fue desarrollado en delineamiento enteramente casualizado, siendo seis tratamientos con cuatro repeticiones. Fuera del tratamiento control, los aditivos microbianos utilizados los fueron: *Lactobacillus plantarum* y el conjunto de bacterias *L. plantarum* + *Streptococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* (BAL). Estos aditivos microbianos también fueron aplicados asociados a dos dosis de benzoato de sodio, 0,01 y 0,05% de de forraje verde (FV), siendo que todos los aditivos microbianos fueron aplicados con contaje bacteriana de $5,0 \times 10^4$ UFC/g. Las variables analizadas fueron: pérdidas totales y por gas, producción de efluente, recuperación de materia seca, perfil fermentativo y valor nutritivo en el momento de la abertura de los silos. Las mayores pérdidas fermentativas e gaseosas fueron observadas para el tratamiento de la asociación de *L. plantarum* con benzoato de sodio en la dosis alta (0,05% da FV), resultando en menor proporción de recuperación de materia seca. Sin embargo, no hubo diferencia entre los tratamientos para las variables del perfil fermentativo. Con relación al valor nutritivo, los ensilajes que donde fue aplicada la asociación de *L. plantarum* con benzoato de sodio en la dosis alta (0,05% da FV) presentaron en el momento de la abertura mayor concentración de componentes fibrosos y menores coeficientes de digestibilidad de materia seca. La mayoría de los tratamientos presento desempeño semejante al tratamiento control para el valor nutritivo en el momento de la abertura de los silos. En todo caso, al analizar conjuntamente los resultados, se puede concluir que la inoculación con aditivos microbianos y la asociación con aditivos químicos no presentaron beneficios para la fase fermentativa.

Palabras-clave: aditivos, asociación, benzoato de sodio, caña de azúcar, ensilajes

2.1 Introdução

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância no contexto brasileiro, que devido a extensa área plantada e as estimativas de crescimento para os próximos anos, esta cultura posiciona-se como uma alternativa a ser usada nos sistemas de produção animal.

Levantamentos estatísticos estimam que atualmente 40 milhões de toneladas de cana-de-açúcar teriam como destino à produção animal, sendo utilizadas especificamente para ruminantes durante a estação seca do ano. Na maioria dos casos a época de colheita é coincidente com o menor período de produção de pastagens. Além disso, a cana-de-açúcar é uma alternativa que apresenta vantagens competitivas devido à alta produtividade por área (80 a 120 t/ha), ao baixo custo de produção por unidade de matéria seca. Além disso, esta apresenta manutenção do valor nutritivo por longo tempo, durante o período em que a planta apresenta o seu melhor valor nutritivo.

Embora a cana-de-açúcar seja tradicionalmente colhida manualmente e fornecida picada aos animais, todavia limitações de ordem logística decorrentes deste manejo, especialmente em grandes rebanhos, levaram ao interesse de produtores e pesquisadores na conservação deste volumoso na forma de silagem.

O processo de ensilagem deste volumoso apresenta condições de crescimento microbiano, que modelam uma fermentação caracterizada pelo alto teor de etanol, produzido por leveduras epifíticas. Nesse processo fermentativo que é típico da cana-de-açúcar, caracteriza-se pela elevada produção de gases e a rápida volatilização do etanol, apresentando elevadas perdas de matéria seca, diminuição no teor de carboidratos solúveis e aumento respectivo na fração fibrosa.

Em vista desta situação, o controle da produção de etanol nas silagens de cana-de-açúcar tem sido o principal desafio para comunidade científica, sendo avaliados diferentes aditivos, químicos e microbianos, com o intuito de controlar adequadamente a elevada população e atividade das leveduras durante o processo fermentativo.

Dentro desse contexto, o objetivo desse trabalho é avaliar os efeitos de aditivos químicos e microbianos na composição bromatológica, perfil fermentativo e nas perdas associadas a fase da fermentação em silagens de cana-de-açúcar.

2. 2 Desenvolvimento

2.2.1 Revisão Bibliográfica

2.2.1.1 Valor Nutritivo da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é um importante recurso forrageiro usado amplamente nos países tropicais, que apresenta época de colheita coincidente com o período de seca e de baixa disponibilidade de forragens, o que a difere da maioria das outras culturas. Além disso, características de alta produtividade de matéria seca (MS) por hectare; manutenção da qualidade nutritiva por longo tempo e ampla disponibilidade desta cultura no Brasil, tem renovado o interesse de produtores e pesquisadores como opção competitiva quando comparada às outras fontes de volumosos.

De forma geral a cana-de-açúcar apresenta tradicionalmente um ciclo de crescimento de 12 a 18 meses dependendo da variedade, sendo esta diferenciada de outras plantas forrageiras em virtude do padrão de acúmulo de açúcares (sacarose) ao longo do ciclo de produção. Nesse sentido Preston e Hinojosa; Martinez (1976) apontaram que esta característica permite à cana-de-açúcar manter sua digestibilidade, mesmo com o aumento da maturidade, compensando os processos inerentes ao crescimento da planta como a lignificação e o acúmulo de carboidratos estruturais da parede celular.

Nussio et al. (2006), destacaram entre as características de valor nutritivo da cana-de-açúcar, a alta proporção da fração fibrosa e um baixo teor de proteína. Em uma compilação de dados realizado com base em resultados emitidos pelo Laboratório de Bromatologia da USP/ESALQ durante os anos de 2000 a 2006, foram notados valores médios para as frações de FDN e FDA de 47,3% e 30%, respectivamente, e de proteína bruta que alcançou 2,73% da MS. Esses valores corroboram valores geralmente encontrados na literatura, conforme dados apresentados na Tabela 1.

Entretanto, Pate et al. (2002) advertiram que a variação ampla no valor nutricional da cana-de-açúcar pode provocar desvios significativos no balanceamento das rações. Entre as principais características que podem ser influenciadas destacam-

se a diversidade varietal, a maturidade fisiológica e as variações ambientais (NUSSIO et al., 2006).

Tabela 1 - Composição bromatológica da cana-de-açúcar

MS %	PB -----	FDN	HEMI % MS -----	FDA	CHO'S	Fonte
35,3	2,8	52,9	20,6	32,3	20,4	Santos (2007)
30,0	2,6	52,9	-	-	22,7	Queiroz (2006)
29,3	3,4	55,5	18,2	37,4	11,6	Schmidt et al. (2007a)
35,2	1,5	52,1	-	34,8	-	Siqueira et al.(2007a)
26,0	2,9	53,0	22,5	30,5	41,0	Freitas et al.(2007a)
29,8	4,1	57,3	18,9	38,4	-	Pedroso (2003a)
29,3	3,4	55,5	-	37,4	23,3	Pedroso (2003b)
29,6	-	48,8	19,9	28,9	-	Azevedo et al.(2003)
29,7	-	48,5	-	29,3	-	Fernandes et al.(2003)
-	-	-	-	-	19,7	Castro Neto (2003)
-	-	34,9	-	42,1	-	Molina et al. (2002)
-	-	50,3	-	34,9	31,4	Alcântara et al. (1989)
26,7	-	-	-	28,3	47,1	Alli et al. (1983)
22,9	-	29,9	-	29,9	53,3	Alli e Backer (1982)
29,4	2,95	49,3	20,2	33,6	30,0	Média
12,2	27,5	17,0	8,3	13,3	46,9	CV (%)

PB=proteína bruta; FDN=fibra em detergente neutro; FDA=fibra em detergente ácido
CHO'S=carboidratos solúveis; MS= matéria seca.

Com respeito à diversidade varietal, Rodrigues et al. (2001) sugeriram que se deve selecionar para alimentação animal, variedades com menor relação entre fração fibrosa e açúcares solúveis totais (FDN/POL), de modo que, quanto menor esta relação, melhor a variedade como recurso forrageiro. Atualmente, grande parte das novas variedades lançadas e testadas para este fim apresentam relação FDN/POL menor que 3,0 (RODRIGUES et al., 2006).

Freitas et al. (2006a) relataram que se deve considerar fatores de qualidade da fibra da planta nos programas de seleção das variedades de cana-de-açúcar para uso como planta forrageira. Isso se justifica uma vez que, características bromatológicas como teor e taxa de degradação da fração FDN estão relacionadas com o consumo e a digestibilidade do volumoso, que em última instância determinam o suprimento de nutrientes e a produção animal.

Em relação à variação no valor nutritivo em função da maturidade fisiológica, Fernandes et al. (2003) afirmam que variedades de cana-de-açúcar com ciclo de produção intermediário apresentam melhor valor nutritivo do que as de ciclo precoce. Tais autores observaram que as variedades de ciclo de produção intermediário tiveram uma produção 8,66% maior que as precoces, devido ao efeito da idade de corte correlacionado com a produção. Além disso, no mesmo experimento Fernandes et al. (2003) obtiveram maiores teores de NDT para as variedades de crescimento intermediário, devido à menor concentração em FDA, a qual esta altamente correlacionada com a digestibilidade. No entanto, neste mesmo trabalho os mesmos autores observaram que variedades com crescimento intermediário apresentaram menores valores de FDN do que as precoces, sendo esse comportamento justificado pelo fato das plantas de crescimento precoce atingirem a maturidade mais cedo, culminando mais rápido com o desenvolvimento das estruturas de sustentação da planta, principalmente representada pelos carboidratos estruturais. Dentro desse contexto pode-se esperar que as variedades de cana-de-açúcar com ciclo intermediário, teoricamente, apresentem maior potencial quanto ao desempenho dos animais.

Contudo, é importante ressaltar que as qualidades da cana-de-açúcar como disponibilidade, alta produção e a manutenção do valor nutritivo por longo tempo, são características que destacam esta cultura como fonte importante de volumoso na atualidade. No entanto, devem ser recomendadas variedades específicas para alimentação animal, já que se podem manifestar restrições no consumo voluntário, diminuindo a exploração do potencial deste volumoso.

2.2.1.2 Silagem da cana-de-açúcar: fermentação alcoólica e perdas de matéria seca

A utilização da cana-de-açúcar ensilada para alimentação animal é um tema que vem se destacando nos últimos anos, principalmente pelos benefícios operacionais que esta oferece. Entretanto, apresenta como principal desafio para a comunidade científica o esclarecimento dos processos de interação entre características bromatológicas intrínsecas da planta e tipo de microflora epifítica.

A cana-de-açúcar ensilada sem aditivos apresenta normalmente fermentações indesejáveis, que levam a uma importante diminuição no valor nutritivo, em comparação com a cana-de-açúcar *in natura*, e a redução no consumo voluntário de MS por parte do animal (NUSSIO et al., 2003).

Neste sentido, estudos pioneiros realizados por Preston e Hinojosa; Martinez (1976) indicam que o alto conteúdo de carboidratos solúveis da cana-de-açúcar favorece uma rápida proliferação de leveduras, que realizam vias metabólicas com produção de etanol, dióxido de carbono e água. Esta fermentação alcoólica é caracterizada pela diminuição de até 70% no teor de carboidratos solúveis (CHO's), já que as leveduras utilizam estes açúcares e ácido láctico produzido, competindo com as bactérias produtoras de ácido láctico (BAL) no início do processo fermentativo. Este tipo de fermentação da cana-de-açúcar resulta em um aumento nos componentes da parede celular e elevadas perdas de MS (ALLI et al., 1983; PEDROSO et al., 2007).

A dinâmica do desenvolvimento das leveduras em silagens de cana-de-açúcar foi estudada por Pedroso et al. (2007), que reportaram a maior população destes microrganismos no 2º dia após a ensilagem (5,05 log ufc/g MV) e declino até o 15º dia. No mesmo estudo os autores identificaram este período como de intensa fermentação alcoólica, quando se observaram as maiores perdas de matéria seca e perdas por gás, com uma diminuição de 25% na digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DVIVMS) da forragem e uma diminuição de 68% no teor de carboidratos solúveis.

A dificuldade no controle das leveduras se deve ao fato de não serem inibidas em um meio ácido produzido, sendo capazes de crescer num amplo intervalo de pH que pode variar de 3 a 8, sendo que algumas espécies podem sobreviver a pH inferior a 2. Além disso, algumas espécies de leveduras conseguem manter altas populações em condições anaeróbicas (McDONALD et al., 1991; MUCK et al., 1991; O'KIELY e MUCK, 1992).

Kung Jr. e Staney (1982) avaliaram o perfil fermentativo da cana-de-açúcar ensilada sem aditivos em diferentes idades de maturidade e encontraram uma elevada produção de etanol com valores médios de 12,74 % da MS. As perdas totais de matéria seca deste experimento chegaram a 29% na cana-de-açúcar ensilada aos 24 meses. Alli e Baker (1982) estudando o padrão de fermentação da cana-de-açúcar fresca e

picada, constataram que durante o processo fermentativo o teor de carboidratos solúveis diminuiu de 52,3% para 3,64% da MS. Além disso, os mesmos autores registraram uma elevada produção de etanol, que atingiu os valores de 8,86% da MS. O valor da fração FDA também aumentou de 29,9% no momento da ensilagem para 43,1% na abertura dos silos. Alli et al. (1983) também reportaram uma diminuição do valor nutritivo da cana-de-açúcar ensilada sem aditivos. Neste experimento, após um período de conservação de 42 dias, o teor de carboidratos solúveis passou de 47,1% a 0,92%, com uma produção de etanol de 10,6%, acompanhado de um aumento de 33,6% no valor da fração FDA. Alcântara et al. (1989), avaliando o efeito de aditivos químicos em cana-de-açúcar reportaram uma diminuição de 31,42% a 4,4% no teor de carboidratos solúveis no tratamento sem aditivos, após 30 dias da ensilagem.

Em relação à produção de etanol, embora esta possa ser potencialmente aproveitável como substrato energético no rumem, por meio da produção de acetato (CHALUPA et al., 1964), grande parte deste composto é perdido durante a fase de estocagem nos silos (ALLI e BAKER, 1982). Segundo Nussio et al. (2003), o etanol produzido resulta numa grande perda de matéria seca de forragem, provocando também rejeição da silagem pelo animal após a retirada do silo e conseqüente menor consumo.

Na Tabela 2 podem ser observados dados de alguns trabalhos realizados com silagens de cana-de-açúcar, que ilustram claramente o padrão fermentativo caracterizado pela diminuição dos carboidratos solúveis, aumento da fração fibrosa e elevada produção de etanol.

Tabela 2 - Alteração na composição bromatológica da cana-de-açúcar após o processo de ensilagem sem aditivo

pH	CHO'S		FDN		FDA		Etanol	Fonte
	ENS	AB	ENS	AB	ENS	AB		
	----- % MS -----							
3,5	20,4	3,0	52,9	67,1	32,3	43,7	4,8	Santos (2007)
3,6	22,7	1,8	52,9	73,7	-	45,6	7,9	Queiroz (2006)
3,5	11,7	3,8	55,5	66,0	37,4	42,8	-	Schmidt et al. (2007a)
-	-	-	57,3	64,5	38,4	44,3	-	Pedroso (2003a)
3,6	23,3	9,1	55,5	59,5	37,4	42,3	4,0	Pedroso (2003b)
-	19,7	2,5	-	-	-	-	-	Castro Neto (2003)
-	-	-	42,1	54,9	34,9	43,8	6,9	Bernardes et al. (2002)
-	31,4	4,4	50,3	67,5	34,9	44,1	-	Alcântara et al. (1989)
-	47,1	1,0	-	-	28,3	38,0	11,0	Alli et al. (1983)
3,55	25,1	3,6	52,3	64,7	34,8	43,0	6,9	Média
1,62	44,7	72,7	9,6	9,3	10,1	5,2	39,9	CV (%)

ENS=momento de ensilagem; AB=momento da abertura; FDN=fibra em detergente neutro; FDA=fibra em detergente ácido; CHO'S=carboidratos solúveis; MS= matéria seca

Vários estudos vêm sendo desenvolvidos recentemente no Brasil apontando as dificuldades enfrentadas com a fermentação alcoólica da cana-de-açúcar (CASTRO NETO, 2003; SOUSA, 2005; LOPES, 2006; FREITAS et al., 2006a; JUNQUEIRA, 2006; SCHMIDT et al., 2007b; QUEIROZ 2006; ROSSI JUNIOR; SCHOGOR, 2006; SIQUEIRA et al., 2007a; PEDROSO et al., 2007; FERREIRA et al., 2007; SANTOS, 2007).

Pedroso et al. (2005) observaram aos 45 dias após ensilagem da cana-de-açúcar elevadas perdas de matéria seca (29,2%) e elevada produção de etanol (7,92% da MS). Santos (2007) verificou também a excessiva perda de matéria seca (34,31%) da cana-de-açúcar sem aditivos, acompanhada de drástica redução dos teores de carboidratos solúveis de 20,4% na forragem original para 2,98%, após 90 dias de ensilagem. Ferreira et al. (2007) observaram intensa queda no teor de carboidratos solúveis em cana-de-açúcar colhida aos sete meses, visto que neste experimento obteve-se redução de 21,46% para 0,74%, após 56 dias da ensilagem. Freitas et al. (2006b) avaliaram aditivos microbianos e o resíduo de colheita de soja em silagens de cana-de-açúcar e constataram da mesma forma declínio no teor de carboidratos solúveis após 45 dias de conservação, acumulando perda total de matéria seca de 31,1%. Siqueira et al. (2007a)

determinaram o efeito de alguns aditivos microbianos e observaram diminuição de 37,2% dos carboidratos não fibrosos da cana-de-açúcar, após 60 dias da ensilagem. Neste mesmo período, esses autores observaram incremento nos valores de FDN, que passaram de 51,2% no momento da ensilagem para 75,3% na abertura.

Contudo, é importante ressaltar que as particularidades da fermentação de silagens de cana-de-açúcar têm estimulado nos últimos anos diferentes equipes de pesquisa, ao direcionamento de projetos na área de aditivos químicos e microbianos. Nussio et al. (2003), ressaltaram que o uso da cana-de-açúcar sem nenhum tipo de aditivo, representa uma fonte de volumoso pouco interessante, devido ao valor nutritivo inferior comparativamente com seu estado original. Situação que poderia limitar o potencial de desempenho de animais, especialmente em rações com grande inclusão deste material. Portanto, os mesmos autores afirmaram que pesquisas na área de aditivos devem ser realizadas, já que esta é uma ferramenta útil que poderia diminuir o impacto que a fermentação alcoólica apresenta no detrimento no valor nutritivo da cana-de-açúcar ensilada, possibilitando o uso deste material como volumoso conservado.

2.2.1.3 Aditivos na ensilagem de cana-de-açúcar

Com o intuito de melhorar o padrão fermentativo da cana-de-açúcar, tem-se recomendado o uso de aditivos químicos e/ou microbianos que possibilitem a inibição da população de leveduras, principais responsáveis pelos efeitos altamente indesejáveis como as elevadas perdas de matéria seca e diminuição no valor nutritivo.

Atualmente, grande variedade de aditivos químicos, microbianos e enzimáticos vem sendo recomendada para melhorar a qualidade das silagens de cana-de-açúcar. Trabalhos recentes realizados por Santos (2007), reportam efeitos benéficos na adição de cal virgem (1,5% da MS) no momento da ensilagem culminando em menores perdas de matéria seca (15,90% da MS) em comparação ao tratamento sem aditivos (34,31% da MS). Também tem sido reportado maior conservação dos carboidratos solúveis (8,6% da MS) com a utilização de cal virgem em comparação ao tratamento controle (2,98% da MS). Pedroso et al. (2007) apresentaram significativa diminuição das perdas de matéria seca nos tratamentos com 1,5% de uréia, 1% de NaOH, 0,03% de sorbato

de potássio (7,59%; 8,91%; 11,2% da MS, respectivamente) em comparação ao tratamento controle (18,2% da MS). Neste mesmo trabalho, o aditivo microbiano *Lactobacillus buchneri* ($3,64 \times 10^5$ UFC/g MV) destacou-se por apresentar uma das menores perdas de matéria seca (8,05% da MS). Schmidt (2006) avaliou a integridade da massa ensilada e encontrou elevada recuperação de matéria seca nas silagens aditivadas com benzoato de sódio (86,8% da MS) e *L. buchneri* (88,0% da MS), adotando a concentração de microorganismos de $3,64 \times 10^5$ UFC/g MV. O autor indica que o benzoato de sódio foi o aditivo mais eficiente em preservar a fração de carboidratos solúveis (8,25% da MS), em relação ao tratamento sem aditivos (3,76% da MS). Junqueira (2006), em outro experimento com silagens de cana-de-açúcar aditivadas com *L. buchneri* ($5,0 \times 10^4$ UFC/g MV), encontrou redução significativa de 31,7% nas perdas de matérias seca e de 48,5% no teor de etanol. Siqueira (2005), utilizando 0,1% da MV de benzoato de sódio na silagem de cana-de-açúcar, ratificou a redução na perda total de MS em 7,3%, quando comparado à silagem sem aditivos.

Nesse cenário, novos trabalhos de pesquisa vêm sendo conduzidos no Brasil, associando diferentes tipos de aditivos, visando um efeito sinérgico na redução das perdas fermentativa em silagens de cana-de-açúcar.

Siqueira et al. (2007b) avaliaram a associação dos aditivos e encontraram menor perda de matéria seca e perdas por gases, para os tratamentos na combinação de *L. buchneri* aos aditivos químicos benzoato de sódio e NaOH. Pedroso et al. (2007) também observaram menores perdas de matéria seca (11,4% da MS) quando *L. plantarum* ($1,0 \times 10^6$ UFC/g MV) foi associado a 1,0% de uréia, em comparação com o tratamento sem aditivo (18,2% da MS). No entanto, Freitas et al. (2006a) avaliaram a qualidade nutricional da silagem de cana-de-açúcar quando aditivos *L. plantarum* ($1,0 \times 10^6$ UFC/g MV) e *L. buchneri* ($5,0 \times 10^4$ UFC/g MV) foram enriquecidos com resíduo de colheita de soja e não verificaram efeito benéfico na redução das perdas de matéria seca e nem na diminuição da produção de etanol nos tratamentos.

Em todo caso, a proposta de associação de aditivos microbianos aos aditivos químicos vem ganhando interesse da pesquisa européia em outras culturas. Essa estratégia poderia oferecer novos avanços no caso das silagens de cana-de-açúcar,

sempre que forem avaliadas as implicações no valor nutritivo e no desempenho animal, estabelecendo adequadamente os benefícios reais da sua adoção.

2.2.1.3.1 Aditivos microbianos: bactérias produtoras de ácido láctico (BAL)

Atualmente, grande diversidade de aditivos vem sendo recomendada com o intuito de minimizar as perdas no valor nutritivo das silagens. Entre estes, os inoculantes bacterianos tiveram um rápido desenvolvimento e adoção no mundo (BERNADES, 2006), devido principalmente às características como: facilidade de uso, não ser corrosivo para a máquina na hora da aplicação, não ser poluente para o meio ambiente e a sua disponibilidade no mercado (ROTZ; MUCK, 1994; WEINBERG e MUCK, 1996).

Dentro dos inoculantes bacterianos as bactérias produtoras de ácido láctico (BAL) são utilizadas como aditivos na silagem a fim de melhorar a eficiência na conservação. As BAL podem crescer em uma faixa de temperatura entre 5 °C a 50 °C, sendo 30°C a temperatura para um ótimo crescimento. As duas espécies de enterococcus encontradas comumente na silagem (*E. faecalis* e *E. faecium*), crescem sob amplitude de temperatura de 10 a 45°C. O intervalo de pH para seu crescimento situa-se em torno de 4,0 a 6,8, embora algumas espécies, tais como *Pediococcus damnosus*, cresçam em pH 3,5 (McDONALD et al., 1991). As BAL possuem a capacidade de fermentar ampla gama de substratos usando diferentes vias metabólicas. Essa diferenciação na fermentação das hexoses tem sido usada para sua classificação, podendo esta ser dividida em três grupos:

- 1) Homofermentativas obrigatórias: fermentam hexoses quase que exclusivamente para ácido láctico, mas pentoses e gluconato não podem ser fermentadas, pois estas contêm a enzima frutosebifosfato (FBP) aldolase e não a fosfoquetolase.

- 2) Heterofermentativas facultativas: possuem frutosebifosfato (FBP) e também fermentam hexoses quase exclusivamente para ácido láctico, mas são também

capazes de fermentar hexoses para etanol ou ácido acético, com liberação de dióxido de carbono, usando a enzima fosfoquetolase.

3) Heterofermentativas obrigatórias: Fermentam hexoses para ácido láctico, ácido acético ou etanol e dióxido de carbono, e possuem a enzima fosfoquetolase, mas não a enzima FBP aldolase (McDONALD et al., 1991).

Entre as bactérias homofermentativas de ácido láctico encontradas amplamente em diferentes cultivares, podem-se destacar as espécies *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* e *Pediococcus spp.*, sendo que quando presentes na forragem em quantidade suficiente podem dominar a fermentação da massa, possibilitando rápida diminuição do pH. Esta situação apresenta várias vantagens, já que poderiam controlar populações de microrganismos deterioradores que produzem altos níveis de ácido acético e butírico e também inativar as enzimas responsáveis pela proteólise na fermentação (MUCK; KUNG, 1997). Assim, o uso eficiente dos carboidratos solúveis por parte destas espécies em comparação com outras BAL pode resultar em processos de conservação com menores perdas de matéria seca e maior retenção de nutrientes na silagem (ROOKE et al., 1985; McDONALD et al., 1991; WEINBERG e MUCK, 1996; WHITER et al., 2001).

Weinberg e Muck (1996) ressaltaram que a inoculação das BAL apresenta em algumas culturas uma elevada predisposição ao aquecimento da massa na fase aeróbia. Essa susceptibilidade ao aquecimento após abertura do silo pode ser entendida devido o ácido láctico produzido ser menos inibitório para o controle das leveduras e fungos do que o ácido acético, já que este tem efeito antimicrobiano na forma não ionizada (MUCK et al., 1991).

McDonald et al. (1991), numa compilação de vários trabalhos relataram que, em condições aeróbias, leveduras isoladas de diferentes silagens apresentaram ampla variedade de utilização de substratos, entre eles: lactato, acetato, citrato, malato, succinato e propionato. A degradação destes compostos e especificamente de ácido láctico, favoreceu a elevação do pH da silagem o que permitiu o crescimento de outros microrganismos oportunistas da fase aeróbia (McDONALD et al. 1991)

Muck e Kung (1997) realizaram compilação dos diferentes trabalhos com bactérias do ácido láctico entre os anos 1990 e 1995 realizados na América do Norte e

na Europa, porquanto se verificou que em 60% dos casos houve menor pH e maior fermentação láctica assim como menor produção de amônia, mostrando dessa forma melhor preservação da fração proteína nas silagens. A recuperação de matéria seca foi melhorada em 50% dos experimentos, sendo 6% maior em comparação com outros tratamentos, indicando redução na atividade microbiana indesejável na fase fermentativa.

Apesar disso, os mesmos autores alertaram que nem sempre existe um efeito da inoculação com este tipo de microrganismos, indicando que fatores das plantas como quantidade de bactérias ácido-láticas epifíticas, baixos conteúdos de carboidratos e elevado poder tampão e além da presença de bacteriófagos, poderiam afetar a atuação destas bactérias nas diferentes condições.

Devido aos efeitos potenciais das BAL na fase fermentativa e a ampla gama de cepas disponíveis no mercado, vêm se procurando efeitos combinados com outros aditivos microbianos e químicos, explorando desta forma as vantagens particulares para cada fase no processo de conservação.

2.2.1.3.2 *Lactobacillus plantarum* em silagens de cana-de-açúcar

Com o objetivo de diminuir os efeitos da alta população de leveduras em cana-de-açúcar, vem aumentando o interesse da pesquisa na área de aditivos microbianos, testando algumas bactérias já utilizadas em outras culturas como no caso de *Lactobacillus plantarum*, que é usada amplamente em silagens de milho, de sorgo e alfafa. Quando as bactérias ácido-láticas são inoculadas nas silagens, a sua alta população inicial apresenta algumas vantagens, pois aumenta a competição por substrato entre os microrganismos, inibindo desta forma o crescimento das leveduras em condições anaeróbias (FREITAS et al., 2006b). Além disso, permite controlar outros microrganismos deterioradores da fase fermentativa pelo rápido abaixamento do pH, com a possibilidade de obter silagens com melhor valor nutritivo (DRIEHUIS et al., 2001)

Na Tabela 3 observam-se os resultados de trabalhos realizados recentemente no Brasil com cana-de-açúcar ensilada com *Lactobacillus plantarum*. Entretanto, nenhum

dos ensaios apresentou efeito significativo na diminuição das perdas de matéria seca em comparação com os tratamentos sem nenhum aditivo. Cavali et al. (2006), embora tenham observado diminuição na produção de gases, não encontraram efeitos positivos tanto na produção de efluente, nem na perda total de matéria seca. A produção de etanol das silagens na maioria dos trabalhos foi maior com a inoculação desses microrganismos, sendo que somente o experimento realizado por Silva (2003), reportou benefícios com a aplicação desse aditivo. Em todo caso, Honig (1990) apud Higginbotham et al. (1998) indicaram que a inoculação com bactérias do ácido láctico poderia melhorar a estabilidade aeróbia das silagens, pela competição por substrato com leveduras, durante a fase fermentativa e após abertura dos silos.

Tabela 3 - Características bromatológicas e avaliação das perdas em silagens de cana-de-açúcar aditivada com *Lactobacillus plantarum*, reportadas por diferentes autores

Perda de MS	Produção de gases	Etanol	Ác. Láctico	Produção efluente	Dose	Fonte
----- % MS -----				(kg/ t MV)	(UFC/g MV)	
32,5	15,9	-	-	76,2	0	Siqueira et al. (2007a)
33,7	19,9	-	-	84,9	$1,5 \times 10^5$	
18,2	10,3 ^a	3,82 ^a	-	15,1 ^a	0	Pedroso et al. (2007)
21,5	14,8 ^b	12,5 ^b	-	29,9 ^b	$1,0 \times 10^6$	
17,9	18,9	-	-	50,9	0	Cavali et al. (2006)
19,6	15,8	-	-	53,8	DRF ¹	
-	-	17,4	2,4	-	0	Silva (2003)
-	-	14,6	1,6	-	10×10^9	
-	-	12,9 ^a	4,7	-	0	Castro neto (2003)
-	-	15,0 ^b	5,7	-	DRF	
31,1	-	17,8	4,3	-	0	Freitas et al.(2006a)
35,3	-	21,8	5,3	-	$1,0 \times 10^6$	
21,7	-	9,9	-	-	0	Freitas et al. (2006b)
27,5	-	15,6	-	-	$1,0 \times 10^6$	
28,0	-	14,2	-	-	$1,4 \times 10^6$	

Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05);

¹ DRF – dosagem recomendada pelo fabricante.

2.2.1.3.3 Aditivos químicos: benzoato de sódio na conservação de forragens

A utilização do benzoato de sódio pela indústria farmacêutica e de alimentos é conhecida há mais de 100 anos, sendo um dos aditivos químicos mais usados em diversos de produtos alimentícios devido ao efeito antifúngico (WOOFORD, 1975;

KREBS et al., 1983; JAY, 1992). Na área de alimentação animal, o uso do benzoato de sódio tem-se incrementado nos últimos anos, com o intuito de controlar o crescimento de microrganismos como leveduras e fungos, devido aos possíveis riscos por contaminação com micotoxinas.

Na conservação de forragens recentes trabalhos vêm sendo desenvolvidos com benzoato de sódio, determinando os efeitos que se obtém na fase fermentativa (WOOFORD, 1975; PEDROSO et al., 2007; BERNARDES et al., 2004; KLEINSCHMIT, et al., 2005; SIQUEIRA et al., 2007a, SCHMIDT et al., 2007a) e na estabilidade aeróbia da massa ensilada (LATTEMAE; LINGVALL, 1996; PEDROSO et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2007b).

O benzoato de sódio especificamente apresenta efeito antimicrobiano principalmente inibindo o crescimento da população de leveduras, em sua forma não dissociada (KREBS et al., 1983; PÖLÖNEN, 2000) (Figura 1). Dessa maneira o benzoato de sódio é permeável às membranas celulares desses microrganismos, facilitando a entrada de prótons na célula. Essa situação leva a diminuição do pH interno em mais de uma unidade (KREBS et al., 1983), resultando em maior gasto de energia das leveduras para manter o pH interno da célula, restringindo o seu crescimento (PÖLÖNEN, 2000).

Figura 1 - Representação esquemática da ação anti-microbiana do benzoato de sódio na forma não dissociada (PÖLÖNEN, 2000)

O efeito antimicrobiano do benzoato de sódio é afetado principalmente pelo valor de pH do meio, já que a porcentagem da forma não dissociada é determinada pelo valor do pKa (4,2) do ácido benzóico (Figura 2). Dessa forma, observa-se maior atividade antimicrobiana do benzoato de sódio em pH mais baixo (WOOFORD, 1975; McDONALD et al., 1991; PÖLÖNEN, 2000).

Figura 2 - Porcentagem molecular de ácido benzóico e do ácido fórmico na forma não dissociada em diferentes pH (adaptado de PÖLÖNEN, 2000)

Wooford (1975) avaliaram diferentes aditivos com potencial antimicrobiano para silagens e observaram controle mais efetivo das leveduras, clostrídios e fungos filamentosos utilizando a dosagem de 260 g/t em pH inferior a quatro. Não obstante, para pH maior que cinco foram necessárias altas dosagens de benzoato de sódio (7,2 kg/t) para controlar o crescimento dos mesmos microrganismos mencionados. Pedroso et al. (2007) determinaram o efeito de vários aditivos químicos e microbianos sob o padrão fermentativo em silagens de cana-de-açúcar e observaram que a adição de benzoato de sódio nas silagens não reduziu a concentração de etanol e as perdas totais de matéria seca, embora tivessem encontrado menor teor de FDN e maior digestibilidade em comparação com o tratamento controle. Nesse experimento foi observado efeito crescente na estabilidade aeróbia com o aumento da concentração de benzoato de sódio na silagem, obtendo os melhores resultados na dosagem de 0,2% da MV. Em outro experimento realizado pelo mesmo autor com cana-de-açúcar ensilada aos 12 meses e após 94 dias de fermentação, observou-se que a aplicação de

benzoato de sódio na dosagem de 0,1% da MV, reduziu a população de leveduras, além de resultar em menor produção de etanol e menor consumo dos carboidratos na fase fermentativa (PEDROSO, 2003). Utilizando a dosagem de 0,1% da MV, Siqueira et al. (2007b) verificaram redução nas perdas totais de matéria seca e menor consumo dos carboidratos solúveis na fase fermentativa, quando comparada com as silagens sem aditivos. Nesse experimento os autores mostram que nessa dosagem o benzoato de sódio também apresentou efeitos benéficos sobre a estabilidade aeróbia das silagens. Schmidt et al. (2007a), trabalhando com cana-de-açúcar ensilada aos 12 meses de idade, observaram maior preservação da fração de carboidratos solúveis com a adição de 0,1% na MV de benzoato de sódio, acompanhados de maiores valores de digestibilidade, após 90 dias de fermentação em silos tipo poço. Siqueira (2005) destacou a possibilidade da combinação do benzoato de sódio a aditivos microbianos como *Lactobacillus buchneri*, uma vez que obteve menores perdas de matéria seca e perdas por gás.

Em conjunto estes resultados encontrados motivaram a realização de novas pesquisas que pudessem esclarecer com maior detalhe os efeitos da associação dos aditivos químicos e microbianos, nas diferentes fases do processo de conservação e no controle da população de leveduras em silagens de cana-de-açúcar.

2.2.2 Material e métodos

2.2.2.1 Local do experimento

O presente estudo foi realizado no Departamento de Zootecnia, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” USP/ESALQ, em Piracicaba – SP.

2.2.2.2 Silos experimentais e confecção da silagem

A variedade de cana-de-açúcar usada para a confecção das silagens experimentais foi RB 72-454, colhida no mês de Setembro de 2006 com 12 meses de crescimento fisiológico, com valor médio de 22 graus brix e 30% de MS. O material foi

cortado por meio de colhedora acoplada ao trator e regulada para tamanho de partícula médio de 1 cm.

Os silos experimentais (unidades experimentais) foram preparados utilizando-se recipientes plásticos com capacidade para 20 litros, com tampas próprias para vedação e adaptadas com válvulas do tipo *Bunsen*, para a saída dos gases durante a ensilagem.

No fundo de cada balde foram acondicionados 2,5 kg de areia previamente seca em estufa por 72 h, sendo que no momento da ensilagem esta foi separada da forragem por uma tela fina de plástico e duas camadas de tecido de algodão, com o objetivo de permitir a mensuração de efluentes produzidos na fermentação.

A massa ensilada foi compactada em camadas de cinco a dez centímetros de espessura, buscando-se atingir a mesma quantidade de forragem em cada balde, até atingir uma densidade aproximada de 500 kg/m³. Após o enchimento, estes foram pesados e vedados com fita adesiva para o impedimento da entrada de ar, sendo mantidos em local coberto e sob temperatura ambiente por 90 dias.

2.2.2.3 Tratamentos e aplicação dos aditivos

Após ter sido picada, a forragem foram inoculadas com as cepas de *Lactobacillus plantarum* (Lact) isoladamente ou aplicado em conjunto às bactérias ácido lácticas *Streptococcus faecium* e *Pediococcus acidilactici* (BAL). O aditivo químico utilizado foi o benzoato de sódio, sob doses crescentes de aplicação (Tabela 4).

Tabela 4 - Composição dos tratamentos aplicados

Tratamentos	Aditivo microbiano (UFC/g MV)	Aditivo químico (g/t MV)
A. Controle	-	-
B. <i>L. plantarum</i> ¹	5,0 x 10 ⁴	-
C. BAL ^{1,2}	5,0 x 10 ⁴	-
D. <i>L. plantarum</i> /Benzoato 0,050%	5,0 x 10 ⁴	500
E. <i>L. plantarum</i> /Benzoato 0,012%	5,0 x 10 ⁴	125
F. BAL/Benzoato 0,01%	3,6 x 10 ⁴	125

¹Produto fabricado por Alltech® Biotechnology.

²*L. plantarum*, *S. faecium* e *P. acidilactici*

Os aditivos químicos foram aplicados na forma de soluções aquosas, numa diluição de volume de 12,5 litros de água por tonelada de cana fresca, sendo distribuídos por meio de pulverizadores manuais de 5 litros. Os inoculantes microbianos foram adicionados a massa ensilada usando-se pulverizadores com capacidade de 500 mL, procurando-se obter em todos os tratamentos distribuição uniforme dos produtos na massa de forragem.

2.2.2.4 Avaliação das perdas durante o período de estocagem

Após 90 dias de fermentação, os silos experimentais foram pesados para realização dos posteriores cálculos das perdas no processo de conservação. Após a pesagem, todos os silos foram abertos todos, coletando-se uma alíquota de forragem no centro geométrico dos baldes para determinação do valor nutritivo e perfil fermentativo das silagens de cana-de-açúcar.

2.2.2.4.1 Determinação da produção de efluente

A determinação da produção de efluentes foi realizada mediante o cálculo da diferença de peso do conjunto (balde + tampa + areia + tela + tecido de algodão) no momento da ensilagem e na abertura dos silos experimentais. A produção de efluente foi avaliada como a produção relativa com respeito à massa de forragem no momento da ensilagem, expressa em kg/t de MV. O cálculo foi estimado conforme a equação (1) modificada por Schmidt (2006):

$$PE = \frac{(Pab - Pen)}{(MVfe)} \times 1000 \quad (1)$$

Onde:

E = produção de efluente (Kg/t de massa verde);

P_{ab} = peso do conjunto (balde + tampa + areia + tela + tecido de algodão) na abertura (kg);

P_{en} = peso do conjunto (balde + tampa + areia + tela + tecido de algodão) na ensilagem (kg);

MV_{fe} = massa verde de forragem ensilada (kg).

2.2.2.4.2 Estimativa das perdas por gases

A perda por gases foi calculada pela diferença entre o peso do balde após o fechamento e imediatamente antes da abertura dos silos experimentais. Cálculos realizados com relação à quantidade de MS ensilada. Além disso, nesta operação foi descontado o peso do conjunto silo e areia seca, conforme a equação (2) modificada por Schmidt (2006):

$$PG = \frac{[(PC_{en} - P_{en}) \times MS_{en}] - [(PC_{ab} - P_{en}) \times MS_{ab}]}{(PC_{en} - P_{en}) \times MS_{en}} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

PG = perda por gases (% MS);

PC_{en} = peso do balde cheio na ensilagem (kg);

P_{en} = peso do conjunto (balde + tampa + areia + tela + tecido de algodão) na ensilagem (kg);

MS_{en} = teor de matéria seca da forragem na ensilagem (%);

PC_{ab} = peso do balde cheio na abertura (kg);

MS_{ab} = teor de matéria seca da forragem na abertura (%).

2.2.2.4.3 Determinação da perda total de matéria seca

A perda total de matéria seca foi estimada pela diferença entre a quantidade de material (%MS) que foi recuperada na abertura, em relação à quantidade que foi ensilada. Para este cálculo foram utilizados os pesos dos silos experimentais na ensilagem e na abertura, onde a forragem recuperada foi obtida descontando-se toda a massa de efluente produzido, durante o período de armazenamento. Para este cálculo foi utilizada a equação (3) modificada por Schmidt (2006), onde as perdas de matéria seca são expressas em porcentagem:

$$PMS = \frac{[(PCen - Pen) \times MSen] - [(PCab - Pab) \times MSab]}{(PCen - Pen) \times MSen} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

PMS = perda total de matéria seca (%);

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

Pen = peso do conjunto (balde + tampa + areia + tela + tecido de algodão) na ensilagem (kg);

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

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

Pab = peso do conjunto (balde + tampa + areia + tela + tecido de algodão) na abertura (kg);

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

2.2.2.5 Amostragens

2.2.2.5.1 Amostragens durante ensilagem

A cana-de-açúcar foi amostrada no momento da ensilagem para a determinação da composição químico-bromatológica. Para isso foram colhidas três amostras de

forragem para cada tratamento, em diferentes pontos da massa ensilada, para se obter melhor representatividade da massa.

Uma amostra de 500g aproximadamente foi acondicionada em saco de papel para secagem em estufa de ventilação forçada a 55°C. Uma segunda amostra de 100 g aproximadamente foi armazenada em saco plástico e congelada imediatamente, para posterior processamento para obtenção do extrato aquoso.

A composição químico-bromatológica da cana-de-açúcar ensilada neste experimento é apresentada na Tabela 5 e 6.

2.2.2.5.2 Amostragens na abertura dos silos experimentais

Após a abertura dos silos experimentais, a camada superior de silagem (cerca de 10 cm) foi descartada para diminuir a possibilidade de erros na interpretação dos resultados, já que poderia coletar-se forragem deteriorada com características bromatológicas pontuais.

Uma vez que o material foi homogeneizado, foram retiradas duas amostras de forragem para cada tratamento. Uma amostra de 500g aproximadamente foi acondicionada em saco de papel para secagem em estufa de ventilação forçada a 55 °C. Outra amostra de 100g aproximadamente foi armazenada em saco plástico para ser congelada para posterior processamento para obtenção do extrato aquoso da silagem.

2.2.2.6 Análises químico-bromatológicas

As análises foram realizadas no Laboratório de Bromatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” USP-ESALQ, em Piracicaba/SP.

2.2.2.6.1 Amostras secas em estufa

As amostras de cana-de-açúcar obtidas tanto no momento da ensilagem como da abertura, foram secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 horas (SILVA,

1981), sendo posteriormente moídas provido de peneiras com orifícios de 1mm, em moinho de tipo Wiley.

Para determinação da composição bromatológica do material, foi utilizado o método de espectroscopia de refletância de infravermelho proximal (NIRS) (BERZAGHI et al., 1997; COZZOLINO et al., 2001), onde após a moagem o material foi escaneado para obtenção dos espectros NIRS. O equipamento utilizado foi o espectrômetro modelo NIRS 5000 (*NIRSystems*[®], Silver Spring, MD, USA) acoplado a um microcomputador equipado com software WinISI II versão 6.2 (*Intrasoft International, PA*). As amostras foram escaneadas entre os comprimentos de onda de 700 a 2100 nm e os espectros foram armazenados em curvas log (1/R, onde R é o valor da refletância), em intervalo de 2 nm. Utilizaram-se os métodos de seleção de amostras existentes no software do equipamento e foram descartadas as amostras distantes mais de 3 H (distancia padronizada de *Mahalanobis*) de média, e essas foram consideradas como *outliers*. Adotou-se a distancia mínima de 0,6 H entre amostras para seleção daquelas em que seriam efetuadas as análises bromatológicas convencionais.

Para determinar o teor de matéria seca da forragem, as amostras moídas foram secas em estufa a 105 °C durante 24 horas (AOAC, 1990). A matéria mineral foi obtida com a incineração das amostras em forno tipo mufla a 550°C por 3 horas (AOAC, 1990).

O teor de proteína bruta foi obtido por meio de combustão da amostra conforme o método Dumas, utilizando-se o equipamento LECO[®], modelo FP-528 (*Leco Corporation, Michigan, USA*).

Os teores de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) e de fibra insolúvel em detergente ácido (FDA) foram obtidos com base no do método seqüencial proposto pela ANKOM *Fiber Analyser* (ANKOM[®] Technology Corporation, Fairport, NY), descrito por Holden (1999).

Com os resultados das análises bromatológicas convencionais, estes valores foram inseridos no banco de dados do NIRS, para posterior estimação dos valores das demais amostras, por meio de equações de predição criadas com base em métodos estatísticos propostos pelo programa.

2.2.2.6.2 Amostras de forragem fresca

Para a realização do extrato aquoso, uma vez que as amostras foram descongeladas, 25 g de forragem foram adicionados a 225 mL de água deionizada e posteriormente processados em liquidificador industrial durante um minuto. O material foi então filtrado, sendo determinado o valor de pH no extrato por meio de um potenciômetro digital (DIGMED® - DM 20). O extrato remanescente foi filtrado em papel *Whatman*® 54, sendo adicionadas três gotas de ácido sulfúrico 50% para centrifugação durante 15 minutos a 8.000 x g. Após a centrifugação, os extratos foram pipetados e colocados em tubos plásticos com capacidade de 1,5 mL, sendo armazenados desta forma no congelador a -20 °C de temperatura (KUNG Jr., 1996).

Para determinação do teor de carboidratos solúveis das amostras, utilizou-se o método descrito por (DUBOIS et al., 1956) por medido de espectrofotometria com leitura em 490 nm. Devido ao elevado teor de carboidratos solúveis da cana-de-açúcar procedeu-se à maior diluição das amostras para serem obtidas leituras consistentes.

O teor de ácido láctico foi obtido por meio do método espectrofotométrico (565 nm), proposto por Pryce (1969). Foi necessário adequação da curva padrão 10 vezes maior que a sugerida, já que a alíquota de amostra a ser utilizada foi muito reduzida.

Os ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico, butírico e valérico) foram determinados segundo a metodologia descrita por Campos; Nussio e Nussio (2004) em cromatógrafo líquido-gasoso, CLG (*Hewlett Packard*® 5890 series II), equipado em braço mecânico HP Integrator 3396 série (*Hewlett Packard Company*®). O gás de arraste e os comburentes foram nitrogênio, hidrogênio e oxigênio, respectivamente, nas vazões de 20, 30 e 400 mL/min. As temperaturas de injetor e da coluna foram 150, 190 e 115°C, respectivamente.

Para a determinação utilizou-se 800 µL de extrato da silagem acondicionado em frasco apropriado, juntamente com 200 µL de ácido fórmico e 100uL de padrão interno. O teor de etanol foi determinado por meio do auto-analizador *YSI 2700 Select*® (*Biochemistry Analyser*®, Yellow Spring, OH, USA), calibrado com soluções padronizadas de etanol (2g/L).

Para avaliar do poder tampão da cana-de-açúcar antes da silagem, foi utilizada a metodologia proposta por Playne e McDonald (1966). Para o cálculo, o pH original do extrato foi ajustado com ácido (0,1N) para o valor de 3,0. Posteriormente, o pH foi elevado para valores ao redor de 4,0 com hidróxido de sódio (0,1 N), sendo que para o cálculo foi estimado a quantidade de hidróxido de sódio gasto, para elevar os valores de pH a 6,0. O poder tampão foi expresso como equivalente em miligrama da base necessário para elevar o pH do extrato de 4,0 para 6,0 por 100g de matéria seca.

Para a contagem da população de leveduras, amostras frescas para cada tratamento foram encaminhadas para o laboratório de microbiologia *AVIPA Ltda.*, para posterior exame micológico e contagem deste microrganismo por grama de silagem.

Após a obtenção dos valores de poder tampão, carboidratos solúveis e matéria seca das amostras de cana-de-açúcar *in natura*, foi possível calcular a capacidade de fermentação dessas fontes de forragem, para posterior aplicação dos diferentes tratamentos. Segundo Weissbach e Honig (1996) apud Oude Elferink et al. (2000), o coeficiente de fermentação (CF) é diretamente proporcional aos teores de matéria seca e de carboidratos solúveis, sendo afetado negativamente pelo poder tampão das silagens. Este foi calculado de acordo com a equação (4):

$$CF = MS + 8 \times \left(\frac{CS}{PT} \right) \quad (4)$$

Onde:

CF = coeficiente de fermentação (%);

MS = teor de matéria seca (%);

CS = teor de carboidratos solúveis (%MS);

PT = poder tampão (mEq./100g MS).

2.2.2.7 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos e quatro repetições para cada. Para a análise de variância foi usado o procedimento PROC GLM do programa estatístico SAS[®], versão 9,0 para Windows[®]

(SAS, 1999). Para permitir as comparações da composição bromatológica e as perdas no processo de conservação das silagens submetidas aos tratamentos, foram utilizados os seguintes contrastes ortogonais: 1) Efeito do benzoato de sódio (B vs D, E); 2) Efeito da dosagem do benzoato de sódio (D vs E, F); 3) Efeito das BAL entre a inoculação de *L. plantarum* (B vs C, F). Para estes contrastes foram avaliados os níveis de significância de 1, 5 e 10%, sendo que para avaliar a comparação de medias foi aplicado o teste de *Tukey*, com nível de significância a 5%. O modelo estatístico para a avaliação da silagem foi seguinte:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

em que:

Y_{ij} = observação referente ao tratamento i, na repetição j.

μ = média geral

t_i = efeito do tratamento i, = 1,...6.

e_{ij} = erro experimental associado a todas as observações

2.2.3 Resultados e Discussão

2.2.3.1 Caracterização da cana-de-açúcar utilizada durante as ensilagens

Estudos realizados com a variedade de cana-de-açúcar RB 72-454 demonstraram que as características de alta produtividade agrícola e elevado acúmulo de açúcares, permitiram posicionar rapidamente esta variedade entre as mais cultivadas no Brasil, tanto para fins na produção de álcool como de fonte volumoso na alimentação animal (FREITAS et al., 2006a; MURARO, 2007).

Na Tabela 5 pode ser observada a composição químico-bromatológica da cana-de-açúcar utilizada nos diferentes tratamentos estabelecidos neste experimento. Os valores de FDN, FDA e lignina, encontrados para este experimento se assemelham aos

resultados encontrados na literatura. Andrade et al. (2003) avaliaram diversas variedades de cana-de-açúcar, colhidas com a mesma idade (12 meses) e encontraram valor médio de FDN de 48,1%, variando entre 35,7% e 56,2% e de FDA de 29,0%, variando entre 21,1% e 34,6%. Oliveira et al. (1999), avaliando duas variedades de cana-de-açúcar para conservação, obtiveram para a variedade RB 72-454 valor de FDN de 40,8% e de FDA de 25,5%. Santos et al. (2006), comparando o valor nutritivo da cana-de-açúcar em duas idades, reportaram valor de 48,6% de FDN e 26,4% de FDA para a cana-de-açúcar com 11 meses de idade. Bem como, Rodriguez et al. (2006) avaliando alguns compostos da parede celular para esta mesma variedade, observaram valor médio de 45,8% de FDN e 3,27% de lignina.

Valores superiores nos compostos da parede celular podem ser encontrados nesta variedade quando analisada em estádios precoces de crescimento ou em cultivares que apresentaram amadurecimento tardio, com baixas taxas de acúmulo de sacarose. Este efeito foi observado por Ferreira et al. (2007) que avaliaram cana-de-açúcar de 7 meses de idade e reportaram valor médio de 55,27% da FDN e 32,4% de FDA. Freitas et al. (2006b), avaliando cana-de-açúcar com 11 meses de idade também encontraram valor superior de FDN de 55,46% e 6,1% de lignina. Outros trabalhos encontrados na literatura relatam este mesmo efeito na variedade RB 72-454 (MURARO, 2007; LOPES, 2006; SANTOS, 2007; QUEIROZ, 2006).

Por outro lado, o teor médio de matéria seca da cana-de-açúcar utilizada para este experimento foi semelhante ao relatado por diversos autores trabalhando com a variedade da cana-de-açúcar RB 72-454. Queiroz (2006) obteve valores médios de 30% de matéria seca no momento da ensilagem de cana-de-açúcar colhida aos 12 meses. Rodriguez et al. (2006) determinando o valor nutritivo de nove variedades de cana-de-açúcar, obtiveram para esta a variedade valor médio de 30,38% de matéria seca. Santos et al. (2006) reportaram para cana-de-açúcar colhida aos 11 meses teor de matéria seca de 29,29%. Azevedo et al. (2003), avaliando 15 variedades diferentes de cana-de-açúcar, observaram teores de matéria seca variando entre 23,1% a 28,7% com 14 meses de idade.

Em todo caso, o teor de matéria seca da cana-de-açúcar é influenciado pela idade de corte, sendo observado aumento com o avanço do ciclo produtivo (SANTOS et

al., 2006). Além disso, outras variáveis podem alterar a participação da água na planta, entre os quais se podem destacar a época de colheita do material, o acúmulo tardio de sacarose e outros fatores ambientais como a precipitação (MURARO, 2007).

Tabela 5 - Composição químico-bromatológica da cana-de-açúcar (RB 72-454) utilizada em cada tratamento experimental

Tratamentos	MS %	CHO'S -----	PB	FDN % MS	LIG -----	FDA	Cinzas	DVIVMS %
A. Controle	28,45	28,5	4,40	43,9	5,0	32,1	3,99	58,7
B. <i>L. plantarum</i> ¹	28,65	27,0	4,37	42,7	4,8	30,6	3,80	59,6
C. BAL ¹²	28,25	27,0	4,39	43,0	4,7	29,9	3,87	59,3
D. Lact/Benzoato 0,05%	30,50	22,1	4,26	42,5	4,9	31,0	3,95	59,9
E. Lact/Benzoato 0,01%	28,65	25,1	4,44	44,1	5,1	31,4	4,00	58,3
F. BAL/Benzoato 0,01%	29,25	24,9	4,34	45,2	5,1	32,2	4,04	58,5
Média	29,0	25,8	4,4	43,6	4,9	31,2	3,9	59,1
C.V (%)	2,8	8,6	1,43	2,4	3,1	2,7	2,3	1,0

PB=proteína bruta; FDN=fibra em detergente neutro; LIG=lignina; FDA=fibra em detergente ácido; CHO'S=carboidratos solúveis; MS= matéria seca; DVIVMS=digestibilidade verdadeira *in vitro* da MS; ¹Produto fabricado por Alltech® Biotechnology; ²*L. plantarum*, *S. faecium* e *P. acidilactici*.

O conteúdo de carboidratos solúveis atingido pela cana-de-açúcar neste experimento (Tabela 5), aproximou-se aos valores relatados por Queiroz (2006) que, para esta mesma variedade colhida com 12 meses de crescimento fisiológico reportou valor de 22,7% de carboidratos solúveis no momento da ensilagem.

Nesse sentido, Ferreira et al. (2007) avaliando a variedade de cana-de-açúcar RB 72-454 aos 7 meses de idade, encontraram valor de carboidratos solúveis de 21,4%. Santos (2007), trabalhando com a mesma variedade colhida aos 14 meses, observou teores de carboidratos solúveis variando entre 16,9% a 28,8%. Pedroso (2003) analisando a dinâmica da fermentação da cana-de-açúcar da variedade RB 83-5486 e colhida aos 12 meses, reportou teor de 23,0% de carboidratos solúveis, sendo todos estes valores semelhantes aos encontrados no presente experimento.

Em relação aos valores de proteína bruta da cana-de-açúcar utilizada em este experimento, observaram-se resultados similares aos obtidos por Santos et al. (2006). Nesse trabalho os autores reportaram valor de proteína bruta de 4,08% para a variedade RB 72-454 colhida com 11 meses de idade. Da mesma forma, Lopes (2006)

avaliou esta mesma variedade de cana-de-açúcar encontrou valor de 4,01% de proteína bruta.

Todavia os valores de digestibilidade da cana-de-açúcar encontrados na presente avaliação apresentam-se próximos aos publicados na literatura (Tabela 5). Pedroso et al. (2007), avaliaram a digestibilidade desse volumoso e observaram valores na amplitude de 48,8% a 56,4% aos 12 meses de idade. Santos (2007), avaliando aditivos químicos para cana-de-açúcar, verificou valores médios de digestibilidade de 59% para o tratamento sem aditivos. No entanto, neste mesmo experimento observou-se maior digestibilidade (67,9%) com a aplicação de 1,5% de óxido de cálcio.

Tabela 6 - Características químico-bromatológicas, capacidade fermentativa e população de leveduras da cana-de-açúcar no momento da ensilagem

Tratamentos	pH	PT	CF	FDN/ CHO'S	Leveduras (UFC/g)
A. Controle	5,44	6,854	61,76	1,54	$1,8 \times 10^5$
B. <i>L. plantarum</i> ¹	5,40	6,806	60,35	1,58	$5,0 \times 10^5$
C. BAL ¹²	5,27	6,903	59,49	1,59	$9,0 \times 10^5$
D. Lact/Benzoato 0,05%	5,41	5,738	61,34	1,92	$1,5 \times 10^6$
E. Lact/Benzoato 0,01%	5,42	5,585	64,61	1,76	$5,0 \times 10^6$
F. BAL/Benzoato 0,01%	5,40	5,470	65,70	1,82	$6,0 \times 10^5$

PT=poder tampão (N°.e.mg HCl/100 de MS); CF=capacidade de fermentação; FDN=fibra em detergente neutro; CHO'S=carboidratos solúveis.

¹Produto fabricado por Alltech® Biotechnology; ²*L. plantarum*, *S. faecium* e *P. acidilactici*.

Na Tabela 6 estão expressos os resultados do poder tampão, capacidade de fermentação, pH e contagem de leveduras. Sendo que a interação entre estas variáveis indicam a possibilidade da forragem utilizada apresentar fermentação desejável.

Em relação a contagem de leveduras epifíticas quantificadas para o presente experimento (Tabela 6), esta apresentou valores similares aos reportados por Alli et al. (1983) que, avaliando as características microbiológicas da cana-de-açúcar da variedade B41227 observaram alta contagem de leveduras com 1×10^6 UFC/g.

Outra característica avaliada foi o poder tampão, sendo que este representa a capacidade da forragem em resistir à variação do pH pelos ácidos produzidos durante a fermentação, efeito considerado como indesejável para a obtenção de silagens com rápido abaixamento de pH. Segundo McDonald et al. (1991) o poder tampão é influenciado pelos ânions (sais de ácidos orgânicos, ortofosfatos, sulfatos, nitratos e cloretos) e pela fração protéica (20%). Estudos realizados em cana-de-açúcar têm apresentado baixos valores de poder tampão em comparação com outras culturas, devido principalmente ao baixo conteúdo de proteína bruta e ao alto teor de carboidratos solúveis (LIMA et al., 2002).

Os valores de poder tampão observados na cana-de-açúcar utilizada neste experimento estiveram dentro da amplitude de 5,4 a 6,9 e.mg HCl/100 de MS. Siqueira et al. (2007b) evidenciaram valores similares para cana-de-açúcar com teor de proteína bruta de 1,5%, reportando valor de 7,0 e.mg HCl/100 de MS. Santos (2007), reportou para cana-de-açúcar com 2,85% de proteína bruta valor de poder tampão de 10,04 e.mg HCl/100 de MS. Lopes (2006) observaram baixo poder tampão (1,95 e.mg HCl/100 de MS) para cana-de-açúcar com 4,05% de proteína bruta.

Uma vez obtidos os valores de poder tampão, foi possível calcular capacidade fermentativa da cana-de-açúcar utilizada neste experimento. Em todo caso, foram observados valores superiores para esta variável em comparação com os encontrados na literatura. Siqueira (2005) sumariou conjunto de resultados de Bernardes et al. (2002) e Pedroso (2003) e reportou coeficiente de fermentação médio de 56. Além disso, Santos (2007) observou coeficiente de fermentação variando entre 39,5 a 52,85 para os diferentes tratamentos para cana-de-açúcar colhida com 18 meses de idade. De acordo com Weissbach e Honig apud Oude Eleferink et al. (2000), forragens com baixos teores de carboidratos solúveis ou alta umidade apresentam coeficiente de fermentação menor que 35. Diante desse fato, a cana-de-açúcar usada para a confecção dos silos apresentou quantidade suficiente de substrato para a ocorrência de processo fermentativo satisfatório.

Por último, vem sendo utilizada na avaliação do valor nutritivo da cana-de-açúcar a relação entre o valor dos teores de FDN e de carboidratos solúveis (FDN/ CHO'S) (FREITAS et al., 2006a), uma vez que esta relação poderia apontar as limitações

quanto ao consumo voluntário pelos animais. Além disso, com a menor relação entre os teores de FDN e carboidratos solúveis da cana-de-açúcar, poderia esperar-se maior quantidade de energia disponível quando oferecida aos animais. Os resultados obtidos neste experimento podem ser considerados adequados, concordando com os resultados relatados por Freitas et al. (2006a) que obteve relação de 1,37 na avaliação da variedade de cana-de-açúcar RB 72-454.

2.2.3.2 Avaliação das perdas durante o processo de conservação

O estudo das perdas no processo fermentativo vem sendo utilizado na avaliação de silagens de cana-de-açúcar para quantificar o impacto da fermentação tipicamente alcoólica desta cultura e estimar também a eficiência dos aditivos no processo de conservação. Estas perdas fermentativas surgem principalmente da atividade microbiana e dos processos bioquímicos que prevalecem durante a fermentação e do tipo de microrganismo envolvido (McDONALD et al., 1991).

Na tabela 7 são apresentadas às perdas do processo fermentativo na cana-de-açúcar tratada com diferentes aditivos químicos e microbianos. Como pode ser observado, o tratamento com *L.plantarum* associado ao benzoato de sódio na dosagem alta (0,05%), apresentou as maiores perdas totais e perdas por gases ($P<0,05$).

Tabela 7 - Perdas ocorridas durante o processo fermentativo da cana-de-açúcar tratada com aditivos químicos e microbianos

Tratamentos ¹	Perda total de MS	Perda de gases %	Recuperação de MS	Produção efluente (kg/ t MV)
A. Controle	15,7 ^b	11,2 ^b	84,3 ^a	49,7 ^a
B. <i>L. plantarum</i>	18,4 ^b	14,2 ^b	81,6 ^a	48,0 ^{ab}
C. BAL ^{3,4}	18,9 ^b	14,8 ^b	81,1 ^a	46,5 ^{abc}
D. Lact/Benzoato 0,05% ²	23,5 ^a	19,9 ^a	76,5 ^b	43,7 ^{bc}
E. Lact/Benzoato 0,01% ²	19,0 ^b	14,8 ^b	81,0 ^a	47,3 ^{ab}
F. BAL/Benzoato 0,01% ²	18,8 ^b	15,1 ^b	81,2 ^a	41,9 ^c
<i>Média</i>	<i>19,1</i>	<i>15,0</i>	<i>81,0</i>	<i>46,2</i>
<i>C.V (%)</i>	<i>9,6</i>	<i>13,2</i>	<i>2,2</i>	<i>5,1</i>

¹Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

²As doses dos aditivos estão expressas em com base na matéria verde.

³Produto fabricado por Alltech® Biotechnology; ⁴*L. plantarum*, *S. faecium* e *P. acidilactici*.

De acordo com a tabela 7, silagens aditivadas com *L.plantarum* e BAL isoladamente apresentaram perdas de matéria seca e produção de gases similares ao tratamento controle. Além disso, quando avaliado o efeito da associação das BAL ao benzoato de sódio, não se observaram benefícios com relação às perdas totais e perdas por gases, já que estas foram semelhantes às obtidas no tratamento controle. As silagens tratadas com benzoato de sódio na dosagem baixa (0,01%) associado a os aditivos microbianos BAL ou *L.plantarum* não apresentaram diferenças significativas nas perdas totais e produção de gases com o tratamento controle. Também, deve-se ressaltar que as maiores perdas de MS encontradas neste experimento foram observadas para o tratamento da associação de *L. plantarum* e benzoato de sódio (0,05% da MV), sendo que este mesmo tratamento apresentou a das maiores contagens de leveduras para este experimento ($1,5 \times 10^6$ UFC/g).

Os resultados obtidos na associação dos aditivos químicos e microbianos usados neste experimento, concordam com os trabalhos encontrados na literatura. Freitas et al. (2006b) determinando o efeito de inoculantes bacterianos aplicados com resíduo de colheita de soja, encontraram maiores perdas de matéria seca (35,2% da MS) nos

tratamentos aditivados com *L. plantarum* ($1,2 \times 10^6$) em comparação com o tratamento sem aditivos (31,1% MS). Pedroso et al. (2007), avaliando aditivos químicos e microbianos no controle das perdas em silagens de cana-de-açúcar, não observaram diferença significativa na fase fermentativa nos tratamentos aditivados com *L. plantarum* ($1,0 \times 10^6$) e o benzoato de sódio em doses crescentes (0,05 – 0,2%MV), pois relataram perdas similares de matéria seca e por gases com o tratamento controle.

Por outro lado, Ranjit e Kung (2000) avaliando o efeito de aditivos microbianos na fase fermentativa e na estabilidade aeróbia em silagens de milho, tampouco observaram redução significativa de população de leveduras com a adição de *L. plantarum* ($1,0 \times 10^6$) em comparação com o tratamento controle.

Observando o efeito da associação dos aditivos em ensilagens de cana-de-açúcar. Siqueira et al. (2007b) encontraram menores perdas de matéria seca (25,2% da MS), avaliando o benzoato de sódio (0,1%MV) junto ao aditivo microbiano *L. plantarum* ($1,5 \times 10^5$), em comparação ao tratamento controle (32,5% da MS). Entretanto, naquele mesmo experimento não foram observadas diferenças significativas na associação destes aditivos com a aplicação isolada do aditivo benzoato de sódio. As perdas por gases foram superiores para o tratamento aditivado com *L. plantarum*, enquanto a aplicação de benzoato de sódio foram reduzidas as perdas de matéria seca e as perdas por gases, quando comparadas ao tratamento controle.

Em conjunto estes resultados indicam que a adição de inoculante contendo de *L. plantarum* exclusiva não oferece benefícios no controle do crescimento de leveduras, confirmando a hipótese de McDonald et al. (1991) que sugere que apenas a diminuição do pH não seria suficiente para restringir o crescimento destes microrganismos.

Com relação ao efeito do benzoato de sódio, Pedroso et al. (2007) observaram redução na concentração de etanol e menor população de leveduras, quando aplicaram 0,1% MV em silagens de cana-de-açúcar. No entanto, não foram relatadas diferenças nas perdas de matéria seca ou perdas por gases quando se comparou o uso de aditivos ao tratamento controle.

Todavia, os resultados obtidos na associação de aditivos propostos no presente experimento, ao apresentarem maiores perdas de MS, sugerem que nem o abaixamento do pH esperado pela inoculação com bactérias *L. plantarum*, nem o rápido

crescimento esperado das espécies *S. faecium* e *P. acidilactici* na parte inicial da fermentação (WEINBERG e MUCK, 1996), foram suficientes para garantir a ação do benzoato de sódio na fase fermentativa. Todavia, o efeito conjunto destes aditivos na etapa inicial da fermentação é de grande importância, já que nesta fase ocorre o maior crescimento da população de leveduras em silagens de cana-de-açúcar (PEDROSO et al., 2005). É importante ressaltar que durante esta fase inicial o pH do meio é superior ao pKa do ácido benzóico, diminuindo a chance de ação antimicrobiana do benzoato de sódio (WOOFORD, 1975; McDONALD et al., 1991; PÖLÖNEN, 2000).

Por outro lado, os valores encontrados de perdas de matéria seca e de perdas por gases para os diferentes tratamentos do presente experimento, são semelhantes aos relatados por Pedroso et al. (2007) e contrastam com a maioria dos experimentos realizados, que reportam perdas superiores em silagens de cana-de-açúcar. Schmidt (2006) estimou as perdas associadas à ensilagem de cana-de-açúcar sem aditivos e observou amplitude de 10,9% a 35,9% avaliando três variedades e três idades de colheitas diferentes, após 20 dias da ensilagem. Siqueira et al. (2007b) avaliaram o processo fermentativo em silagens de cana-de-açúcar e reportaram maiores valores de perdas de matéria seca (32,5%) e de perdas por gases (15,9%) em silagens de cana-de-açúcar com teor de MS de 35,2%. Freitas et al. (2006c) avaliaram o efeito de aditivos em cana-de-açúcar ensilada com 26,0% de MS e observaram perda de matéria seca de 21,6% para o tratamento controle. Queiroz (2006) reportou perdas de matéria seca de 31,4% e perdas por gases de 28,9%, em cana-de-açúcar ensilada com 30,0% de MS. Da mesma forma, Santos (2007) avaliou o efeito de aditivos químicos para cana-de-açúcar ensilada com 35% de MS e reportou elevadas perdas de matéria seca para o tratamento controle (34,3%) e perdas por gases (32,1%). Em todo caso, a ampla variação das perdas no processo fermentativo pode ser resultante de dinâmicas específicas entre as características bromatológicas da cana-de-açúcar no momento da ensilagem, a interação com a microflora epifítica e a metodologia de estimativa de perdas dos experimentos mencionados.

Nesse sentido, alguns trabalhos têm tentado correlacionar às perdas de matéria seca, com variáveis do processo de conservação. Pedroso et al. (2005) constaram os teores de etanol ($r=0,893$) e de carboidratos solúveis ($r= -0,958$) e as

perdas por gases ($r=0,986$), apresentam alta correlação com as perdas totais de matéria seca. Queiroz (2006) também corroborou a alta correlação das perdas por gases ($r=0,840$) e o teor de matéria seca ($r=-0,81$).

A produção de efluentes pelas gerada pelas silagens de cana-de-açúcar nos tratamentos aplicados neste experimento (Tabela 7), concordam com os valores encontrados por Schmidt (2006). Este autor avaliou a composição químico-bromatológica e as perdas fermentativas em silagens de cana-de-açúcar colhida com 32% de MS e obteve produção de efluente oscilando entre 45,2 e 55,6 kg/t MV.

Com relação aos tratamentos aditivados com *L.plantarum* mais benzoato de sódio (0,05%MV) e a adição das BAL mais benzoato de sódio (0,01%MV), foram observadas menores produções de efluente (43,7 e 41,9 kg/t MV, respectivamente) em comparação com o tratamento controle (49,7 kg/t MV). Este resultado pode atribuído ao fato destes tratamentos terem sido ensilados com maiores valores de matéria seca em comparação com o tratamento controle, confirmando a alta correlação de estas duas variáveis (WOOLFORD,1984).

Pedroso et al. (2007) estimaram valores inferiores aos encontrados no presente ensaio, já que observaram produção de efluente de 15,1 kg/t MV para cana-de-açúcar ensilada com 29,3 % de MS. No entanto, para os tratamentos com benzoato de sódio em doses crescentes (0,05 – 0,2%MV), observaram-se valores entre 22,8 a 26,9 kg/t MV e para o aditivo microbiano *L. plantarum* de 29,9 kg/t MV. Siqueira et al. (2007b) avaliaram a associação de benzoato de sódio ao aditivo microbiano (*L. plantarum* e *Propionibacterium*) em cana-de-açúcar ensilada com 35,3% da MS e reportaram elevada produção de efluente (98,4 kg/t MV), resultados que foram atribuídos ao baixo tamanho de partícula provocado pela intensa picagem do material nesse experimento, com possível dilaceramento das partículas no momento da compactação com auxílio de um objeto pontiagudo.

Contudo, vale mencionar que as variações na produção de efluente nos diferentes trabalhos consultados, podem obedecer a interação entre o teor de matéria seca no momento da ensilagem, ao grau de compactação do material ensilado e o pré-tratamento mecânico da silagem, além do tipo de aditivos utilizados na ensilagem como bactérias e enzimas fibrolíticas (LOURES, 2000).

2.2.3.3 Perfil fermentativo das silagens

Na tabela 8 são apresentados os resultados do perfil fermentativo das silagens de cana-de-açúcar inoculadas com aditivos químicos e microbianos. Não foram observadas diferenças significativas para a maioria das variáveis avaliadas, sendo que somente os valores de pH foram os que apresentaram diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

Os valores de pH para todos os tratamentos apresentaram-se próximos das recomendações de McDonald et al. (1991), as quais deveriam estar entre os valores de 3,6 – 4,2. Entretanto, é importante ressaltar que, isoladamente, o valor do pH não pode ser considerado como único critério na avaliação da fermentação, pois o efeito inibidor de microrganismos indesejáveis depende também da velocidade no seu declínio (WOOLFORD, 1984).

Tabela 8 - Perfil fermentativo das silagens cana-de-açúcar tratada com aditivos químicos e microbianos

Tratamentos ¹	pH	CHO'S	Ácido Lático	Etanol	Ácidos			N-NH ₃
					Acético	Propiônico	Butírico	
				----- % MS -----	----- %NT -----			
A. Controle	3,44 ^b	9,69	4,94	4,45	6,08	0,03	0,09	1,48
B. <i>L. plantarum</i>	3,43 ^b	9,58	5,02	4,43	5,93	0,07	0,11	2,37
C. BAL	3,44 ^b	9,79	5,46	4,73	6,10	0,08	0,12	1,56
D. Lact/Benzoato 0,05% ²	3,49 ^a	10,12	5,75	4,32	6,28	-	0,09	2,63
E. Lact/Benzoato 0,01% ²	3,48 ^a	8,88	4,91	3,90	4,64	0,04	0,09	1,74
F. BAL/Benzoato 0,01% ²	3,52 ^a	9,80	4,94	3,95	6,16	-	0,08	2,06
Média	3,47	9,64	5,17	4,30	5,87	0,06	0,10	1,97
C.V (%)	0,4	24,9	24,9	9,6	20,0	176,0	15,7	44,0

¹Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem entre se pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

²As doses dos aditivos estão expressas em com base na matéria verde.

CHO'S=carboidratos solúveis; MS= matéria seca; N-NH₃ = nitrogênio amoniacal, % do N total.

Ainda, segundo a tabela 8, o valor médio do pH obtido para os diferentes tratamentos, concorda com os estudos publicados na literatura para silagens de cana-de-açúcar (KUNG e STANLEY, 1982; SCHMIDT et al., 2007a; LOPES, 2006; FREITAS et al., 2006b; QUEIROZ, 2006; SANTOS, 2007; FERREIRA et al., 2007).

Os tratamentos que tiveram a adição de benzoato de sódio em diferentes doses, apresentaram maiores valores do pH em comparação com os outros tratamentos ($P < 0,05$). Entretanto, do ponto de vista biológico, estas diferenças não indicam isoladamente nenhuma alteração na qualidade das silagens, uma vez que esta variável não está associada necessariamente à redução nas perdas de matéria seca que ocorrem na fase fermentativa (SCHMIDT et al., 2007a).

Com relação à adição do inoculante microbiano *L. plantarum*, não foram observadas diferenças significativas em comparação ao tratamento controle, concordando com alguns dos trabalhos da literatura que testaram o efeito deste aditivo em silagens de cana-de-açúcar. Silva (2003), determinando a eficiência fermentativa da cana-de-açúcar ensilada com diferentes aditivos, reportou valor de pH de 3,6 para as silagens inoculadas com *L. plantarum* e *Streptococcus faecium*, sendo estes também próximos aos encontrados neste experimento. Siqueira et al. (2007b) avaliaram as perdas de silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e microbianos e observaram valor de pH 3,5 para o tratamento sem aditivos e valor de 3,6 para o tratamento da associação entre bactérias produtoras de ácido láctico ($1,5 \times 10^5$ UFC/g) e o benzoato de sódio (0,1%MV).

Dentro deste aspecto deve-se mencionar que o efeito esperado da inoculação com *L. plantarum* seria a obtenção de rápida diminuição do pH na fase inicial da fermentação (PEDROSO et al., 2007), além de oferecer menor valor final para estabilização do processo de fermentativo.

Com relação aos teores de carboidratos solúveis, etanol e ácidos orgânicos analisados na silagem de cana-de-açúcar no momento da abertura, estes vêm sendo utilizados pela comunidade científica para avaliar a dinâmica fermentativa e no caso do uso dos aditivos, determinarem a eficiência na preservação da composição bromatológica deste material ensilado. No entanto, no presente experimento que não foram observadas diferenças significativas nestas variáveis (Tabela 8), sugerindo que não houve alteração na fermentação para os tratamentos propostos. Por ser um dos compostos predominantes da fermentação de leveduras, a avaliação da concentração de etanol poderia estimar de forma indireta o desenvolvimento da população destes microrganismos. Este fato é de grande relevância em silagens de cana-de-açúcar, já

que quando apresentam valores elevados poderia se esperar aumento das perdas de matéria seca e possível rejeição pelos animais, como relatado no item 2.2.1.2.

Entretanto, vários trabalhos realizados com silagens de cana-de-açúcar reportaram valores de produção de etanol semelhantes aos encontrados neste experimento. Pedroso et al. (2007) determinaram os efeitos do tratamento com aditivos químicos e inoculantes bacterianos e observaram teor médio para todos os tratamentos de 4,23% da MS de etanol. Santos (2007) avaliou a dinâmica fermentativa da cana-de-açúcar com aditivos químicos e microbianos e relatou teor de etanol de 4,78% da MS para o tratamento sem aditivos. Schmidt (2006), avaliando aditivos químicos, reportou teor médio de etanol de 3,44% da MS para cana-de-açúcar colhida aos 12 meses de idade e armazenada por 120 dias. No entanto, valores superiores de etanol têm sido relatados em outros experimentos realizados com cana-de-açúcar (KUNG e STANLEY, 1982; FREITAS et al., 2006c; QUEIROZ, 2006).

Com relação à inoculação com *L. plantarum*, os resultados obtidos no presente experimento confirmam os dados encontrados na literatura, que não observaram benefícios quando a aplicação deste aditivo em silagens de cana-de-açúcar. Pedroso et al. (2007) avaliaram o efeito de vários aditivos químicos e microbianos após 180 dias de conservação e observaram maior teor de etanol para o tratamento *L. plantarum* (12,5% MS), em comparação com os outros tratamentos, incluso o controle (3,83% MS). Em contraste, foram obtidas os menores teores de etanol com adição de 0,1% da MV de benzoato de sódio (2,52%) e 0,03% da MV de sorbato de potássio (1,79%) e com o aditivo microbiano *L. buchneri* (1,95%).

No experimento conduzido pelos mesmos autores foi observada também redução de 6,06% no teor de carboidratos solúveis para o tratamento controle e 66,0% para o tratamento com a inoculação de *L. plantarum*. Entre os tratamentos que apresentaram maior habilidade para a conservação do teor carboidratos, foram destacados o benzoato de sódio (0,1% MV) e o sorbato de potássio (0,03% MV) (42,4% e 54,5%, respectivamente).

Por outro lado, Freitas et al. (2006b) avaliaram o valor nutricional da silagem de cana-de-açúcar com o aditivo microbiano *L. plantarum* e com enriquecimento com resíduo de soja e, não observaram diferenças significativas na recuperação dos

carboidratos solúveis para os diferentes tratamentos no momento da abertura dos silos. No entanto, o tratamento da adição de *L. plantarum* revelou os maiores teores de etanol (21,8% da MS), junto ao tratamento sem aditivos (17,8 % da MS), indicando uma intensa fermentação alcoólica nesse experimento, o que pode ser creditado, ao menos em parte a alta contagem de leveduras para os dois tratamentos (1×10^5 UFC/g).

Com relação à associação deste aditivo microbiano ao benzoato de sódio em doses crescentes, não houve nenhum tipo de diferença na fase fermentativa para os dados de padrão de fermentação. Estes resultados ratificam a afirmação de McDonald et al. (1991), de que apenas o abaixamento do pH não é suficiente para impedir o crescimento das leveduras e, no caso das bactérias *L. plantarum*, não foi suficientemente rápido para garantir a ação do benzoato de sódio na fase fermentativa.

Todavia, quando estas bactérias homoláticas dominam o processo fermentativo, espera-se obter silagens com baixo valor de pH, concentrações adequadas de ácido láctico e baixas dos ácidos acético e butírico, além de baixas quantidades de nitrogênio amoniacal (NH_3) na silagem (ROOKE et al., 1985). Os ácidos orgânicos produzidos contribuem para a diminuição do pH da silagem, sendo o ácido láctico na forma dissociada o responsável pela queda a valores inferiores de 4,2 (WOOLFORD, 1984). O teor de ácido láctico para os diferentes tratamentos, neste experimento (Tabela 8), manteve-se entre 4,91 e 5,75 % da MS, confirmando os valores reportados na literatura. Kung e Stanley (1982) avaliaram silagens de cana-de-açúcar colhida com 12 meses de idade e armazenada por 60 dias e observaram teor de ácido láctico de 5,65% da MS. Freitas et al. (2006) avaliando o tratamento da inoculação de *L. plantarum* em silagens de cana-de-açúcar e observaram teor de ácido láctico de 5,3% da MS, no entanto, não foram observadas diferenças significativas com relação ao tratamento controle (4,3% da MS).

O efeito esperado de aumento no teor de ácido láctico com inoculação de bactérias *L. plantarum*, não foi observado no presente experimento (Tabela 8), indicando que talvez a presença de bactérias ácido lácticas de origem epifítica na cana-de-açúcar foram suficiente para a obtenção de níveis adequados de ácido láctico na fase fermentativa para o tratamento controle, porém não foram observados benefícios adicionais na inoculação deste microrganismo.

Por outro lado, o teor médio de ácido acético no presente trabalho variou entre 4,64 a 6,28% da MS, sendo estes valores encontrados na literatura. Kung e Stanley (1982), trabalhando com cana-de-açúcar colhida aos 12 meses de idade, encontraram teor de ácido acético de 5,65 % da MS. Freitas et al. (2006b), avaliaram o perfil fermentativo da cana-de-açúcar inoculada com *L. plantarum* e também observaram valores similares de ácido acético (4,5% da MS). Silva (2003), testando bactérias homoláticas, observou teores de ácido acético variando entre 1,5 e 8,3 % da MS e não verificou benefício dos aditivos sobre as características fermentativas das silagens de cana-de-açúcar. Schmidt et al. (2007a), avaliaram o perfil fermentativo de cana-de-açúcar em diferentes idades de colheita e armazenada por 120 dias e observaram teor de ácido acético dentro da amplitude de 1,93 a 2,96 % da MS.

Segundo Woolford (1984), os ácidos láctico e acético produzidos pelas bactérias ácido lácticas inibem a atividade das bactérias esporuladas pelo abaixamento do pH, sendo que silagens de boa qualidade apresentam altas proporções de ácido láctico e mínima produção de ácidos butírico. Schmidt et al. (2007a) reportaram valores dos ácidos orgânicos propiônico (0,21% da MS) e butírico (0,05 % da MS) em silagens de cana-de-açúcar, similares aos encontrados neste experimento (Tabela 8) e que segundo Spörnlly (2003) são considerados característicos de silagens de boa qualidade.

Com relação à inoculação com bactérias homofermentativas, Winter e Kung Jr. (2001) relataram que o efeito benéfico na rápida diminuição do pH da silagem pode resultar em menor proteólise e deaminação, revelando em baixos níveis de nitrogênio amoniacal, sendo este expresso como porcentagem do nitrogênio total (%NT).

Para o presente experimento não se observaram diferenças significativas para níveis de NH_3 os diferentes tratamentos, com valores médios encontrados de 1,97% de N- NH_3 do %NT. Dessa forma, resultados similares aos obtidos neste experimento foram reportados por Schmidt et al. (2007a) que observaram valores entre 1,75 a 1,91 %NT, em silagens de cana-de-açúcar armazenada por 90 dias. Lopes (2006) avaliou os parâmetros fermentativos em silagem de cana-de-açúcar, após 180 dias de armazenamento e observou produção de nitrogênio amoniacal de 2,06 %NT, para o tratamento sem aditivos.

Não obstante, Freitas et al. (2006b) avaliaram também o teor de nitrogênio amoniacal de silagens de cana-de-açúcar, quando aplicado o aditivo microbiano *L.plantarum*, reportando valores elevados (14,3 %NT), indicando, desta forma, excessiva perda de proteína na forma de amônia. Siqueira et al. (2007b) também observaram maior teor de nitrogênio amoniacal quando silagens de cana-de-açúcar foram aditivadas na associação do benzoato de sódio ao aditivo microbiano *L.plantarum* (4,8 %NT), em comparação ao tratamento sem aditivos (2,9 %NT), indicando claramente naquele experimento maior proteólise na fase fermentativa, com elevadas perdas no valor nutritivo da silagem.

Dentro deste aspecto, vale ainda mencionar que, valores superiores de nitrogênio amoniacal são encontrados nas silagens de cana-de-açúcar quando aditivadas com uréia (CASTRO NETO, 2003; LOPES, 2006; SIQUEIRA et al., 2007b; SCHMIDT et al., 2007a; FERREIRA et al., 2007)

Os teores médios de etanol, carboidratos solúveis e ácidos orgânicos, verificados nas silagens do presente experimento, encontraram-se dentro do intervalo dos resultados obtidos pelos trabalhos que analisaram o perfil fermentativo da cana-de-açúcar.

2.2.3.4 Valor nutritivo das silagens após a abertura

Os resultados do valor nutritivo da silagem de cana-de-açúcar com aditivos químicos e microbianos são apresentados na Tabela 9. Não foram observadas diferenças significativas para as variáveis da composição químico-bromatológica entre os tratamentos propostos no presente experimento.

Com relação ao teor de matéria seca da silagem após a abertura, observou-se redução de 29,0% no momento da ensilagem para 25,2% na abertura, sendo estes valores médios encontrados para todos os tratamentos. Segundo Woolford (1984) este fato está associado à diminuição no conteúdo celular durante o processo fermentativo, representado principalmente pelo desaparecimento de carboidratos solúveis. Alli et al. (1983) avaliaram o perfil fermentativo de cana-de-açúcar ensilada por 42 dias e observaram diminuição em quatro unidades percentuais de MS. Siqueira et al. (2007b)

avaliaram o teor de matéria seca antes e após do processo fermentativo e também encontraram redução de quatro unidades percentuais, após 60 dias de conservação.

Tabela 9 - Composição químico-bromatológica das silagens de cana-de-açúcar (RB 72-454) tratadas com aditivos químicos e microbianos

Tratamentos ¹	MS %	PB	FDN	LIG % MS	FDA	Cinzas	DVIVMS %
A. Controle	25,47	4,97	55,41	6,65 ^{ab}	38,23	4,70	51,85 ^{abc}
B. <i>L. plantarum</i> ²	25,34	4,92	55,45	6,76 ^{ab}	38,22	4,68	52,12 ^{ab}
C. BAL ²	24,78	5,06	55,85	6,52 ^b	38,11	4,84	52,48 ^a
D. Lact/Benzoato 0,05%	24,95	4,97	57,22	7,11 ^a	39,38	4,76	50,87 ^d
E. Lact/Benzoato 0,01%	25,18	5,10	56,47	6,82 ^{ab}	38,85	4,84	51,37 ^{adc}
F. BAL/Benzoato 0,01%	25,62	5,05	55,92	7,07 ^a	38,24	4,90	51,17 ^{dc}
Média	25,2	5,0	56,1	6,8	38,5	4,8	51,6
C.V (%)	1,5	2,5	1,6	3,2	1,9	2,6	0,7

¹ Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05). PB=proteína bruta; FDN=fibra em detergente neutro; LIG=lignina; FDA=fibra em detergente ácido; CHO'S=carboidratos solúveis; MS= matéria seca; DVIVMS=digestibilidade verdadeira *in vitro* da MS; EB =Energia bruta.

² Produto fabricado por Alltech® Biotechnology; ²*L. plantarum*, *S. faecium* e *P. acidilactici*.

No entanto, Lopes (2006) observou maior redução no teor de matéria seca, já que esta passou de 32,6% para 25,1%. Desse modo, o autor adverte que no caso específico da cana-de-açúcar, devido à alta população de leveduras epifíticas encontradas no início do processo de ensilagem, as perdas de matéria seca podem tornar-se bastante significativas. Nesse sentido, recentes trabalhos reportaram também o mesmo efeito em silagens de cana-de-açúcar (QUEIROZ, 2006; FREITAS et al., 2006c; PEDROSO et al., 2007; FERREIRA et al., 2007)

Ao comparar os teores de proteína bruta (PB) na forragem fresca (Tabela 5) com os da silagem no momento da abertura (Tabela 9), observou-se discreto incremento de 0,6 unidades percentuais desta fração, para todos os tratamentos avaliados. Vários trabalhos realizados com silagens de cana-de-açúcar observaram também aumento desta fração no momento da abertura do silo (ALCANTARA et al., 1989; PEDROSO et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2007b; FERREIRA et al., 2007; SANTOS, 2007; FREITAS et al., 2006b, QUEIROZ, 2006)

Rotz e Muck (1994) destacaram que este incremento poderia estar associado às perdas de carboidratos solúveis no processo de respiração na fase inicial da

fermentação. Dessa forma, vários compostos da planta que não são afetados por este processo, aumentam a sua concentração como no caso da proteína bruta, minerais e da fração fibrosa (FDN e FDA). Não obstante, os mesmo autores relataram que no caso da proteína bruta podem observar-se aumentos de 1 a 2 unidades percentuais da MS, dependendo do seu teor na planta e das perdas de matéria seca durante a fase de estocagem.

De acordo com a Tabela 9, não foram observadas diferenças entre os tratamentos, para o teor de proteína bruta das silagens no momento da abertura. Os valores foram similares aos obtidos por Santos et al. (2006) que, reportaram valor de proteína bruta de 5,19% para a variedade RB 72-454 armazenada por 60 dias. Da mesma forma, Lopes (2006) avaliou esta mesma variedade de cana-de-açúcar e encontrou valor de 4,88% de proteína bruta.

Com relação a fração fibrosa da cana-de-açúcar fresca (Tabela 5) e da silagem (Tabela 9), durante o período de fermentação a silagem apresentou, em média, acréscimo de 12,5 e de 7,3 unidades percentuais dos valores de FDN e FDA, respectivamente. Segundo Rotz e Muck (1994), no caso da fração fibrosa, podem ocorrer aumentos entre 3 a 12 unidades percentuais. Os autores sugerem que este efeito pode causar perdas substanciais no teor digestível das silagens.

Em todo caso, este efeito é amplamente relatado em trabalhos que avaliaram o efeito de aditivos na conservação de cana-de-açúcar. Nesse sentido, Pedroso et al. (2005) encontraram acréscimo de 23 e de 13 unidades percentuais, durante o período de estocagem para o valor de FDN e de FDA, respectivamente. Alcântara et al. (1989) após 30 dias de estocagem, também observaram aumento do teor de FDN (67,4%) em relação a cana-de-açúcar fresca (50,2%). Santos (2007) reportou aumento destas frações durante o processo fermentativo de 14 e de 11 unidades percentuais para os valores de FDN e FDA, respectivamente. Todavia no mesmo experimento, as silagens de cana-de-açúcar aditivadas com fontes de óxido ou carbonato de cálcio apresentaram incremento médio apenas de 1,7 unidades percentuais para o valor de FDN, devido a hidrólise da parede celular que compensa parcialmente essa tendência.

No caso dos experimentos que tem avaliado o efeito de inoculantes microbianos, contendo as bactérias *L.plantarum* em cana-de-açúcar, foram observados maiores

aumentos na fração fibrosa das silagens, comparativamente aos resultados obtidos no presente experimento. Provavelmente, esse fato poderia estar relacionado às maiores perdas de matéria seca encontradas naqueles trabalhos. Freitas et al. (2006b) observaram a qualidade nutricional de silagens de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias *L. plantarum* e reportaram elevado acréscimo de 25,0 e de 18,9 unidades percentuais para as frações de FDN e de FDA, respectivamente. Siqueira et al. (2007b) encontraram aumento significativo nas frações fibrosas da silagem de cana-de-açúcar tratada com a associação de benzoato de sódio (0,1% da MV) e a inoculação de *L. plantarum* ($1,5 \times 10^5$ UFC/g), sendo que para as frações FDN e FDA observaram-se incrementos de 18,8 e de 13,0 unidades percentuais, respectivamente.

Os dados referentes à digestibilidade da matéria seca (DVIVMS) podem ser observados na Tabela 9. De forma geral, observou-se para todos os tratamentos diminuição desta variável após o processo fermentativo, uma vez que foi reduzida de 59,1% no momento da ensilagem para 51,6% na abertura do silo. Nesse sentido, estes valores concordam com os resultados obtidos por Pedroso et al. (2007) que, avaliaram os efeitos de diferentes aditivos químicos e microbianos e encontraram valores de digestibilidade no momento da abertura, variando de 41,2% a 51,8% (valores superiores foram observados com a aplicação de agentes hidrolíticos). No mesmo estudo, foram observados aumentos na digestibilidade da MS quando foi incrementada a dosagem do benzoato de sódio (0,2% da MV) e na dosagem de 0,1% da MV foram encontrados resultados semelhantes aos observados no presente experimento (51,8%). Para as silagens de cana-de-açúcar aditivadas com uréia Ferreira et al. (2007) encontraram redução da digestibilidade da MS de 58,4% a 51,1% durante o processo fermentativo. Schmidt et al. (2007a) avaliaram diferentes aditivos químicos e microbianos em silagens de cana-de-açúcar e relataram diminuição na digestibilidade da MS que passou de 51,9% na ensilagem para 43,1% no momento da abertura. No mesmo experimento, o autor observou que as silagens com maiores teores de componentes da parede celular, foram as que apresentaram os menores coeficientes de digestibilidade, conforme esperado.

Os dados apresentados na Tabela 9 mostraram diminuição na digestibilidade nas associações de *L. plantarum* ao benzoato de sódio (0,05% da MV) e das BAL ao

benzoato de sódio (0,01% da MV), em relação à silagem controle ($P < 0,05$). Freitas et al. (2007) avaliaram a digestibilidade da MS, com contagens crescentes de *L. plantarum* ($1,0 \times 10^6$ até $1,4 \times 10^6$ UFC/g) em silagens de cana-de-açúcar e não observaram diferenças significativas nesta variável em comparação com o tratamento sem aditivos. Entretanto, alguns trabalhos da literatura observaram efeitos positivos destes aditivos em silagens de cana-de-açúcar. Siqueira et al. (2007b) avaliaram o efeito dos aditivos benzoato de sódio (0,1%MV) e *L. plantarum* ($1,5 \times 10^5$) e observaram maior digestibilidade no momento da abertura, uma vez que foi observada maior recuperação dos carboidratos não fibrosos (CNF) para as silagens contendo estes aditivos em comparação ao tratamento controle. Apesar disso, aqueles resultados da digestibilidade da MS (45,0%) apresentaram-se inferiores em comparação com os resultados obtidos no presente experimento.

Ao analisar os contrastes entre os tratamentos testados (Tabela 10) e os resultados da Tabela 9 depreende-se que houve incremento no teor de FDN ($P < 0,05$) e de FDA ($P < 0,10$) nos tratamentos que foram aditivados com benzoato de sódio, os quais justificam os menores coeficientes de digestibilidade ($P < 0,10$). Avaliando o incremento da dosagem do benzoato de sódio, observou-se aumento nos valores de FDN e FDA da silagem ($P < 0,10$), com conseqüente diminuição da digestibilidade da MS ($P < 0,10$). Não houve efeito na aplicação de outras BAL no teor dos compostos da parede celular (Tabela 10).

A associação das bactérias *L. plantarum* ao benzoato de sódio na dosagem alta (0,05% da MV), quando comparada à silagem controle, promoveu maior perda total e perda por gases ($P < 0,05$), neste experimento. Além disso, este fato contribuiu para maior participação da fração fibrosa na matéria seca, apresentando menores coeficientes de digestibilidade das silagens tratadas com estes aditivos.

Apesar disso, é importante ressaltar que para a análise integrada da eficiência dos aditivos na conservação de forragens, devem ser analisados em conjunto tanto o processo fermentativo como a fase estabilidade aeróbia das silagens, uma vez que o efeito na redução das perdas totais no processo de conservação resulta da somatória da atuação dos aditivos em ambas as fases.

Tabela 10- Alterações na composição bromatológica da cana-de-açúcar tratada com aditivos químicos e microbianos

Tratamentos ¹	Contrastes (P<) ²		
	1	2	3
MS (%)	0,256	†	0,553
FDN (%MS)	*	†	0,450
FDA (%MS)	†	†	0,933
LIG (%MS)	0,140	0,239	0,769
DVIVMS (%)	**	†	0,208
PB (%MS)	0,160	0,203	0,105

¹ Tratamentos = A - Controle; B - *L. plantarum*; C - BAL; D - Lact/Benzoato 0,05%; E - Lact/Benzoato 0,01%; F - BAL/Benzoato 0,01%.

² Contrastes = 1. efeito do benzoato de sódio (B vs D+E); 2. efeito da dosagem do benzoato (D vs E+F); 3. efeito das BAL - *L. plantarum* (B vs C+F).

* Significativo a 5% de probabilidade, **Significativo a 1% de probabilidade,

† Significativo a 10% de probabilidade.

2.3 Conclusões

A cana-de-açúcar quando ensilada com bactérias do ácido láctico e benzoato de sódio não apresentou benefícios na fase fermentativa. Durante o período de conservação, a utilização destes aditivos promoveu o aumento das perdas totais e gasosas, no entanto o valor nutritivo foi semelhante ao encontrado para o tratamento sem aditivos.

A inoculação com diferentes espécies de bactérias produtoras do ácido láctico exclusivamente foi pouco efetiva em alterar a fermentação alcoólica das silagens de cana-de-açúcar e em reduzir as perdas associadas à fase fermentativa. Entretanto, não houve prejuízos no valor nutritivo da silagem com estes aditivos, quando com relação aos outros aditivos e a silagem controle.

A associação de *Lactobacillus plantarum* e as demais cepas de bactérias produtoras de ácido láctico (BAL) com benzoato de sódio, além de apresentar as maiores perdas no processo fermentativo, foram seguidas de diminuições nos valores da digestibilidade da MS da de cana-de-açúcar para estes tratamentos.

REFERENCIAS

ALCÁNTARA, E.; AGUILERA, A.; ELLIOTT, R.; SHIMADA, A. Fermentation and utilization by lambs of sugar cane harvested fresh and ensiled with and without NaOH. 4. Ruminal kinetics. **Animal of Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 23, p. 323-331, 1989.

ALLI, I.; BAKER, B.E. Studies on the fermentation of chopped sugar cane. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 7, p. 411-417, 1982.

ALLI, I.; FAIRBAIRN, R.; BAKER, B.E.; GARCIA, G. The effects of ammonia on the fermentation of chopped sugar cane. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 9, p. 291-299, 1983.

ANDRADE, J.B.; FERRARI JÚNIOR, E. Composição química da silagem de cana-de-açúcar tratada com uréia e diferentes doses de hidróxido de sódio. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais ...** Santa Maria: SBZ, 2003. 1 CD-ROM.

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

AZEVEDO, J.A.G.; PEREIRA, J.C.; CARNEIRO, P.C.S.; QUEIROZ, A.C.; BARBOSA, M.H.P.; FERNANDES, A.M.; RENNÓ, F.P. Avaliação da divergência nutricional de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 1431-1442, 2003.

BERNARDES, T.F. **Tecnologias no controle da deterioração aeróbia de silagens**. 2006. 100p. Dissertação (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.

BERNARDES, T.F.; REIS, R.A.; SIQUEIRA, G.R.; AMARAL, R.C.; PIRES, A.J.V. Uso de benzoato de sódio na ensilagem de capim-Marandu: Estabilidade aeróbia da aeração total e da silagem. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais ...** Campo Grande: SBZ, 2004. 1 CD-ROM.

BERNARDES, T.F.; SILVEIRA, R.N.; COAN, R.M.; REIS, R.A.; MOREIRA, A.L.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. Características fermentativas e presença de levedura na cana-de-açúcar crua ou queimada ensilada com aditivo. In: REUNIÃO ANUAL DASOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais ...** Recife: SBZ, 2002. 1 CD-ROM.

BERZAGHI, P.; COZZI, G.; ANDRIGHETTO, I. The use of near infrared analysis for in situ studies. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 80, n. 12, p. 3263-3270, 1997.

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

CASTRO NETO, A.G. **Avaliação de silagens de cana-de-açúcar submetidas a diferentes tratamentos**. 2003. 101 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

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

CAVALI, J.; PEREIRA, O.G.; SOUSA, L.O.; PENTEADO, D.C.S.; CARVALHO, I.P.C.; SANTOS, E.M.; CEZÁRIO, A. Silagem de cana-de-açúcar tratada com óxido de cálcio: composição bromatológica e perdas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2006, João Pessoa. **Anais ...** João Pessoa: SBZ, 2006. 1CD-ROM

COZZOLINO, D.; ACOSTA, Y.; GARCIA, J. Application of near infrared reflectancy spectroscopy (NIRS) to forage evaluation in Uruguay. In: INTERNATIONAL GRASSLANDS CONGRESS, 19., 2001, São Pedro. **Proceedings ...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 370.

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

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, p. 350, 1956.

FREITAS, A.W.P.; PEREIRA, J.C.; ROCHA, F.C. COSTA, M. G.; LEONEL, F.P.; RIBEIRO, M.d. Avaliação da qualidade nutricional da silagem de cana-de-açúcar com aditivos microbianos e enriquecida com resíduo de colheita de soja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 1, p. 38-47, 2006a.

FREITAS, A.W.P.; PEREIRA, J.C.; ROCHA, F.C. DETMANN, E.; RIBEIRO, M.D.; COSTA, M.G.; LEONEL, F.P. Características da silagem de cana-de-açúcar tratada com inoculante bacteriano e hidróxido de sódio e acrescida de resíduo da colheita de soja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 1, p. 48-59, 2006b.

FREITAS, A.W.P.; PEREIRA, J.C.; ROCHA, F.C. DETMANN, E.; PEREIRA, M.H.; RIBEIRO, M.D.; COSTA, M.G. Avaliação da divergência nutricional de genótipos de

cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 1, p. 229-236, 2006c.

FERNANDES, A.M.; QUEIROZ, A.C.; PEREIRA, J.C.; LANA, R.P.; BARBOSA, M.H.P.; FONSECA, D.M.; DETMANN, E.; CABRAL, L.S.; PEREIRA, E.S.; VITTORI, A. Composição químico-bromatológica de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) com diferentes ciclos de produção (precoce e intermediário) em três idades de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 4, p. 977-985, 2003.

FILYA, I. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silage. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 85, p. 3575-3581, 2003.

FERREIRA, D.A.; GONÇALVES, L.C.; MOLINA, L.R.; CASTRO NETO, A.G.; TOMICH, T.R. Características de fermentação da silagem de cana-de-açúcar tratada com uréia, zeólita, inoculante bacteriano e inoculante bacteriano/enzimático. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 2, p. 423-433, 2007

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

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

HONIG, H. The effect of prewilting conditions and weather. Small scale silage experiments. In: EUROBAC. CONFERENCE. SWEDISH UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCE, Uppsala. 1990. **Proceedings** ... Uppsala: Sweden Rep., 1990. p. 65-75.

JAY, J.M. **Modern food microbiology**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992. 701 p.

JUNQUEIRA, M.C. **Aditivos químicos e inoculantes microbianos em silagens de cana-de-açúcar**: perdas na conservação, estabilidade aeróbia e o desempenho de animais. 2006. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

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

KREBS, H.A.; WIGGINS, D.; STUBS, M et al. Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 214, p. 657-663, 1983.

KUNG, L. Jr. **Preparation of silage water extracts for chemical analysis**: standard operating procedure, 001 2.03.96) Newark: Ed. University of Delaware, Ruminant Nutrition Lab., 1996.

KUNG, L. Jr.; STANLEY, R.W. Effect of stage of maturity on the nutritive value of whole-plant sugar cane preserved as silage. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 54, p. 680-696, 1982.

LÄTTEMÄE, P.; LINGVALL, P. Effect of hexamine and sodium nitrite in combination with sodium benzoate and sodium propionate on fermentation and storage stability of wilted and long cut grass silage. **Swedish Journal of Agricultural Research**, Oslo, v. 26, p. 135-146, 1996.

LIMA, J.A.; EVANGELISTA, A.R.; ABREU, J.G.; SIQUEIRA, G.R.; SANTANA, R.A.V. silagem de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) enriquecida com uréia ou farelo de soja. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais ...** Recife:SBZ, 2002. 1-CD-ROM.

LOPES, J. **Qualidade da cana-de-açúcar elaborada com diferentes aditivos**. 2006. 85p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

LOURES, D.R.S. **Características do efluente e composição químico-bromatológica da silagem sob níveis de compactação e de umidade do capim-elefante (*Penisetum purpureum* Schum.) c. Cameron**. 2000. 67p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

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

MOLINA, L.R.; FERREIRA, D.A.; GONÇALVES, L.C.; CASTRO NETO, A.G.; RODRIGUES, N.M. Padrão de fermentação da silagem de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) submetida a diferentes tratamentos. In: In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA , 39., Recife, 2002. **Anais ...** Recife: SBZ, 2002. 1 CD-ROM.

MUCK, R.E.; PITT, R.E.; LEIBENSPERGER, R.Y. A model of aerobic fungal growth in silage: Journal of Microbial Characteristics. **Grass Forage Science**, Oxford, v. 46, p. 283-299, 1991

MUCK, R.E.; KUNG, L., Jr. Effects of silage additives on ensiling. In: SILAGE: FIELD TO FEEDBUNK, Herhey, 1997. **Proceedings ...** Herchey: NRAES, 1997. p. 187-199.

MURARO, G.B. **Impacto do espaçamento, número de cortes e da idade de corte na produção e composição bromatológica de cana-de-açúcar para silagem**. 2007. 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

NUSSIO, L.G.; SCHMIDT, P.; PEDROSO, A.F. Silagem de cana-de-açúcar. In: PEIXOTO, A.M.; MOURA, J.C.; SILVA, S.C. FARIA, V.P. **Produção animal em pastagens**. Piracicaba: FEALQ, 2003. p. 187 - 205.

NUSSIO, L.G.; SCHMIDT, P.; SCHOGOR, A.L.; MARI, L.J. Cana-de-açúcar como alimento para bovinos. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM, 3., 2006, Viçosa. **Anais ...** Viçosa: UFV, 2006. p. 277-328.

O'KIELY, P., MUCK, R.E. Aerobic deterioration of lucerne (*Medicago sativa*) and maize (*Zea mays*) silages-effects of yeast. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 59, p.139-144, 1992.

OLIVEIRA, M.D.S.; TOSI, H.; SAMPAIO, A.A.M.; VIEIRA, P.F.; SANTIAGO, G. Avaliação de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas a diferentes tempos de armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 8, p. 1435-1442, 1999.

OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; DRIEHUIS, F.; GOTTSCHAL, J.C.; SPOELSTRA, S.F. Silage fermentation processes and their manipulation. In: FAO ELECTRONIC CONFERENCE ON TROPICAL SILAGE, 1999, Rome. **Silage making in the tropics with emphasis on smallholders: proceedings ...** Rome: FAO, 2000. p. 17-30.

PATE, F.M.; ALVAREZ, J.; PHILLIPS, J.D.; ELIAND, B.R. **Sugarcane as a cattle feed: production and utilization**. University of Florida. Department of Animal Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, First published June 1984; reviewed March 2002. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu>>. Acesso em: 16 nov. 2007.

PEDROSO, A.F. **Aditivos químicos microbianos como indicadores da produção de etanol em silagens 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.; LOURES, D.R.S.; PAZIANI, S.F.; IGARASI, M.S.; COELHO, R.M.; HORII, J.; RODRIGUEZ, A.A. Efeito do tratamento com aditivos químicos e inoculantes bacterianos nas perdas e na qualidade de silagens de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 3, p. 558-564, 2007.

PEDROSO, A.F.; NUSSIO, L.G.; PAZIANI, S.F.; LOURES, D.R.S.; IGARASI, M.S.; COELHO, R.M.; PACKER, I.H.; HORII, J.; GOMES, L.H. Dinâmica da fermentação e da microflora epífita em silagens de cana-de-açúcar. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 5, p. 427- 432, 2005.

PLAYNE, M.J.; McDONALD, P. The buffering constituents of herbage and of silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 17, p. 264-268, 1966.

POLONEN I. **Preservation efficiency of formic acid and benzoic acid in the ensiling of slaughterhouse by-products and their subsequent metabolism in farmed fur animals**. 2000. 54 p. Academic Dissertation - Faculty of Agriculture and Forestry, University of Helsinki, Helsinki, 2000.

PRESTON, T.R.; HINOJOSA, C.; MATINEZ, L. Ensiling of sugar cane with ammonia molasses and mineral acids. **Tropical Animal Production**, Santo Domingo, v. 1, p. 120-126, 1976.

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

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

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

RODRIGUEZ, A.A.; CRUZ, G.M.; BATISTA, L.A.R. LANDELL, M. Qualidade de dezoito variedades de cana-de-açúcar como alimento para bovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., Piracicaba, 2001. **Anais ...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 1111-1113.

RODRIGUEZ, A.A.; CRUZ, G.M.; BATISTA, L.A.R. LANDELL, M. Qualidade de nove variedades de cana-de-açúcar como alimento para bovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA , 43., 2006, João Pessoa. **Anais ...** João Pessoa: SBZ, 2006. 1 CD-ROM.

ROOKE, J.A.; SHARON, L. B.; ARMSTRONG, D.G. The chemical composition of grass silages prepared with and without pre-treatment with inoculants containing *Lactobacillus plantarum*. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 13, p. 269-279, 1985.

ROSSI JUNIOR, P.; SCHOGOR, A.L.B. Degradabilidade *in situ* da cana-de-açúcar ensilada com uréia e milho em diferentes proporções. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 3, p. 15-18, 2006.

ROTZ, C.A.; MUCK, R.E. Changes in forage quality during harvest and storage. In: FAHEY, G.C. (org). **Forage quality, evaluation and utilization**. Madison: ASA; CSSA; SSSA, 1994. p. 828-868.

SANTOS, M.C. **Aditivos químicos para o tratamento da cana-de-açúcar *in natura* e ensilada (*Saccharum officinarum* L.)**. 2007. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciência

Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

SANTOS, R.V.; EVANGELISTA, A.R.; PINTO, J.C. COUTO FILHO, C.C.C.; SOUZA, R.M. Composição química da cana-de-açúcar (*saccharum spp.*) e das silagens com diferentes aditivos em duas idades de corte. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1184-1189, nov./dez. 2006.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistics. Cary, 1999. 965 p.

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

SCHMIDT, P.; MARI, L.J.; NUSSIO, L.G.; PEDROSO, A.F.; PAZIANI, S.F.; WECHSLER, F.S. Aditivos químicos ou biológicos na ensilagem de cana-de-açúcar. 1. Composição química das silagens, ingestão, digestibilidade e comportamento ingestivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 5, p. 1666 - 1675, 2007a.

SCHMIDT, P.; NUSSIO, L.G.; ZOPOLLATTO, M.; RIBEIRO, J.L.; SANTOS V.P.; PIRES, A.V. Aditivos químicos ou biológicos na ensilagem de cana-de-açúcar. 2. Parâmetros Ruminais e degradabilidade da matéria seca e das frações fibrosas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 5, p. 1676 - 1684, 2007b.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos** (métodos químicos e biológicos). Viçosa: UFV, Impr. Univ., 1981. 166 p.

SILVA, S.A.R. **Avaliação da eficiência fermentativa da cana-de-açúcar ensilada com diferentes aditivos**. 2003. 44 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2003.

SIQUEIRA, G.R. **Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) ensilada com aditivos químicos e microbianos**. 2005. 92 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2005.

SIQUEIRA, G.R.; REIS, R.A; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; BERNARDES, T.F.; PIRES, A.J.V.; ROTH, M. T. P.; ROTH, A.P.T.P. Associação entre aditivos químicos e bacterianos na ensilagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 4, p. 789 - 798, 2007a.

SIQUEIRA, G.R.; REIS, R.A.; ITURRINO, R.P.S.; 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, n. 6 , p. 2000-2009, 2007b. Suplemento.

SOUSA, D. P.; MATTOS, W.R.S.; NUSSIO, L.G.; MARI, L.J.; SANTOS, M.C.; ZOPOLLATO, M.; SCHIMIDT, P.; RIBEIRO, J.L.; QUEIROZ, O.C.M.; JUNQUEIRA, M.C.; CAMARGO, M.S.; TOLEDO FILHO, S.G. de; FIGUEIRO, R.N. Avaliação das perdas por efluentes e gases em silagens de cana-de-açúcar aditivadas com inoculantes químicos e bacterianos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. **Anais ...** Goiânia: SBZ, 2005. 1 CD-ROM.

SPÖRNDLY, R. **Fodertabeller för idisslare 2003** (Feeding tables for ruminants). Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, Dept. of Animal Nutrition and Management, 2003. 1 v. (Report, 257).

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

WHINTER, A.G.; KUNG, Jr. The effect of a dry or liquid application of *Lactobacillus plantarum* MTD1 on the fermentation of alfalfa silage. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 84, p. 2195-535, 2001.

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.

WOOLFORD, M.K. **The silage fermentation**. New York: Marcel Dekker, 1984. 350 p.

3 AVALIAÇÃO DE ADITIVOS QUÍMICOS E MICROBIANOS NA ESTABILIDADE AEROBIA E RECUPERAÇÃO DE MATÉRIA SECA EM SILAGENS DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de aditivos químicos e microbianos na estabilidade aeróbia, valor nutritivo e recuperação da matéria seca da silagem de cana-de-açúcar. Para o preparo das silagens foi utilizada a variedade RB-72454, colhida após 12 meses de crescimento fisiológico. Após abertura dos silos, amostras de aproximadamente 4 kg foram tomadas de cada tratamento, para posterior avaliação da estabilidade aeróbia das silagens, determinando: ADITE-5; ADITE-10; temperatura máxima da massa; dias para que a temperatura máxima fosse atingida e o tempo (em horas) em que as silagens atingiram 2°C acima da temperatura ambiente (EA). O experimento foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado, sendo seis tratamentos, com quatro repetições cada. Além da silagem de cana-de-açúcar controle, foram utilizados dois aditivos microbianos: *Lactobacillus plantarum* e o conjunto de bactérias *L. plantarum* + *Streptococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* (BAL). Esses dois aditivos microbianos também foram aplicados associados a duas doses de benzoato de sódio, 0,01 e 0,05% da massa verde. Os aditivos microbianos foram aplicados à contagem de 5×10^4 ufc/g de forragem. Para associação de *L. plantarum* com benzoato de sódio na dosagem alta (0,05% da MV), foi observado menor acúmulo de temperatura nos primeiros cinco dias após abertura (ADITE-5) e menor pico de temperatura da massa exposta ao ar. Da mesma forma, as silagens tratadas com esses aditivos mantiveram estável o valor de pH, nos primeiros cinco dias após abertura. Portanto, este tratamento apresentou maior recuperação de matéria seca das silagens, nos primeiros cinco dias da fase aeróbia. Todavia, não houve diferença significativa entres os tratamentos para as outras variáveis determinadas na fase aeróbia. Com relação ao valor nutritivo das silagens no momento da abertura, associação de *L. plantarum* com benzoato de sódio na dosagem alta (0,05% da MV) apresentou menores valores da fração fibrosa (FDN e FDA) e maior digestibilidade da matéria seca nos primeiros cinco dias da fase aeróbia. De forma geral, a análise conjunta dos resultados mostra que as silagens tratadas com associação de *L. plantarum* com benzoato de sódio na dosagem alta (0,05% da MV), apresentaram desempenho superior na fase aeróbia.

Palavras-chave: aditivos, associação, estabilidade aeróbia, cana-de-açúcar, silagens

3 EVALUATION OF CHEMICAL AND MICROBIAL ADDITIVES ON THE AEROBIC STABILITY AND DRY MATTER RECOVERY OF SUGAR CANE (*Saccharum officinarum* L.) SILAGE

Abstract

This study had the objective of evaluate the effect of chemical and microbial additives in the aerobic stability, nutritive value and dry matter recovery rate of sugarcane silages. The silages were made with RB-72454 sugarcane variety, harvested with 12 months of regrowth. After opening, approximately 4 kg of silage were placed in buckets and kept for aerobic stability trial. The variables analyzed were: ADITE-5, ADITE-10, maximum temperature of the forage, days to reach the maximum temperature of the forage and the time spent to mass achieve 2°C over the ambient temperature (AS). It was analyzed as a completely randomized design, with six treatments and four replications for each treatment. Besides the control sugarcane silage, were tested two kinds of microbial additives: *Lactobacillus plantarum* and the association of *L. plantarum* and *Streptococcus faecium* and *Pediococcus acidilactici*. Moreover these two microbial additives were associated with two levels of sodium benzoate, 0.01 or 0.05% of fresh matter. The microbial additives were applied trying to reach 5×10^4 ufc/g of forage. It was observed lowest accumulated temperature in the first five days (ADITE-5) and highest peak of temperature for the *L. plantarum* associated with 0.05% of sodium benzoate treatment. Additionally, these silages remained the pH stable, during the same period of the first five days of aerobic trial. As a result, this treatment showed highest dry matter recovery rate, during the aerobic exposition. In terms of nutritive value, the treatment of *L. plantarum* associated with 0.05% of sodium benzoate showed lowest levels of fiber content (NDF and ADF) and highest *in vitro* dry matter digestibility. In conclusion the *L. plantarum* associated with 0.05% of sodium benzoate treatment showed the best performance during the aerobic phase.

Keywords: additives, association of additives, silages, sodium benzoate, sugarcane

3 EVALUACIÓN DE ADITIVOS QUÍMICOS Y MICROBIANOS EN LA ESTABILIDAD AEROBIA Y RECUPERACIÓN DE MATERIA SECA EM ENSILAJES DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)

Resumen

El objetivo el presente trabajo fue evaluar el efecto de aditivos químicos y microbianos en la estabilidad aerobia, valor nutritivo y recuperación de materia seca de ensilajes de caña de azúcar. Para la realización de los ensilajes fue utilizada la variedad RB-72454, cosechada con 12 meses de crecimiento fisiológico. Después de la abertura de los silos, muestras de aproximadamente 4 kg fueron tomadas de cada tratamiento, para posterior evaluación de la estabilidad aerobia, determinando: ADITE-5; ADITE-10; temperatura máxima da masa de forraje; días para la temperatura máxima e el tempo (en horas) en que los ensilajes obtuvieron 2°C a mas que la temperatura ambiente (EA). El experimento fue desarrollado en delineamiento enteramente casualizado, siendo seis tratamientos con cuatro repeticiones. Fuera del tratamiento control, los aditivos microbianos utilizados los fueron: *Lactobacillus plantarum* y el conjunto de bacterias *L. plantarum* + *Streptococcus faecium* + *Pediococcus acidilactici* (BAL). Estos aditivos microbianos también fueron aplicados asociados a dos dosis de benzoato de sodio, 0,01 y 0,05% de de forraje verde (FV), siendo que todos los aditivos microbianos fueron aplicados para contaje bacteriana de $5,0 \times 10^4$ UFC/g. Para la asociación de *L. plantarum* con benzoato de sodio en la dosis alta (0,05% da FV), fue observado menor acumulo de temperatura en los primeros cinco días después de la abertura de los silos (ADITE-5) y menor pico de temperatura de la masa expuesta al aire. De la misma forma, los ensilajes donde fueron usados estos aditivos, consiguieron mantener estable el valor de pH en los primeros cinco días después de la abertura. Además, este mismo tratamiento también presento mayor recuperación de materia seca de los ensilajes en los primeros cinco días de la fase aerobia. Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre los tratamientos para las otras variables determinadas en la fase aerobia. Por otro lado, con relación al valor nutritivo de los ensilajes en el momento de la abertura, la asociación de *L. plantarum* con benzoato de sodio en la dosis alta (0,05% da FV) presento menores valores de facción fibrosa (FDN e FDA) y mayor digestibilidad de materia seca en los primeros cinco días de la fase aerobia. En todo caso, al analizar conjuntamente los resultados se puede observar que los ensilajes donde fue usada la asociación de *L. plantarum* con benzoato de sodio en la dosis alta (0,05% da FV), estos aditivos presentaron desempeño superior en la fase aerobia.

Palabras-clave: aditivos, asociación, estabilidad aerobia, caña de azúcar, ensilajes

3.1 Introdução

A cana-de-açúcar é uma alternativa que tem alcançado grande interesse para alimentação de ruminantes, devido à elevada produção de nutrientes digestíveis totais (NDT) por hectare e disponibilidade em regiões de produção pecuária. Além disso, quando comparada a outras fontes de volumosos, a cana-de-açúcar tem se apresentado como alternativa economicamente competitiva.

O uso da cana-de-açúcar ensilada é um assunto em destaque nos últimos anos, visto que este procedimento melhora a eficiência operacional dentro das propriedades. Entretanto, quando as silagens são fornecidas aos animais, o contato da massa com oxigênio reinicia a atividade microbiana, acumulando perdas de matéria seca e de valor nutritivo das silagens, além de por em risco a qualidade higiênica do material ensilado. O elevado teor de carboidratos solúveis e os tipos de microrganismos epifíticos existentes na cana-de-açúcar caracterizam esta cultura por ser bastante propensa à deterioração aeróbia.

Nesse sentido, tem-se despertado o interesse da pesquisa por identificar aditivos capazes de controlar o crescimento microbiano na abertura dos silos. Por conseguinte, entre alguns dos avanços nessa área, pode ser destacado o surgimento de aditivos microbianos, como bactérias heterofermentativas do gênero *Lactobacillus buchneri* capazes de produzir compostos antimicrobianos e também a utilização de aditivos químicos como uréia, óxido de cálcio e benzoato de sódio, que controlam a população de leveduras em condições aeróbias mantendo o valor nutritivo das silagens de cana-de-açúcar por mais tempo.

Em todo caso, apesar dos avanços realizados nesta área, ainda existe o interesse da comunidade científica por encontrar novos aditivos que apresentem controle efetivo da população de leveduras nesta fase do processo de conservação sob baixo custo de produção.

Dentro desse contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos de aditivos químicos e microbianos na recuperação de matéria seca após abertura do silo, alterações no valor nutritivo e a estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Revisão Bibliográfica

3.2.1.1 Estabilidade aeróbia de silagens

A avaliação da estabilidade aeróbia tem sido enfatizada no meio científico nos últimos anos, uma vez que silagens apesar de apresentarem adequado padrão fermentativo durante o período de conservação não apresentavam o desempenho animal esperado. Motivo pelo qual, pesquisas na área de conservação de forragens têm aumentado o interesse por garantir melhor atuação dos aditivos na estabilidade das silagens no momento da abertura.

No processo de conservação, durante o período de estocagem o oxigênio penetra por difusão ou por dano físico na estrutura do silo, sendo que após a abertura há inevitável exposição ao ar, fato que estimula o crescimento de microrganismos aeróbios facultativos, afetando diretamente a deterioração da forragem. Este processo é iniciado por leveduras, causando elevação do pH à medida que ocorre a oxidação dos produtos de fermentação da silagem, principalmente o ácido láctico, com elevada produção de gases, água e geração de calor (WOOLFORD, 1984). Com o acréscimo no valor do pH outros microrganismos começam a proliferar, resultando em perdas de componentes nutritivos e diminuição da qualidade higiênica das silagens (FILYA, 2003).

Atualmente, uma das formas utilizadas para avaliar a deterioração das silagens após abertura é a quantificação da temperatura máxima alcançada pela massa no período pós-abertura. Uma das estratégias metodológicas consiste na quantificação do tempo gasto para que massa exposta ao oxigênio ultrapasse em 2 °C a temperatura ambiente (RANJIT; KUNG, 2000). Estes autores utilizaram dispositivos eletrônicos com sensores de temperatura (data loggers) para monitorar a massa de silagem de milho inoculada com aditivos microbianos, e simultaneamente a temperatura do ambiente também foi controlada (25 °C). Kung e Ranjit (2001) avaliaram a estabilidade aeróbia em silagem de cevada, admitindo exatamente os mesmos critérios empregados nos

experimento citado anteriormente e a temperatura ambiente (22 °C) também foi monitorada.

3.2.1.2 Estabilidade aeróbia em silagens de cana-de-açúcar

Trabalhos de pesquisa publicados recentemente no Brasil, relatam que silagens de cana-de-açúcar são bastante propensas à deterioração aeróbia, por apresentarem elevado teor de carboidratos solúveis residuais. Motivo pelo qual têm sido realizados alguns experimentos que além de avaliar o processo fermentativo, também abordam o efeito dos aditivos na estabilidade aeróbia. Nesse sentido, Pedroso (2003) observou estabilidade de 48 horas para silagens sem aditivos, sendo esta reduzida para 24 horas em silagens aditivadas com *L. plantarum* (1×10^6 UFC/g), enquanto que, a adição de *L. buchneri* ($3,64 \times 10^5$ UFC/g) ou benzoato de sódio (0,2% da MV) elevou a estabilidade das silagens para 72 e 78 horas, respectivamente. Schmidt (2006) encontrou para os tratamentos de *L. buchneri* (5×10^4 UFC/g) e *L. buchneri* (10^5 ufc/g MV) os maiores valores de estabilidade aeróbia (14,4 e 55,2 h, respectivamente) comparados com o controle (0 h). Siqueira et al. (2007b) concluíram que a associação de benzoato de sódio (0,1% da MV) e *L. buchneri* ($5,0 \times 10^4$ UFC/g) melhorou a estabilidade aeróbia (60h) em comparação com o controle (32h). No entanto, resultados semelhantes foram apresentados nos tratamentos com inoculação de *Propionibacterium* sp. e *L. plantarum* ($1,5 \times 10^5$ UFC/g) e com adição de uréia (1,5% da MV). Apesar disso o autor tenha encontrado alto coeficiente de variação dos dados na somatória das diferenças de temperatura aos primeiros 5 dias de exposição aeróbia.

Com vista ao melhor entendimento da dinâmica entre leveduras e substratos disponíveis nas silagens, novas abordagens científicas são imprescindíveis, uma vez que este tipo de estudo possibilita o desenvolvimento de metodologia mais acurada para o seu controle.

3.3 Material e métodos

3.3.1 Local do experimento

O presente estudo foi realizado no Departamento de Zootecnia, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” USP/ESALQ, em Piracicaba – SP.

3.3.1.2 Tratamentos e aplicação dos aditivos

Após ter sido picada, a forragem foi submetida aos aditivos microbianos: *Lactobacillus plantarum* (Lact) isoladamente ou aplicado em conjunto às bactérias ácido lácticas *Streptococcus faecium* e *Pediococcus acidilactici* (BAL). Além disso, os aditivos microbianos foram associados ao aditivo químico benzoato de sódio, avaliando níveis crescentes de aplicação (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição dos tratamentos aplicados

Tratamentos	Aditivo microbiano (UFC/g MV)	Aditivo químico (g/t MV)
A. Controle	-	-
B. <i>L. plantarum</i> ¹	$5,0 \times 10^4$	-
C. BAL ^{1, 2}	$5,0 \times 10^4$	-
D. <i>L. plantarum</i> /Benzoato 0,050%	$5,0 \times 10^4$	500
E. <i>L. plantarum</i> /Benzoato 0,012%	$5,0 \times 10^4$	125
F. BAL/Benzoato 0,01%	$3,6 \times 10^4$	125

¹Produto fabricado por Alltech® Biotechnology.

²*L. plantarum*, *S. faecium* e *P. acidilactici*

Os aditivos químicos foram aplicados na forma de soluções aquosas, numa diluição de volume de 12,5 litros de água por tonelada de cana fresca, sendo distribuídos por meio de pulverizadores manuais de 5 litros. Os inoculantes microbianos foram adicionados à massa ensilada utilizando-se pulverizadores com capacidade de 500 mL, procurando-se obter em todos os tratamentos distribuição uniforme dos produtos na massa de forragem.

3.3.1.3 Ensaio de estabilidade aeróbia

No momento da abertura dos silos depois da fase fermentativa, amostras de aproximadamente 3 kg de forragem foram coletadas para a avaliação da estabilidade aeróbia. O material foi acondicionado sem compactação em baldes plásticos em local com temperatura controlada durante o período de dez dias. As temperaturas das silagens foram registradas a cada quinze minutos por sensores de temperatura associados a sistema informatizado de aquisição de dados (Dickson[®], Addison, USA), colocados no centro geométrico dos baldes contendo silagem e posicionados no centro da sala.

Durante o ensaio de estabilidade aeróbia foram realizadas pesagens dos baldes no quinto e décimo dia, com o intuito de estimar a recuperação de matéria seca no período pós-abertura dos silos. Além disso, foram realizadas coleta de amostras para posteriores análises químico-bromatológicas.

Para a determinação da estabilidade aeróbia, foram estudadas as seguintes variáveis: horas para o aumento de 2°C da temperatura do material com relação à temperatura ambiente (EA), tempo para atingir a temperatura máxima e o seu valor para cada tratamento. Com a base no conjunto de dados obtidos pelos sensores eletrônicos, foi realizado um gráfico da temperatura para cada tratamento, ao longo do ensaio da estabilidade aeróbia. Também, foi avaliado como parâmetro da estabilidade aeróbia, o acúmulo da diferença média de temperatura das silagens (°C) com relação à temperatura ambiente, por cinco (ADITE-5) e dez dias (ADITE-10).

3.3.2 Amostragens

3.3.2.1 Amostragens durante as ensilagens

A cana-de-açúcar foi amostrada no momento da ensilagem para a determinação da composição químico-bromatológica. Para isso, foram colhidas três amostras de forragem para cada tratamento, em diferentes pontos da massa ensilada, para uma melhor representatividade da massa.

Uma amostra de 500g aproximadamente foi acondicionada em saco de papel para secagem em estufa de ventilação forçada a 55°C. Uma segunda amostra de 100 g aproximadamente foi armazenada em saco plástico e congelada imediatamente, para posterior processamento para obtenção do extrato aquoso.

A composição químico-bromatológica da cana-de-açúcar ensilada neste experimento esta apresentada na Tabela 5 e 6 do capítulo 1.

3.3.2.2. Amostragens na abertura dos silos experimentais

Após a abertura dos silos experimentais, a camada superior de silagem (10 cm, aproximadamente) foi descartada para diminuir a possibilidade de erros na interpretação dos resultados, já que poderia coletar-se forragem deteriorada com características bromatológicas pontuais.

Uma vez instalado o ensaio da estabilidade aeróbia, foram retiradas amostras de forragem para cada tratamento nos dias zero, cinco e dez da abertura dos silos. Para isso, uma amostra de 200g aproximadamente foi acondicionada em saco de papel para secagem em estufa de ventilação forçada a 55 °C. Outra amostra de 100g aproximadamente foi armazenada em saco plástico para ser congelada para posterior processamento para obtenção do extrato aquoso da silagem.

3.3.2.3 Análises químico-bromatológicas

As análises foram realizadas no Laboratório de Bromatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” USP-ESALQ, em Piracicaba/SP.

3.3.2.4 Amostras secas em estufa

As amostras de cana-de-açúcar obtidas tanto no momento da ensilagem como aquelas obtidas na abertura dos silos, foram secas em estufa de ventilação forçada a

55 °C por 72 horas (SILVA, 1981), sendo posteriormente moídas, em moinho de tipo Wiley providos de peneira com orifícios de 1 mm.

Para determinação da composição bromatológica do material, foi utilizado o método de espectroscopia de refletância de infravermelho proximal (NIRS) (BERZAGHI et al. 1997; COZZOLINO et al. 2001), onde após a moagem o material foi escaneado para obtenção dos espectros NIRS. O equipamento utilizado foi o espectrômetro modelo NIRS 5000 (*NIRSystems*[®], Silver Spring, MD, USA) acoplado a um microcomputador equipado com software WinISI II versão 6.2 (*Intrasoft International, PA*). As amostras foram escaneadas entre os comprimentos de onda de 700 a 2100 nm e os espectros foram armazenados em curvas log (1/R, onde R é o valor da refletância), em intervalo de 2 nm. Utilizaram-se os métodos de seleção de amostras existentes no software do equipamento e foram descartadas as amostras distantes mais de 3 H (distancia padronizada de *Mahalanobis*) de média, e essas foram consideradas como *outliers*. Adotou-se a distancia mínima de 0,6 H entre amostras para seleção daquelas em que seriam efetuadas as análises bromatológicas convencionais.

Para determinar o teor de matéria seca da forragem, as amostras moídas foram secadas em estufa a 105 °C durante 24 horas (AOAC, 1990). A matéria mineral foi obtida com a incineração das amostras em forno tipo mufla a 550°C por 3 horas (AOAC, 1990).

O teor de proteína bruta foi obtido por meio de combustão da amostra conforme o método Dumas, utilizando-se o equipamento LECO[®], modelo FP-528 (*Leco Corporation, Michigan, USA*).

Os teores de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) e de fibra insolúvel em detergente ácido (FDA) foram obtidos com base no método seqüencial proposto pela ANKOM *Fiber Analyser* (ANKOM[®] Technology Corporation, Fairport, NY), descrito por Holden (1999).

Com os resultados das análises bromatológicas convencionais, estes valores foram inseridos no banco de dados do NIRS, para posterior estimação dos valores das demais amostras, por meio de equações de predição criadas com base em métodos estatísticos propostos pelo programa.

3.3.2.5 Amostras de forragem fresca

Para a realização do extrato aquoso, uma vez que as amostras foram descongeladas, 25 g de forragem foram adicionados a 225 mL de água deionizada e posteriormente processados em liquidificador industrial durante um minuto. O material foi então filtrado, sendo determinado o valor de pH no extrato por meio de um potenciômetro digital (DIGMED® - DM 20). O extrato remanescente foi filtrado em papel *Whatman*® 54, sendo adicionadas três gotas de ácido sulfúrico 50% para centrifugação durante 15 minutos a 8.000 x g. Após a centrifugação, os extratos foram pipetados e colocados em tubos plásticos com capacidade de 1,5 mL, sendo armazenados desta forma no congelador a -20 °C de temperatura (KUNG Jr., 1996).

Para determinação do teor de carboidratos solúveis das amostras, utilizou-se o método descrito por (DUBOIS et al., 1956) por meio de espectrofotometria com leitura em 490 nm. Devido o elevado teor de carboidratos solúveis da cana-de-açúcar foi necessária maior diluição das amostras para conseguir a leitura das amostras.

3.3.3 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos e quatro repetições para cada. Neste ensaio como foram coletadas amostras ao longo do tempo, na mesma unidade experimental, foi considerado como medidas repetidas. Para as variáveis exploradas foi realizada a análise de variância usando o procedimento PROC MIXED do programa estatístico SAS®, versão 9,0 para Windows® (SAS, 1999), verificando efeitos de tratamento, de tempo e da interação desses fatores. Além disso, para realizar a comparação de médias entre os tratamentos foi aplicado o teste de Tukey com nível de significância de 5%. O modelo estatístico para a avaliação da silagem foi seguinte:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_k + \alpha\beta_{ik} + e_{ijk}$$

em que:

Y_{ijk} = observação referente ao tratamento i , na repetição j , no tempo k .

μ = média geral

α_i = efeito do tratamento i , $i = 1, \dots, 6$.

β_k = efeito do tempo k , $k = 1, \dots, 3$.

$\alpha\beta_{ik}$ = efeito de interação entre tratamento i e tempo k .

e_{ijk} = erro experimental associado a todas as observações.

3.4 Resultados e Discussão

3.4.1 Estabilidade aeróbia das silagens de cana-de-açúcar

O estudo da estabilidade aeróbia das silagens da cana-de-açúcar vem sendo realizado nos últimos anos, uma vez que estas são bastante propensas à deterioração aeróbia (PEDROSO, 2003; NUSSIO, 2003; JUNQUEIRA, 2006; SCHMIDT, 2006; QUEIROZ, 2006; SANTOS, 2007; SIQUEIRA et al., 2007a).

Após o processo fermentativo, as silagens que são oferecidas aos animais se submetem às alterações químico-bromatológicas, já que a massa que anteriormente se encontrava em condições anaeróbias, na presença de oxigênio tem o crescimento de microbiota indesejável, tal como leveduras, fungos além de algumas espécies de Clostrídios (WOOLFORD, 1984). Estes microrganismos crescem utilizando diferentes produtos da fermentação, resultando normalmente em redução no teor de carboidratos solúveis e ácido láctico, com aumento do pH da silagem. Além disso, ocorre aquecimento da massa (reações exergônicas) e produção de dióxido de carbono durante a respiração (WEINBEIRG; MUCK, 1996). Desse modo, as silagens mais sujeitas ao o processo de deterioração são denominadas como aerobicamente instáveis, caracterizadas principalmente pelas elevas perdas de MS e em alguns casos pela produção de micotoxinas (FILYA, 2003).

Para determinar a estabilidade aeróbia das silagens, realiza-se o monitoramento da temperatura da massa exposta durante o período de pós-abertura (RANJIT; KUNG Jr., 2000). Dessa forma, na figura 1 são apresentados os resultados referentes a temperatura acumulada nos primeiros cinco dias após a abertura (ADITE-5). Com relação as variáveis da estabilidade aeróbia para o tratamento da associação de *L. plantarum* ao benzoato de sódio na dosagem baixa (0,01% da MV), estas não foram estimadas, uma vez que houve falha no dispositivo que armazenava a temperatura da silagem (Data logger). Como pode ser observada para esta variável, a associação de benzoato de sódio na dosagem alta (0,05% da MV) e o aditivo microbiano *L. plantarum* ($5,0 \times 10^4$ UFC/g), reduziu de forma significativa o acúmulo da diferença da temperatura das silagens com relação à temperatura ambiente (°C) nos primeiros cinco dias da fase aeróbia. Entretanto, a inoculação isolada de *L. plantarum* e das demais bactérias produtoras do ácido láctico (BAL) ou a associação de *L. plantarum* com benzoato de sódio na menor concentração, não trouxeram nenhum benefício com relação ao tratamento controle.

Figura 1 - Acúmulo de temperatura durante cinco dias de exposição na fase aeróbia das silagens de cana-de-açúcar (ADITE-5)

Nesse sentido, vários trabalhos da literatura têm apresentado efeitos positivos do benzoato de sódio na fase aeróbia em silagens de cana-de-açúcar. Pedroso (2003) encontrou uma crescente diminuição do acúmulo de temperatura (ADITE-5) com o aumento da sua concentração. Não obstante, apenas o tratamento com maior dose (0,2% da MV) apresentou benefícios em comparação com o tratamento sem aditivos. Aquele autor observou que a inoculação com *L. plantarum* ($1,0 \times 10^6$ UFC/g) inclusive ocasionou aumento de 26% no ADITE-5, da silagem em comparação com o tratamento controle. No presente experimento, não foi observado aumento no acúmulo da temperatura com a inoculação de *L. plantarum* comparada ao tratamento controle, ambas apresentando ADITE-5 similares (Figura 1).

Devido às diferenças na frequência de tomada de dados durante o ensaio da estabilidade aeróbia, pode ficar comprometida a comparação direta dos valores obtidos nos diferentes trabalhos publicados. Em todo caso, pode-se comparar a magnitude de variação da temperatura da massa entre os tratamentos para cada ensaio.

Ao determinar o acúmulo da temperatura nos dez dias de exposição aeróbia ADITE-10 (Figura 2) foram observadas dinâmicas similares à corrida para a variável ADITE-5 entre os tratamentos. Constatou-se tendência de menor valor do acúmulo de temperatura por dez dias (ADITE-10) para o tratamento com associação das bactérias *L. plantarum* ao benzoato de sódio na dosagem alta, embora estas diferenças não tenham sido significativas com relação aos outros tratamentos.

Figura 2 - Acúmulo de temperatura durante por dez dias de exposição na fase aeróbia das silagens de cana-de-açúcar (ADITE-10)

Outra forma de avaliar a estabilidade da massa em condições aeróbias consiste na estimativa dos valores do pH e do teor de carboidratos solúveis ao longo do período pós-abertura (PITT et al., 1991; FILYA, 2003). De acordo com a Tabela 2, as silagens de cana-de-açúcar apresentaram tendência de aumento nos valores de pH durante o período de exposição aeróbia. Ao avaliar o efeito dos tratamentos, observou-se que as silagens inoculadas com *L. plantarum* e BAL e o tratamento controle, apresentaram os maiores valores de pH no dia zero do início da fase aeróbia ($P < 0,05$), situação que foi acompanhada pela redução linear no teor de carboidratos solúveis para todos os tratamentos durante a fase aeróbia (Tabela 2). No entanto, entre os tratamentos propostos para este experimento não foram observadas diferenças significativas no teor de carboidratos solúveis, sendo que em média foi observada redução de 34,3% nos primeiros cinco dias e de 74,8% nos dez dias após abertura dos silos. Essas tendências podem ser atribuídas à ação de microrganismos aeróbios, que iniciam o seu crescimento utilizando como substrato o ácido láctico e os carboidratos solúveis, com conseqüente aumento dos valores de pH (WEINBERG e MUCK, 1996). O tratamento da associação da bactéria *L. plantarum* ($5,0 \times 10^4$ UFC/g) ao benzoato de sódio na

dosagem alta, destacou-se por manter o pH constante durante os primeiros cinco dias de exposição aeróbia ($P < 0,05$).

Tabela 2 – Evolução dos valores de pH e de carboidratos solúveis da silagem de cana-de-açúcar durante o ensaio da estabilidade aeróbia

Tratamentos ¹	Tempo (dias)			Equação de Regressão ⁴	R ²
	0	5	10		
pH					
A. Controle	3,44 ^{Ab}	5,88 ^{Ba}	6,58 ^C	$y = 0,314*t + 3,73$	0,9071
B. <i>L. plantarum</i>	3,43 ^{Ab}	5,57 ^{Bab}	6,82 ^C	$y = 0,339*t + 3,5783$	0,9775
C. BAL ^{3,4}	3,44 ^{Ab}	5,85 ^{Ba}	6,44 ^C	$y = 0,30*t + 3,7433$	0,8907
D. Lact/Benzoato 0,05% ²	3,49 ^{Aa}	3,95 ^{Ac}	6,19 ^B	$y = 0,27*t + 3,1933$	0,8735
E. Lact/Benzoato 0,01% ²	3,48 ^{Aa}	5,08 ^{Bb}	6,59 ^C	$y = 0,311*t + 3,4950$	0,9997
F. BAL/Benzoato 0,01% ²	3,52 ^{Aa}	5,69 ^{Ba}	6,72 ^C	$y = 0,32*t + 3,71$	0,9594
Média	3,47	5,33	6,55		
C.V (%)	1,01	15,7	8,33		
Carboidratos solúveis (% da MS)					
A. Controle	9,69 ^A	6,45 ^B	2,12 ^C	$y = -0,757*t + 9,8717$	0,9931
B. <i>L. plantarum</i>	9,58 ^A	5,88 ^B	3,75 ^B	$y = -0,583*t + 9,318$	0,9764
C. BAL ^{3,4}	9,80 ^A	5,78 ^B	2,11 ^C	$y = -0,769*t + 9,7417$	0,9993
D. Lact/Benzoato 0,05% ²	10,12 ^A	6,72 ^B	3,20 ^C	$y = -0,692*t + 10,14$	0,9999
E. Lact/Benzoato 0,01% ²	8,88 ^A	7,38 ^B	2,23 ^C	$y = -0,665*t + 9,4883$	0,9087
F. BAL/Benzoato 0,01% ²	9,81 ^A	5,79 ^B	1,17 ^C	$y = -0,864*t + 9,91$	0,9984
Média	9,65	6,34	2,43		
C.V (%)	22,4	24,1	67,7		

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula linha na não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

²As doses dos aditivos estão expressas em com base na matéria verde;

³Produto fabricado por Alltech® Biotechnology; ⁴*L. plantarum*, *S. faecium* e *P. acidilactici*;

⁴ t = tempo em dias

Os resultados obtidos com a adição de benzoato de sódio no presente experimento, ratificam a informação apresentada por Siqueira et al. (2007a) que, utilizando uma dosagem maior (0,1% da MV) observaram inibição da elevação do valor de pH (3,7) após cinco dias de exposição aeróbia, em comparação ao tratamento controle (6,1). No entanto, naquele estudo os autores não observaram benefícios adicionais, quando o benzoato de sódio foi associado às bactérias *L. plantarum* ($1,5 \times 10^5$ UFC/g) e *L. buchneri* ($5,0 \times 10^4$ UFC/g).

Nas figuras 3 e 4 são apresentados os resultados referentes à estabilidade aeróbia e a temperatura máxima das silagens de cana-de-açúcar, respectivamente. A temperatura máxima e a baixa estabilidade aeróbia atingida pelos tratamentos controle e com inoculação com BAL sugerem intensa atividade microbiana na fase aeróbia para estes tratamentos. O tratamento da associação de *L.plantarum* ($5,0 \times 10^4$ UFC/g) ao benzoato de sódio na dosagem alta, apresentou o menor pico temperatura da silagem em condições de exposição ao ar ($P < 0,05$).

Figura 3 - Temperatura máxima (C°) atingida durante a fase de exposição aeróbia das silagens de cana-de-açúcar

No caso da estabilidade aeróbia das silagens de cana-de-açúcar, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que o valor médio obtido para este experimento foi de 41 horas, valores próximos aos reportados na literatura (PEDROSO, 2003; QUEIROZ, 2006; SANTOS, 2007; SIQUEIRA et al., 2007b).

Nesse sentido, Pedroso (2003) observou redução de 63% na estabilidade aeróbia quando silagens de cana-de-açúcar foram aditivadas com *L.plantarum* ($1,0 \times 10^6$). Os autores relatam aumento de 21% na estabilidade aeróbia com adição de

benzoato de sódio (0,2% da MV) em doses crescentes, em comparação com o tratamento controle. Utilizando dosagens similares de benzoato de sódio (0,05% da MV) o autor reportou valores similares na estabilidade aeróbia das silagens (41 horas) dos observados no presente trabalho. Siqueira et al. (2007b) avaliaram o efeito da associação de *L.plantarum* ao benzoato de sódio (0,1% da MV) e observaram valores de estabilidade aeróbia da massa (48 horas), também semelhantes aos encontrados no presente ensaio (43 horas), e com a adição de uréia (1,5% da MV) ou de hidróxido de sódio (1,0% da MV), não encontraram benefícios adicionais na estabilidade aeróbia das silagens de cana-de-açúcar, em comparação com o tratamento sem aditivos. No entanto, os resultados obtidos por Siqueira et al. (2007b) contrastam com o relatado por Pedroso (2003) que sugeriu como aditivos apropriados para estabilidade aeróbia para silagens de cana-de-açúcar o hidróxido de sódio (1,0% da MV), uréia (1,5% da MV) e o aditivo microbiano *L. buchneri* ($3,64 \times 10^5$ UFC/g). Santos (2007) também observou que com a adição de 1,5% de cal virgem na ensilagem houve aumento significativo na estabilidade aeróbia em silagens de cana-de-açúcar.

Figura 4 – Estabilidade aeróbia (EA) das silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e microbianos

De acordo com a Figura 5, as silagens de cana-de-açúcar que receberam a associação de *L. plantarum* ($5,0 \times 10^4$ UFC/g) e o benzoato de sódio na dosagem alta (0,05% da MV) apresentaram a maior recuperação de matéria seca nos primeiros cinco dias após abertura ($P < 0,05$). Todavia, embora esse tratamento tenha apresentado valor elevado na recuperação de matéria seca aos dez dias após abertura dos silos, não se revelou diferente dos demais naquela oportunidade. Por conseguinte, o eficiente desempenho encontrado para este tratamento na fase aeróbia, poderia ser explicado pela ação do benzoato de sódio na dosagem alta (0,05% da MV), já que no momento da abertura não foram observadas diferenças com o tratamento da inoculação isolada de *L. plantarum*. Dessa forma, observando o perfil fermentativo das silagens no momento da abertura (Tabela 8 do capítulo 1), poder-se-ia esperar que os microrganismos da fase aeróbia tivessem as mesmas condições para o seu desenvolvimento, na fase aeróbia, pois tiveram mesma disponibilidade de substrato no momento da abertura. Não obstante, os maiores resultados da recuperação da matéria seca neste tratamento, concordam com as outras variáveis da estabilidade aeróbia como o menor acúmulo de temperatura (ADITE-5), menor pico de temperatura e manutenção no valor de pH nos primeiros cinco dias após abertura dos silos. Não foram observados benefícios com inoculação de BAL, tanto isoladamente como associada ao benzoato de sódio (0,01% da MV), uma vez que não foram apresentadas diferenças na recuperação da matéria seca, comparativamente com o tratamento controle. Isto sugere que a presença das demais cepas de bactérias homoláticas em associação ao *L. plantarum* pode ter promovido interações que ocasionaram maior suscetibilidade à exposição aeróbia. Poder-se-ia sugerir que adição de BAL em relação ao *L. plantarum* exclusiva, poderia incrementar a produção de ácido lático, que reconhecidamente conduziria a menor estabilidade das silagens. Contudo, na tabela 8 do capítulo 1, não foi identificada diferença no teor de ácido lático entre a silagem eu receberam BAL e *L. plantarum*.

Figura 5 – Recuperação da matéria seca das silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e microbianos

De forma geral, os resultados obtidos para os tratamentos que foram inoculados com *L. plantarum* ($5,0 \times 10^4$ UFC/g), concordam com os resultados encontrados na literatura. Muck e Kung (1997) sumarizaram os resultados de estudos realizados com bactérias do ácido láctico entre os anos 1990 e 1995 e verificaram que menos de 30% dos experimentos observaram melhoras na estabilidade aeróbia das silagens. Ranjit e Kung Jr. (2000) ressaltaram que a deficiência deste aditivo para esta fase pode dever-se ao fato das leveduras serem tolerantes ao ácido produzido pelas bactérias do ácido láctico, bem como pela facilidade que estes microrganismos têm para usar como substrato o ácido láctico. Além disso, o ácido láctico produzido pelas bactérias homoláticas não se constituiu propriamente em adequado agente antimicrobiano (WOOLFORD, 1975).

Por outro lado, Weinberg e Muck (1996) indicaram que possivelmente os altos teores de carboidratos solúveis em combinação à alta concentração de ácido láctico produzidos nas silagens inoculadas com BAL, poderiam diminuir a presença de ácido acético que tem ampla ação antimicrobiana na forma não dissociada. Em todo caso,

para o presente experimento também não foram observadas diferenças significativas no teor de ácido acético das silagens estudadas. Além disso, não foram observadas diferenças no teor de carboidratos solúveis no momento da abertura dos silos com a inoculação destas bactérias, de maneira que, para este ensaio, não houve desvantagem nos tratamentos aditivados com BAL (Tabela 8 do capítulo 1).

No entanto, os efeitos obtidos com adição das bactérias *L.plantarum* no presente experimento estão de acordo com os resultados obtidos em outras culturas. Danner et al. (2003) avaliaram o efeito de diferentes aditivos na fase pós-abertura das silagens de milho e observaram com a inoculação de bactérias *L.plantarum* ($9,5 \times 10^6$ UFC/g) menor estabilidade aeróbia (20h), e menor teor de ácido acético, quando comparada com o tratamento sem aditivos. Ao mesmo tempo, os autores apontaram que a estabilidade aeróbia das silagens foi determinada prioritariamente pela concentração do ácido acético. Kung Jr e Ranjit (2001) avaliaram o efeito de vários aditivos na fermentação e estabilidade aeróbia de silagens de cevada e não observaram efeitos benéficos (155h) para as silagens inoculadas com *L.plantarum* ($0,5 \times 10^5$ UFC/g), em comparação com o tratamento controle (376h). Filya (2003) avaliou o efeito de aditivos microbianos em silagens de milho e sorgo e encontrou menor estabilidade aeróbia da massa no tratamento da aplicação isolada de *L.plantarum* ($1,0 \times 10^6$ UFC/g) para estas duas culturas. Neste mesmo experimento, para avaliar a estabilidade da massa após cinco dias da sua abertura, foram determinados os parâmetros de produção de CO_2 (g/kg da MS), elevação do pH e contagem de leveduras (UFC/g).

A associação de *L. plantarum* ($5,0 \times 10^4$ UFC/g) e benzoato de sódio na dosagem alta (0,05% da MV) para o presente experimento, além de resultar em menor temperatura máxima das silagens (Figura 3), conseguiu também controlar por maior tempo o segundo pico de temperatura (Figura 6), este atribuído normalmente ao crescimento tardio de colônias filamentosas de mofo (YAMASHITA et al., 1975 apud McDONALD et al., 1991). Nesse sentido, Kleinschmidt et al. (2005) também observaram efeitos benéficos com adição de benzoato de sódio (0,1% da MV) em silagens de milho, aumentando quatro vezes a estabilidade aeróbia em comparação com o tratamento sem aditivos.

Figura 6 – Evolução da temperatura das silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e microbianos durante a fase aeróbia (d*=dias)

Os resultados obtidos no presente experimento podem confirmar a afirmação de Pölönen (2000), de que o efeito antimicrobiano do benzoato de sódio é afetado pelo valor de pH do meio, uma vez que foram observados efeitos benéficos nos primeiros cinco dias da fase aeróbia para este experimento (Tabela 1), período que coincidiu com valor de pH menor do que o valor de pKa do ácido benzóico (4,2).

De forma geral, ao analisar os efeitos em conjunto da fase fermentativa e da fase aeróbia na recuperação da matéria seca, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 7). Não obstante, a associação de *L. plantarum* ($5,0 \times 10^4$ UFC/g) ao benzoato de sódio na dosagem alta (0,05% da MV), foi o único tratamento que apresentou dinâmica diferente para este experimento, uma vez que houve um efeito compensatório nas perdas ocasionadas na fase fermentativa, pelo melhor desempenho no ensaio da estabilidade aeróbia.

Figura 7 – Recuperação total acumulada da matéria seca das silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e microbianos, durante a fase de fermentação e exposição aeróbia

3.4.2 Valor nutritivo das silagens de cana-de-açúcar durante a fase aeróbia

No período pós-abertura puderam ser observadas alterações no valor nutritivo da silagem, resultado da interação entre disponibilidade de substrato, população de microrganismos na silagem na fase aeróbia e a atuação dos aditivos aplicados.

Na Tabela 3 são apresentadas às análises descritivas para todas as variáveis analisadas durante o ensaio da estabilidade aeróbia. De acordo com os resultados obtidos no presente experimento, houve efeito no valor nutritivo das silagens para ensaio da estabilidade aeróbia na maioria dos tratamentos para os diferentes tempos de avaliação, exceto para as variáveis proteína bruta, cinzas e carboidratos solúveis.

Tabela 3 – Análise descritiva das variáveis químico-bromatológicas no ensaio da estabilidade aeróbia

Variável ¹	Efeitos		
	Tratamento	Tempo	Tratamento x Tempo
FDN	0,302	*	**
FDA	0,485	*	*
LIG	0,128	*	*
DVIVMS	**	*	*
PB	**	*	0,199
Cinzas	**	*	0,114
CHO's	0,875	*	0,516
pH	**	*	**

CHO'S= carboidratos solúveis; LIG=lignina;
 *(P<0,01);**(P<0,05)

Na Tabela 4 podem ser observados os valores das frações fibrosas durante o ensaio da estabilidade aeróbia. Houve tendência de aumento das variáveis de FDN e FDA para todos os tratamentos ao longo do tempo (P<0,05). Não obstante, para o tratamento da associação de *L.plantarum* ($5,0 \times 10^4$ UFC/g) e benzoato de sódio na dosagem alta (0,05% da MV), observou-se menor aumento na fração fibrosa nos primeiros cinco dias após abertura (P<0,05). Durante este mesmo período, Siqueira et al. (2007a) observaram também menores incrementos no valor de FDN para os tratamentos da aplicação de benzoato de sódio (0,1% da MV) e na associação com *L. plantarum* (1,2 e 1,3%, respectivamente), em comparação com o tratamento sem aditivos (7,9%). Outros resultados positivos têm sido reportados na literatura utilizando diferentes aditivos químicos em silagens de cana-de-açúcar. Nesse sentido, Santos (2007) observou com aplicação de cal virgem (1,5% da MV) manutenção da fração de FDN e de hemicelulose, durante dez dias após abertura dos silos. Balieiro Neto et al. (2005) com aplicação de 2,0% de cal virgem, não observaram aumento no teor de FDN durante nove dias após abertura dos silos.

Tabela 4 - Evolução dos teores de FDN e de FDA das silagens de cana-de-açúcar durante o ensaio da estabilidade aeróbia

Tratamentos ¹	Tempo (dias)			Equação de Regressão ⁴	R ²
	0	5	10		
FDN (% da MS)					
A. Controle	55,41 ^A	62,98 ^{Ba}	67,59 ^C	$y = 1,218*t + 55,903$	0,9807
B. <i>L. plantarum</i>	55,46 ^A	62,47 ^{Ba}	67,67 ^C	$y = 1,221*t + 55,762$	0,9927
C. BAL ^{3,4}	55,86 ^A	63,15 ^{Ba}	67,61 ^C	$y = 1,175*t + 56,332$	0,9810
D. Lact/Benzoato 0,05% ²	57,22 ^A	58,68 ^{Ab}	65,29 ^B	$y = 0,807*t + 56,362$	0,8805
E. Lact/Benzoato 0,01% ²	56,48 ^A	61,73 ^{Ba}	66,86 ^C	$y = 1,038*t + 56,5$	0,9999
F. BAL/Benzoato 0,01% ²	55,93 ^A	62,63 ^{Ba}	66,66 ^C	$y = 1,073*t + 56,375$	0,9798
Média	56,06	61,94	66,95		
C.V (%)	1,84	3,27	2,60		
FDA (% da MS)					
A. Controle	38,24 ^A	43,11 ^{Ba}	46,89 ^C	$y = 0,865*t + 38,422$	0,9947
B. <i>L. plantarum</i>	38,22 ^A	42,84 ^{Ba}	47,00 ^C	$y = 0,878*t + 38,297$	0,9991
C. BAL ^{3,4}	38,12 ^A	43,20 ^{Ba}	46,53 ^C	$y = 0,841*t + 38,412$	0,9858
D. Lact/Benzoato 0,05% ²	39,38 ^A	40,65 ^{Ab}	45,28 ^B	$y = 0,59*t + 38,820$	0,9024
E. Lact/Benzoato 0,01% ²	38,85 ^A	42,32 ^{Ba}	46,77 ^C	$y = 0,792*t + 38,687$	0,9949
F. BAL/Benzoato 0,01% ²	38,25 ^A	43,60 ^{Ba}	45,95 ^C	$y = 0,77*t + 38,750$	0,9518
Média	38,51	42,62	46,40		
C.V (%)	2,09	3,10	2,00		

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

²As doses dos aditivos estão expressas em com base na matéria verde.

³Produto fabricado por Alltech® Biotechnology; ⁴*L. plantarum*, *S. faecium* e *P. acidilactici*.

⁴t = tempo em dias

Do mesmo modo como para as frações de FDN, os teores de FDA apresentaram aumentos significativos ao longo do período de pós-abertura (P<0,05). No entanto, para o tratamento da associação de *L. plantarum* (5,0x10⁴ UFC/g) e benzoato de sódio na dosagem alta (0,05% da MV), foram observados menores incrementos com relação aos outros tratamentos aplicados (P<0,05). Esse efeito é suposto, já que com o desaparecimento dos principais substratos como carboidratos solúveis e o ácido láctico pela ação de microrganismos nesta fase, as frações fibrosas da silagem sofreram concentração relativa (PITT et al., 1991).

Com relação à digestibilidade da MS das silagens, mudanças nas proporções da fração fibrosa das silagens provocaram alterações nesta variável (Tabela 3). Como pode ser observado na Tabela 5, a maioria dos tratamentos apresentaram diminuição na digestibilidade ao longo do período pós-abertura, exceto para a associação de

L.plantarum ($5,0 \times 10^4$ UFC/g) e benzoato de sódio na dosagem alta (0,05% da MV), que manteve os valores de digestibilidade nos primeiros cinco dias pós-abertura em comparação com outros tratamentos. Este fato pode ser explicado pela manutenção do menor valor da fração fibrosa nos primeiros cinco dias após abertura dos silos, observada para este tratamento (Tabela 4). No entanto, os elevados teores de FDN, FDA e lignina (Tabelas 4 e 5), poderiam explicar a menor digestibilidade para este tratamento no momento da abertura dos silos (dia zero). Outros trabalhos realizados com agentes químicos nesta fase têm observado efeitos hidrolíticos e antifúngicos em silagens de cana-de-açúcar. Santos (2007) encontrou elevados coeficientes de digestibilidade durante a fase aeróbia com doses de 1,5% de cal virgem. Da mesma forma Balieiro Neto et al. (2005) observaram discreto aumento na digestibilidade da matéria seca com adição de 1,0% e 2,0% de cal virgem, obtendo valores médios de 71,6 e 78,9%, respectivamente.

Tabela 5 - Evolução da digestibilidade e teor de lignina durante o período pós-abertura em silagens de cana-de-açúcar

Tratamentos ¹	Tempo (dias)			Equação de Regressão ⁴	R ²
	0	5	10		
DVIVMS (% da MS)					
A. Controle	51,8 ^{Aabc}	45,81 ^{Bb}	42,72 ^{Cb}	$y = -0,913*t + 51,358$	0,9664
B. <i>L. plantarum</i>	52,1 ^{Aab}	45,88 ^{Bb}	41,32 ^{Cb}	$y = -1,08*t + 51,840$	0,992
C. BAL ^{3,4}	52,4 ^{Aa}	45,68 ^{Bbc}	41,90 ^{Cb}	$y = -1,058*t + 51,977$	0,9736
D. Lact/Benzoato 0,05% ²	50,8 ^{Ad}	50,40 ^{Aa}	44,78 ^{Ba}	$y = -0,609*t + 51,728$	0,8075
E. Lact/Benzoato 0,01% ²	51,3 ^{Aadc}	46,71 ^{Bb}	41,26 ^{Cb}	$y = -1,011*t + 51,502$	0,998
F. BAL/Benzoato 0,01% ²	51,1 ^{Adc}	44,14 ^{Bc}	44,75 ^{Ca}	$y = -0,642*t + 49,897$	0,6793
Média	51,65	46,44	42,79		
C.V (%)	1,26	5,27	4,61		
LIGNINA (% da MS)					
A. Controle	6,65 ^{Ac}	6,74 ^A	7,32 ^{Ba}	$y = 0,067*t + 6,5683$	0,8487
B. <i>L. plantarum</i>	6,76 ^{Abc}	6,77 ^A	7,55 ^{Ba}	$y = 0,079*t + 6,6317$	0,7595
C. BAL ^{3,4}	6,53 ^{Ac}	6,76 ^A	7,27 ^{Ba}	$y = 0,074*t + 6,4833$	0,9545
D. Lact/Benzoato 0,05% ²	7,11 ^{Aa}	6,58 ^B	6,91 ^{Ab}	$y = -0,02*t + 6,9667$	0,1396
E. Lact/Benzoato 0,01% ²	6,82 ^{Abc}	6,74 ^A	7,56 ^{Ba}	$y = 0,074*t + 6,6700$	0,6698
F. BAL/Benzoato 0,01% ²	7,08 ^{Aab}	7,14 ^A	6,78 ^{Ab}	$y = -0,030*t + 7,1500$	0,6048
Média	6,82	6,79	7,23		
C.V (%)	4,26	4,46	5,23		

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

²As doses dos aditivos estão expressas em com base na matéria verde.

³Produto fabricado por Alltech® Biotechnology; ⁴*L. plantarum*, *S. faecium* e *P. acidilactici*.

⁴ t = tempo em dias

Na Tabela 6 são apresentados os resultados referentes à fração protéica e mineral das silagens de cana-de-açúcar, durante o período pós-abertura. De acordo com os resultados obtidos para o presente experimento, não houve diferenças significativas nos teores de proteína entre os tratamentos, porém se observou acréscimo desta variável nos primeiros cinco dias pós-abertura (P<0,05). Estes resultados concordam com os relatados por Siqueira et al. (2007a) que, avaliando o efeito de aditivos químicos e microbianos, encontraram aumento da fração protéica de 1,4%, para 2,7% da MS nos primeiros cinco dias pós-abertura. As frações protéicas e cinzas também sofreram aumentos relativos provavelmente, em decorrência do desaparecimento da fração de carboidratos solúveis. Ainda segundo a Tabela 4,

observa-se aumento semelhante no teor de cinzas das silagens durante o período pós-abertura dos silos. Ao contrario, o tratamento da associação de *L. plantarum* ($5,0 \times 10^4$ UFC/g) e benzoato de sódio na dosagem alta (0,05% da MV) manteve os teores de cinzas durante os primeiros cinco dias pós-abertura, sendo que esta situação pode ser atribuída ao menor desaparecimento de outras frações da matéria seca das silagens, em comparação com os outros tratamentos.

Tabela 6 - Evolução do teor proteína bruta e cinzas durante o período pós-abertura em silagens de cana-de-açúcar

Tratamentos ¹	Tempo (dias)			Equação de egressão ⁴	R ²
	0	5	10		
PROTEÍNA BRUTA (% da MS)					
A. Controle	4,97 ^A	5,66 ^B	5,67 ^B	$y = 0,07*t + 5,0833$	0,7607
B. <i>L. plantarum</i>	4,92 ^A	5,60 ^B	5,83 ^B	$y = 0,091*t + 4,995$	0,9246
C. BAL ^{3,4}	5,06 ^A	5,65 ^B	5,87 ^B	$y = 0,081*t + 5,1217$	0,935
D. Lact/Benzoato 0,05% ²	4,97 ^A	5,05 ^A	5,61 ^B	$y = 0,064*t + 4,890$	0,8421
E. Lact/Benzoato 0,01% ²	5,10 ^A	5,42 ^A	5,76 ^A	$y = 0,066*t + 5,0967$	0,9997
F. BAL/Benzoato 0,01% ²	5,05 ^A	5,51 ^B	6,27 ^B	$y = 0,122*t + 5,0$	0,9802
Média	5,01	5,48	5,83		
C.V (%)	2,59	5,84	6,77		
CINZAS (% da MS)					
A. Controle	4,71 ^A	5,62 ^{Ba}	6,01 ^C	$y = 0,13x + 4,7967$	0,9494
B. <i>L. plantarum</i>	4,68 ^A	5,55 ^{Ba}	6,14 ^C	$y = 0,146x + 4,7267$	0,9879
C. BAL ^{3,4}	4,84 ^A	5,62 ^{Ba}	6,18 ^C	$y = 0,134x + 4,8767$	0,9911
D. Lact/Benzoato 0,05% ²	4,77 ^A	4,83 ^{Ab}	5,78 ^B	$y = 0,101x + 4,6217$	0,7944
E. Lact/Benzoato 0,01% ²	4,87 ^A	5,38 ^{Ba}	6,04 ^C	$y = 0,117x + 4,845$	0,9946
F. BAL/Benzoato 0,01% ²	4,91 ^A	5,55 ^{Ba}	6,24 ^C	$y = 0,133x + 4,9017$	0,9995
Média	4,80	5,43	6,07		
C.V (%)	2,90	6,70	5,74		

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

²As doses dos aditivos estão expressas em com base na matéria verde.

³Produto fabricado por Alltech® Biotechnology; ⁴*L. plantarum*, *S. faecium* e *P. acidilactici*.

⁴ t = tempo em dias

3.5 Conclusões

Na produção de silagens de cana-de-açúcar são necessários aditivos que ajudem a melhorar a estabilidade aeróbia. O tratamento que não recebeu nenhum tipo de aditivo foi observado rápido aquecimento da massa e elevação do pH, evidenciando que silagens de cana-de-açúcar são bastante propensas a processos de deterioração nesta fase da conservação.

A inoculação com bactérias produtoras de ácido láctico foi pouco efetiva em melhorar a estabilidade das silagens de cana-de-açúcar e em reduzir as perdas associadas por deterioração aeróbia. Além disso, quando associadas ao benzoato de sódio na dosagem baixa (0,01% da MV) estas bactérias não apresentaram benefícios adicionais para a fase de pós-abertura, em comparação o tratamento controle.

O menor pico e acúmulo de temperatura observado na fase aeróbia, a manutenção do pH e a maior recuperação da matéria seca (ADITE-5) da silagem tratada com benzoato de sódio (0,05% da MV) e *L.plantarum* ($5,0 \times 10^4$ UFC/g) são indicativos que sugerem, neste tratamento, menor atividade de microrganismos aeróbios, durante os primeiros cinco dias do ensaio de estabilidade aeróbia. Além disso, o melhor desempenho das variáveis de estabilidade aeróbia para este tratamento refletiu em menor alteração do valor nutritivo das silagens para o presente experimento.

Por conseguinte, a utilização de benzoato de sódio na dosagem 0,05% da MV pode ser utilizada como alternativa para melhorar a estabilidade aeróbia das silagens de cana-de-açúcar e preservar por maior tempo o seu valor nutritivo.

De forma geral, os resultados obtidos indicam que dependendo da eficiência dos aditivos na estabilidade aeróbia, também se podem esperar efeitos na manutenção nos parâmetros químico-bromatológicos das silagens na fase pós-abertura.

Em conjunto estes resultados encontrados motivam a realização de novas pesquisas na associação dos aditivos químicos e microbianos, que no caso de benzoato de sódio, podem ser buscados efeitos sinérgicos com outros aditivos na fase fermentativa, uma vez que este aditivo químico vem apresentando resultados satisfatórios na fase aeróbia do processo de conservação.

REFERENCIAS

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

BALIEIRO NETO, G.; SIQUEIRA, G.R.; NOGUEIRA, J.R.; REIS, R.A.; SILVA, D.N.; ROTH, A.P.T.P.; ROTHE, M.T.P. Pós-abertura de silagem de cana-de-açúcar cv. IAC/2480 (*Saccharum officinarum* L.) com doses de óxido de cálcio. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. **Anais ...** Goiânia: SBZ, 2005. 1 CD-ROM

BERZAGHI, P.; COZZI, G.; ANDRIGHETTO, I. The use of near infrared analysis for in situ studies. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 80, n. 12, p. 3263-3270, 1997.

COZZOLINO, D.; ACOSTA, Y.; GARCIA, J. Application of near infrared reflectancy spectroscopy (NIRS) to forage evaluation in Uruguay. In: INTERNATIONAL GRASSLANDS CONGRESS, 19., 2001, São Pedro. **Proceedings ...** Piracicaba: FEALQ, 2001.p. 370.

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

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, p. 350, 1956.

FILYA, I. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silage. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 85, p. 3575-3581, 2003.

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

JUNQUEIRA, M.C. **Aditivos químicos e inoculantes microbianos em silagens de cana-de-açúcar**: perdas na conservação, estabilidade aeróbia e o desempenho de animais. 2006. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens)– Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

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

KUNG, L. Jr. **Preparation of silage water extracts for chemical analysis**: standard operating procedure, 001 2.03.96) Newark: Ed. University of Delaware, Ruminant Nutrition Lab., 1996.

KUNG, L. Jr.; RANJIT, N.K. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 84, p. 1149-1155, 2001.

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

MUCK, R.E.; KUNG, L., Jr. Effects of silage additives on ensiling. In: SILAGE: FIELD TO FEEDBUNK, 1997, Hershey. **Proceedings ...** Hershey: NRAES, 1997. p.187-199.

NUSSIO, L.G.; SCHMIDT, P.; PEDROSO, A.F. Silagem de cana-de-açúcar. In: PEIXOTO, A.M.; MOURA, J.C.; SILVA, S.C. **Produção animal em pastagens**. Piracicaba: FEALQ, 2003. p. 187 - 205.

PEDROSO, A.F. **Aditivos químicos e microbianos como indicadores da produção de etanol em silagens de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2003. 120p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

PITT, R.E.; MUCK, R.E.; PICKERING, N.B. A model of aerobic fungal growth in silage.2. Aerobic stability. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 46, p. 301-312, 1991.

PÖLÖNEN, I. **Preservation efficiency of formic acid and benzoic acid in the ensiling of slaughterhouse by-products and their subsequent metabolism in farmed for animals**. 2000. 54 p. Academic dissertation- Faculty of Agriculture and Forestry, University of Helsinki, Helsinki, 2000.

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

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

SANTOS, M.C. **Aditivos químicos para o tratamento da cana-de-açúcar *in natura* e ensilada (*Saccharum officinarum* L.)**. 2007. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistics. Cary, 1999. 965 p.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. Viçosa: UFV, Impr. Univ., 1981. 166 p.

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

SIQUEIRA, G.R.; REIS, R.A; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; BERNARDES, T.F.; PIRES, A.J.V.; ROTH, M.T.P.; ROTH, A.P.T.P. Associação entre aditivos químicos e bacterianos na ensilagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 4, p. 789-798, 2007a.

SIQUEIRA, G. R.; REIS, R.A.; ITURRINO, R.P.S.; 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, n. 6, p. 2000-2009, 2007b. Suplemento.

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

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.

WOOLFORD, M.K. **The silage fermentation**. New York: Marcel Dekker, 1984.350 p.