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

**Estratégias de controle da deterioração aeróbia em silagem de milho e
seu valor alimentício para vacas em lactação**

Rafael Camargo do Amaral

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

**Piracicaba
2011**

Rafael Camargo do Amaral
Zootecnista

Estratégias de controle da deterioração aeróbia em silagem de milho e seu valor alimentício para vacas em lactação

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

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

**Piracicaba
2011**

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

Amaral, Rafael Camargo do

Estratégias de controle da deterioração aeróbia em silagem de milho e seu valor alimentício para vacas em lactação / Rafael Camargo do Amaral. - - Piracicaba, 2011.

173 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Lactação animal 2. Leite - Produção 3. Micotoxinas 4. Milho 5. Silagem - Deterioração 6. Vacas 7. Valor nutritivo I. Título

CDD 636.08552
A485e

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

Perseverança, vontade, proteção, fé, amor, felicidade e união...
Isso não são apenas palavras são Graças.
Graças que ocupam e engrandecem o lugar mais soberano do
ser humano... Oração.

Ana Maria significa...

...Mulher cheia de graça, que ocupa o primeiro lugar, que é soberana.

A minha filha dedico e ofereço esta obra por mostrar que...

O sonhar é possível, apesar de existirem pedras no caminho...

...concebemos o que desejamos

...e as pedras que encontramos...

...apenas fortaleceram nosso castelo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre estar presente ao meu lado, dando-me saúde e força de vontade para alcançar todos meus objetivos, pela oportunidade de vivenciar as melhores dádivas oferecidas na vida, a família e os amigos.

À minha querida esposa Gislaine, por sempre estar presente na minha vida, por todo amor e amizade dedicados a minha pessoa em todos esses anos, por sua generosidade e paciência. A lacuna que faltava na minha vida, você completou, TE AMO do fundo do meu coração.

À minha mãe Rosângela e ao meu irmão Waldomiro, por todo carinho, atenção e amor dedicados a nossa família. Ao meu pai Flávio, pelos conselhos e pela amizade. Aos meus familiares, meu sogro José Antonio, minhas cunhadas Ariane e Beatriz, meus cunhados Fernando e Rodrigo, minha tia Malu, meus sobrinhos Felipe, Bianca, Maria Eduarda e Amabyli, pela grande amizade, amor e incentivo em todos esses anos.

Ao amigo e irmão Thiago, por todos os ensinamentos, mais principalmente pela grande amizade e companheirismo. Véio, muito obrigado por tudo.

Ao grande amigo e parceiro Ary, pela grande amizade formada nesses anos, pelos conselhos e por toda atenção prestada.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) e ao Departamento de Zootecnia, por todas as oportunidades e experiências profissionais que jamais serão esquecidas.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por acreditar no meu trabalho desde a época da graduação, por proporcionar toda minha evolução intelectual.

Ao Prof. Dr. Luiz Gustavo Nussio, pela grande amizade formada, pelo exemplo de dedicação ao ensino, pela competência à formação de profissionais capacitados, não apenas tecnicamente, mais também capacitados para vida como um todo.

À contribuição de todos os professores do Departamento de Zootecnia na execução deste trabalho e pelo auxílio na minha formação profissional, em especial: Prof. Dr. Flávio Portela dos Santos, Prof. Dr. Wilson R. S. Mattos e Prof. Dr. Roberto Sartori Filho.

Aos grandes nomes e amigos da conservação de forragens no Brasil: Prof. Dr. Ricardo Andrade Reis, Prof. Dr. Clóves Cabreira Jobim, Prof. Dr. Antonio Ricardo Evangelista e Dr. Gustavo Resende Siqueira, por todo conhecimento gerado para nossa área.

Aos integrantes e ex-integrantes da EQUIPE QUALIDADE E CONSERVAÇÃO DE FORRAGENS: Adir (Haddyr), Álvaro (Albarito), Daniel, Edward, Gisele (*in memoriam*), Janaína (Jana), João (ah..João?), Maity (Máitii), Porcão (Pork's), Vanessa (Van), Alonso, Ana Luiza, Guilherme, Jhones, Lucas, Mateus, Oscar, Patrick, Rodrigo Dener, Rodrigo Goulart, Zé Leonardo, Bãba, Garrotilho, Igual, K-cildes, K-lha, Litrão, mato Grosso, Mincóxa, Pingona, Piraíba, Sentença, Sortudo, Surucucu e Toki Mágico. O maior aprendizado nesses anos foi ter o prazer da convivência com cada um de vocês. MUITO OBRIGADO.

Ao Dr. Marcos Antônio Penatti, pela amizade nesses anos, pelas oportunidades de conhecimento durante os cursos no centro de treinamento e pelos auxílios na construção das instalações para as vacas de leite.

Ao técnico Carlos César Alves, pela amizade formada e pelos auxílios na condução das análises laboratoriais. À amiga Tânia (Tanéca) por todos os cafezinhos e todas as brincadeiras que tornaram os dias mais alegres.

Aos integrantes do CPZ e funcionários do Centro de Treinamento (CT) : Di-prata, Mocotó, Volante, Néco, Tim, Vagner, pela amizade e auxílio na condução das atividades.

À todos que de alguma maneira, fizeram acontecer e colaboraram para a realização deste trabalho.

Nenhum de nós é tão inteligente quanto todos nós juntos.

(Warren Bennis)

SUMÁRIO

RESUMO.....	15
ABSTRACT	17
LISTA DE FIGURAS	19
LISTA DE TABELAS	23
1 INTRODUÇÃO	27
Referências	29
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1 Fatores que influenciam na deterioração aeróbia	31
2.1.1 Influxo de ar no silo	31
2.1.2 A vedação e a penetração de ar	31
2.1.3 O desabastecimento do silo e o influxo de ar	33
2.2 Aditivos controladores da deterioração aeróbia	34
2.2.1 Aditivos microbiológicos	34
2.2.2 Aditivos químicos.....	36
2.3 Microrganismos envolvidos com a deterioração aeróbia.....	37
2.3.1 Fungos	37
2.3.2 Condições para desenvolvimento.....	38
2.3.3 Os fungos e a silagem.....	39
2.4 Ocorrência de micotoxinas em silagens.....	41
2.4.1 Presença de micotoxinas no campo.....	42
2.4.2 Presença de micotoxinas durante o período fermentativo da silagem	44
2.4.3 Presença de micotoxinas no período de pós abertura do silo	45
Referências	48

3 DETERIORAÇÃO AERÓBIA EM SILAGENS DE MILHO VEDADAS POR DIFERENTES TIPOS DE LONAS E USO DE ADITIVOS NA CAMADA SUPERIOR DOS SILOS	55
Resumo	55
Abstract	56
3.1 Introdução.....	57
3.2 Materias e Métodos	58
3.2.1 Ensilagem e tratamentos	58
3.2.2 Amostragens e variáveis analisadas na forragem fresca.....	60
3.2.3 Perdas de matéria seca durante o armazenamento	62
3.2.4 Perfil de temperatura no armazenamento.....	62
3.2.5 Amostragens e variáveis analisadas na silagem	63
3.2.6 Estabilidade aeróbia das silagens	63
3.2.7 Análises estatísticas	65
3.3 Resultados.....	65
3.3.1 Características da forragem no momento da ensilagem	65
3.3.2 Temperatura da silagem durante o armazenamento	66
3.3.3 Características fermentativas e microbiológicas das silagens	69
3.3.4 Valor nutritivo das silagens na abertura dos silos.....	72
3.3.5 Estabilidade aeróbia das silagens	74
3.4 Discussão	80
3.4.1 Características da forragem no momento da ensilagem	80
3.4.2 Temperatura da silagem durante o armazenamento	81
3.4.3 Características fermentativas e microbiológicas das silagens	82
3.4.4 Valor nutritivo das silagens na abertura dos silos.....	84
3.4.5 Estabilidade aeróbia das silagens	85

3.5 Conclusões.....	88
Referências	88
4 ESTRATÉGIAS DE PROTEÇÃO DO FILME PLÁSTICO UTILIZADO NO PROCESSO DE VEDAÇÃO DO SILO	93
Resumo	93
Abstract	94
4.1 Introdução	95
4.2 Materias e Métodos	96
4.2.1 Ensilagem e tratamentos.....	96
4.2.2 Amostragens e variáveis analisadas na forragem fresca	97
4.2.3 Perdas de matéria seca durante o armazenamento.....	99
4.2.4 Perfil de temperatura no armazenamento	99
4.2.5 Amostragens e variáveis analisadas na silagem.....	99
4.2.6 Estabilidade aeróbia das silagens	100
4.2.7 Análises estatísticas	101
4.3 Resultados	101
4.3.1 Características da forragem no momento da ensilagem	101
4.3.2 Temperatura da silagem durante o armazenamento.....	102
4.3.3 Características fermentativas e microbiológicas das silagens.....	103
4.3.4 Valor nutritivo das silagens na abertura dos silos	104
4.3.5 Estabilidade aeróbia das silagens	105
4.4 Discussão	106
4.4.1 Características da forragem no momento da ensilagem	106
4.4.2 Temperatura da silagem durante o armazenamento.....	107
4.4.3 Características fermentativas e microbiológicas das silagens.....	107

4.4.4 Valor nutritivo das silagens na abertura dos silos.....	108
4.4.5 Estabilidade aeróbia das silagens	109
4.5 Conclusões	110
Referências.....	110
5 DESEMPENHO E QUALIDADE DO LEITE DE VACAS DE ALTA PRODUÇÃO EM FUNÇÃO DO USO DE SILAGENS DE MILHO CONFECCIONADAS A PARTIR DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE VEDAÇÃO.....	113
Resumo	113
Abstract	114
5.1 Introdução.....	115
5.2 Materias e Métodos	116
5.2.1 Ensilagem e tratamentos	116
5.2.2 Amostragens e variáveis analisadas na forragem fresca.....	117
5.2.3 Perfil de temperatura no armazenamento.....	119
5.2.4 Avaliações nos silos	119
5.2.5 Propriedades físicas dos filmes plásticos	122
5.2.6 Animais e instalações experimentais.....	122
5.2.7 Rações experimentais e manejo alimentar.....	123
5.2.8 Controle leiteiro e análises no leite	125
5.2.9 Comportamento Ingestivo dos animais.....	126
5.2.10 Digestibilidade <i>in vivo</i>	127
5.2.11 Análises estatísticas	128
5.3 Resultados.....	129
5.3.1 Características da forragem no momento da ensilagem	129
5.3.2 Avaliações na silagem no armazenamento e descarregamento dos silos.....	130
5.3.3 Propriedades físicas dos filmes plásticos	136

5.3.4 Desempenho animal.....	138
5.3.5 Ocorrência de aflatoxinas na dieta e no leite.....	148
5.3.6 Comportamento ingestivo dos animais.....	152
5.3.7 Digestibilidade <i>in vivo</i> das dietas.....	154
5.4 Discussão.....	156
5.4.1 Características da forragem no momento da ensilagem	156
5.4.1 Avaliações na silagem no armazenamento e descarregamento dos silos	157
5.4.2 Propriedades físicas dos filmes plásticos	160
5.4.3 Desempenho animal.....	162
5.4.4 Ocorrência de aflatoxinas na dieta e no leite.....	164
5.4.5 Comportamento ingestivo dos animais.....	166
5.4.6 Digestibilidade <i>in vivo</i> das dietas.....	166
5.5 Conclusões.....	167
6 CONCLUSÕES GERAIS.....	169
Referências	169

RESUMO

Estratégias de controle da deterioração aeróbia em silagem de milho e seu valor alimentício para vacas em lactação

Foram realizados três experimentos visando avaliar diferentes estratégias de vedação. No experimento I, objetivou-se avaliar as características fermentativas e a estabilidade aeróbia das silagens de milho vedadas com diferentes tipos de filme plástico, aplicação na camada superior de aditivo químico ou microbiano e proteção do filme com terra, visando o controle da deterioração aeróbia. Houve diferença para o tipo de filme plástico utilizado, onde foi observado maiores valores de temperatura para as silagens vedadas com o filme de polietileno. As silagens aditivadas com benzoato de sódio ou *Lactobacillus buchneri* apresentaram menores perdas de matéria seca e menores valores de pH com relação a silagem não aditivada. Apenas em três amostras foram detectadas a presença de aflatoxina B1. No experimento II, objetivou-se avaliar estratégias de vedação, com base na proteção do filme plástico, visando o controle da deterioração aeróbia nas zonas periféricas do silo e o comportamento dessas silagens durante o período de aerobiose. No momento da abertura dos silos a contagem de leveduras foi maior para a silagem que não teve proteção sobre o filme plástico. A digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca apresentou diferença, sendo que as silagens que receberam proteção sobre a lona apresentaram os maiores valores em relação a silagem sem proteção sobre o filme plástico. No experimento III, objetivou-se avaliar diferentes tipos de filmes plásticos na vedação de silos horizontais e suas interferências relativas a qualidade das silagens, ao desempenho de vacas em lactação e qualidade do leite produzido. As maiores quantidades de silagem descartada foram para os tratamentos com a lona preta e lona dupla face. As maiores taxas de permeabilidade da lona ao oxigênio foram observadas para os filmes dupla face e preto de material virgem. A dieta que continha silagem proveniente do silo vedado com lona preta de material reciclado com proteção de bagaço apresentou o maior valor para a produção de leite, sendo a menor média verificada para o tratamento que continha filme plástico preto de material virgem. Ao longo das semanas de experimentação foi verificada a presença de aflatoxina B1 em todas as silagens. A partir do mês de agosto foi verificada positividade para aflatoxina M1 entre as amostras de leite. A dieta que continha silagem proveniente do silo vedado com lona preta de material reciclado e proteção de bagaço apresentou o maior valor de digestibilidade, tanto da matéria seca como da matéria orgânica das dietas. O polímero de poliamida, a proteção da lona com terra ou bagaço e o uso de aditivos como *Lactobacillus buchneri* ou benzoato de sódio reduzem a deterioração aeróbia de silagens de milho. A proteção da silagem contra o aquecimento, pelo uso da poliamida ou da proteção com bagaço, auxilia na obtenção de silagem de melhor qualidade e facilita o manejo pela redução da mão-de-obra no descarte de silagem deteriorada. O desempenho animal é afetado pela estratégia de vedação utilizada, podendo até mesmo afetar qualidade higiênica do leite produzido.

Palavras-chave: Camada superior do silo; Deterioração aeróbia; Filme plástico; Micotoxinas; Produção de leite; Silagem de milho

ABSTRACT

Strategies to control top losses in corn silage and the nutritive value responses in Holstein cows

Three experiments were conducted to evaluate different strategies to cover the silo. The experiment I evaluate the fermentation profile and aerobic stability of corn silage covered with different types of plastic sheets, applying additives in the top layer and, protect the film with soil, to reduce the top losses in corn silages. There was a difference between the plastic sheets, which was observed higher temperature values for the corn silage covered with the polyethylene film. The use of additives showed lower DM losses and pH values in relation the control silage. The presence of aflatoxin B1 was detected in three samples from only the silage covered with polyethylene film, without additive and without soil layer over the external surface of the film. The experiment II was designed to study the effectiveness of covering methods to reduce the top losses in maize silages. The yeast count was higher for control silage. The dry matter digestibility showed higher values for the protected silos in relation to unprotected treatment. The experiment III was designed to evaluate different plastic sheets to seal horizontal silos and their influence on the silage quality, Holstein dairy cows performance and milk quality. There was no difference between treatments for the fermentation profile. The silages temperatures values in the silo top and top side increase in relation to samples in the panel center. The deteriorated discarded silage showed high values in silages covered with Black virgin polyethylene and black-on-with polyethylene films. The same plastics films showed the highest rates of oxygen permeability. The diet containing silage from black recycled polyethylene with bagasse protection showed the highest value for milk production, with the smallest average found in the black virgin polyethylene treatment. Over the experimentation weeks was verified aflatoxin B1 presence in silage. The diet containing silage from black recycled film protect with bagasse treatment showed the highest digestibility of both dry matter and organic matter.

Keywords: Aerobic deterioration; Corn silage; Mycotoxins; Milk production; Plastic sheet; Silo upper layer

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Detalhamento dos tratamentos utilizados na confecção das silagens.	59
Figura 2 - Aplicação do aditivo na massa de forragem para o abastecimento dos 25 cm finais da caixa d'água.	59
Figura 3 - A) Compactação da forragem por meio de pisoteio humano; B) Detalhe da vedação da lona com fita adesiva e de borracha; C) Visão geral da área experimental.	60
Figura 4 - Abertura dos silos e retirada da camada superior para amostragens.	63
Figura 5 - Avaliação da estabilidade aeróbia das silagens e do ambiente.	64
Figura 6 - Variação temporal da temperatura em silagens de milho, localizadas na zona periférica dos silos, sob a vedação de filme de polietileno (PE) ou filme de polietileno+poliamida (PA) (média incluindo os aditivos e terra).....	67
Figura 7 - Variação temporal da temperatura em silagens de milho, localizadas na zona periférica dos silos, sob o uso de aditivos controladores da deterioração aeróbia (média incluindo lonas e cobertura)	68
Figura 8 - Variação temporal da temperatura em silagens de milho durante a exposição aeróbia, sob a vedação de filme de polietileno (PE) ou filme de polietileno+poliamida (PA) (média incluindo os aditivos e terra).....	75
Figura 9 - Variação temporal da temperatura em silagens de milho durante a exposição aeróbia, sob o uso de aditivos (média incluindo as lonas e terra).	76
Figura 10 - Valores de pH da região periférica do silo de silagens de milho em função do tipo de lona utilizada. Letras minúsculas comparam médias entre os tempos de exposição aeróbia.	79

Figura 11 - Valores de pH da região periférica do silo de silagens de milho em função do tipo do tipo de aditivo utilizado.	80
Figura 12 - Estratégias de proteção do filme plástico utilizadas: A) Controle; B) Bagaço de cana e C) Terra.	97
Figura 13 - Visualização da camada superficial das silagens em função dos tratamentos no momento da abertura dos silos.....	100
Figura 14 - Temperaturas das silagens de milho na camada superior do silo cobertas sob diferentes estratégias de vedação durante 95 dias de armazenamento..	103
Figura 15 - Diferença entre a temperatura da silagem e a temperatura ambiente expostas ao ambiente aeróbio durante 240 horas.....	106
Figura 16 - Vedação dos silos e imposição dos tratamentos experimentais.	117
Figura 17 - Regiões amostradas durante avaliações nos silos: C – centro; T – topo e TL – topo lateral.	120
Figura 18 - Detalhamento das instalações com cocho individual, bebedouro e sistema de arrefecimento.	122
Figura 19 - Ordenha mecânica com medidor automático de leite e coleta de amostra para análises.	125
Figura 20 - Instalações e coleta total de fezes dos animais na 11 ^a semana de experimentação.	127
Figura 21 - Temperaturas das silagens do topo ao longo do período de armazenamento.	130
Figura 22 - Temperaturas das silagens de milho em função do tipo de lona utilizada na vedação e da localidade da silagem no painel do silo.	133

Figura 23 - Taxa de permeabilidade ao oxigênio dos filmes plásticos utilizados na vedação dos silos sob diferentes temperaturas.	138
Figura 24 - Consumo dos nutrientes das dietas oferecidas para vacas em lactação alimentadas com as diferentes silagens ao longo das semanas experimentais.	140
Figura 25 - Porcentagem dos nutrientes nas dietas consumidas por vacas em lactação alimentadas com as diferentes silagens ao longo das semanas experimentais.....	142
Figura 26 - Produção leiteira de vacas alimentadas com as diferentes silagens ao longo das semanas experimentais.	144
Figura 27 - Produção leiteira corrigida para 4% de gordura de vacas alimentadas com as diferentes silagens ao longo das semanas experimentais.	145
Figura 28 - Porcentagem dos constituintes do leite de vacas alimentadas com as diferentes silagens ao longo das semanas experimentais.....	147
Figura 29 - Presença de aflatoxina B1 em silagens de milho e precipitação pluviométrica ao longo dos meses de julho a outubro de 2010.	150
Figura 30 - Comportamento ingestivo de vacas em lactação alimentadas com as diferentes silagens.	152

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características da forragem no momento da ensilagem.	66
Tabela 2 - Estatística descritiva para variáveis de temperatura de silagens de milho sob diferentes estratégias de vedação ao longo do período fermentativo.	68
Tabela 3 - Temperatura de silagens de milho sob diferentes estratégias de vedação ao longo do período fermentativo.	69
Tabela 4 - Estatística descritiva para variáveis do padrão de fermentação de silagens de milho sob diferentes estratégias de vedação no momento da abertura dos silos.	70
Tabela 5 - Padrão de fermentação de silagens de milho sob diferentes estratégias de vedação no momento da abertura dos silos.	71
Tabela 6 - Ocorrência de aflatoxina B1 em silagem de milho no sob diferentes estratégias de vedação no momento da abertura dos silos.	72
Tabela 7 - Estatística descritiva para variáveis de valor nutritivo de silagens de milho sob diferentes estratégias de vedação no momento da abertura dos silos analisadas durante o período fermentativo das silagens.	73
Tabela 8 - Valor nutritivo de silagens de milho sob diferentes estratégias de vedação no momento da abertura dos silos.	74
Tabela 9 - Estatística descritiva para variáveis relacionadas com a estabilidade aeróbia de silagens de milho sob diferentes estratégias de vedação ao longo do período de exposição aeróbia.	77
Tabela 10 - Temperatura de silagens de milho sob diferentes estratégias de vedação ao longo do período de exposição aeróbia.	78
Tabela 11 - Características da forragem no momento da ensilagem.	102

Tabela 12 - Padrão fermentativo, microbiológico e pós abertura das silagens no momento da abertura dos silos.	104
Tabela 13 - Composição bromatológica das silagens no momento da abertura dos silos.	105
Tabela 14 - Proporção dos ingredientes e composição química das rações utilizadas.	124
Tabela 15 - Características da forragem no momento da ensilagem.	129
Tabela 16 - Características fermentativas de silagens de milho sob estratégias de vedação.	131
Tabela 17 - Características microbiológicas ($\log_{10}$ ufc/g) de silagens de milho sob estratégias de vedação.	132
Tabela 18 - Indicadores de deterioração das silagens durante 14 semanas de descarregamento dos silos.	134
Tabela 19 - Valor nutritivo de silagens de milho sob estratégias de vedação.	135
Tabela 20 - Propriedades físicas dos filmes plásticos utilizados na vedação das silagens de milho.	137
Tabela 21 - Peso corporal e escore de condição corporal de vacas em lactação no início e final do experimento.	139
Tabela 22 - Consumo dos nutrientes das dietas oferecidas para vacas em lactação alimentadas com as diferentes silagens.	139
Tabela 23 - Participação dos nutrientes (%) na dieta oferecida e consumida por vacas em lactação alimentadas com rações contendo as diferentes silagens. .	141
Tabela 24 - Produção de leite e eficiência alimentar de vacas em lactação alimentadas com as diferentes silagens.	143

Tabela 25 - Produção dos constituintes do leite (kg/dia) de vacas em lactação alimentadas com as diferentes silagens.	145
Tabela 26 - Porcentagem dos constituintes do leite (%) de vacas em lactação alimentadas com as diferentes silagens.	146
Tabela 27 - Contagem de células somáticas e teor de nitrogênio ureico no leite de vacas alimentadas com as diferentes silagens.	147
Tabela 28 - Concentrações médias de aflatoxina B1 em silagens de milho sob diferentes tipos de vedação.	148
Tabela 29 - Ocorrência de aflatoxina B1 em silagem de milho ao longo dos períodos de experimentação.	149
Tabela 30 - Ocorrência de aflatoxina M1 no leite de vacas Holandesas ao longo dos períodos de experimentação.	151
Tabela 31 - Ocorrência de aflatoxina M1 no leite de vacas Holandesas em relação ao tipo de lona utilizada na vedação dos silos.	151
Tabela 32 - Comportamento ingestivo de vacas em lactação alimentadas com as diferentes silagens.	153
Tabela 33 - Eficiência de ingestão e ruminação de vacas em lactação alimentadas com as diferentes silagens.	154
Tabela 34 - Consumo dos nutrientes durante o ensaio de digestibilidade das dietas experimentais.	155
Tabela 35 - Digestibilidade dos nutrientes no trato digestório total de vacas em lactação consumindo dietas com as diferentes silagens.	156

1 INTRODUÇÃO

A conservação da forragem na forma de silagem é caracterizada pela fermentação láctica espontânea que ocorre em ambiente anaeróbio, sendo que, os principais agentes fermentadores são bactérias lácticas que metabolizam os açúcares e produzem o ácido láctico. Desse modo, a manutenção da anaerobiose e a queda do pH constituem os fatores que são responsáveis pela preservação da forragem armazenada (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; SPOELSTRA, 1999; PAHLOW et al., 2003), pois os microrganismos capazes de deteriorar a silagem são inibidos pelo efeito sinérgico dos ácidos produzidos durante a fermentação, pela pressão osmótica elevada e pela ausência de oxigênio (WOOLFORD, 1990).

Quanto aos fatores ligados à acidificação da massa, estes são obtidos quando ocorre predominantemente fermentação homoláctica (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; SPOELSTRA, 1999) e podem ser alcançados com facilidade, por exemplo, na cultura do milho, devido às suas características desejáveis relacionadas a capacidade de fermentação (alta concentração de carboidratos solúveis, baixo poder tamponante e umidade reduzida) (ALLEN; COORS; ROTH, 2003).

O contato da massa com o oxigênio é inevitável durante algumas fases que compreendem o processo de ensilagem (abastecimento do silo, armazenamento e desabastecimento). Segundo Sprague (1974), citado por Woolford (1990) e reiterado por Pahlow et al. (2003), em um silo bem vedado o O_2 presente na massa é consumido rapidamente pelo processo de respiração celular e pela microbiota (microrganismos aeróbios facultativos), pois em 15 minutos cerca de 90% do oxigênio é removido e menos de 0,5% permanece após 30 minutos. De fato, a maior quantidade de oxigênio que permeia a silagem se deve à consequência do escape de CO_2 da massa que “bombeia” oxigênio para o interior do silo, buscando o equilíbrio dos gases (PITT; MUCK, 1993). Pelo fato do silo não ser ambiente hermético, durante o período de armazenamento o ar penetra no seu interior (MUCK; MOSER; PITT, 2003), principalmente no topo e nas zonas laterais em contato com a parede (BOLSEN et al., 1993), sendo que este problema pode se agravar, sobretudo durante o fornecimento da silagem aos animais (HONIG, 1991). A presença de O_2 desencadeia a proliferação de microrganismos indesejáveis presentes na massa (leveduras, fungos e bactérias

aeróbias) que se desenvolvem utilizando reservas energéticas presentes na forragem, acarretando em perdas no valor nutritivo da silagem e redução do consumo pelos animais (LINDGREN; JONSSON; LINGVALL, 1985).

No Brasil, devido a negligência aos processos de oxidação de nutrientes pelos microrganismos aeróbios e a, conseqüente, deterioração da silagem, pouca importância tem-se dado na prática, por se tratar na maioria das vezes de um problema assintomático. A dificuldade em se mensurar as perdas totais que ocorrem por manejo inadequado nas propriedades rurais e, a não mensuração de perdas qualitativas por meio de avaliações laboratoriais, resultam em falta do estímulo à percepção e à divulgação de resultados para a economia de produção. Dificilmente os produtores acreditam em perdas elevadas decorrentes de oxidação da massa, pois só consideram como tal aquelas que são visíveis (com presença de micélios), o que subestima perdas reais envolvidas na ensilagem.

Apesar de antigo e muito estudado, o assunto instabilidade aeróbia de silagens somente começou a receber atenção recentemente. Várias causas podem estar relacionadas a este fato, pois poucos são os trabalhos, como os de Ruppel et al. (1995) e Kuzin e Savoie (2001) que se dedicaram à estudar a importância dos fatores inerentes ao manejo e mais raros os que caracterizaram o efeito da silagem deteriorada e de seus produtos (aminas biogênicas, micotoxinas) sobre a ingestão e metabolismo dos animais, como os trabalhos de Bolsen; Whitlock e Uriarte-Archundia (2002) e Tabacco e Borreani (2002).

O tema deterioração aeróbia não se limita às questões relacionadas às perdas, porque o desenvolvimento de microrganismos, como algumas espécies de bactérias (*Bacillus*, *Clostridium* e *Listeria*) e alguns fungos filamentosos podem influenciar nos aspectos ligados a qualidade higiênica da silagem (LINDGREN; OLDENBURG; PAHLOW, 2002). O crescimento de fungos pode vir acompanhado pela produção de micotoxinas na massa. Dessa forma, os animais que são alimentados com grandes proporções de silagem na ração (vacas leiteiras) podem intoxicar-se, causando efeitos diretos ao seu desempenho e colocando em risco a saúde humana que utiliza alimentos de origem animal ao longo da cadeia alimentar (WHITLOW; HAGLER JR, 1997).

Por estas razões, se faz necessário colocar em ação todas as estratégias para reduzir a penetração de O₂ no silo, evitando seus efeitos deletérios, tanto de ordem nutricional como sanitária, durante o armazenamento ou durante o consumo da silagem.

Referências

ALLEN, M.S.; COORS, J.G.; ROTH, G.W. Corn silage. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America, 2003. p. 547-608.

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

BOLSEN, K.K.; WHITLOCK, L.A.; URIARTE-ARCHUNDIA, M.E. Effect of surface spoilage on the nutritive value of maize silages diets. In: THE INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 13th, 2002, Auchincruive. **Proceedings...** Auchincruive, 2002, p.75-77.

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

HONIG, H. Reducing losses during storage and unloading of silage. In: PAHLOW, G; HONIG, H (Ed.). **Forage conservation towards 2000**. Braunschweig: European Grassland Federation, 1991. p.116-128.

KUZIN, V.; SAVOIE, P. **Modeling air infiltration in bunker silos to optimize the cover**. In: Annual International Meeting Sponsored. Sacramento: American Society of Agricultural and Biological Engineers, Saint Joseph, 2001. 10p.

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

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

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

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

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

RUPPEL, K.A.; PITT, R.E.; CHASE, L.E.; GALTON, D.M. Bunker silo management and its relationship to forage preservation on dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, p. 141-1453, 1995.

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

WHITLOW, L.W.; HAGLER Jr., W.N. Effects of mycotoxins on the animal: The producer's perspective. In: SILAGE: FIELD TO FEEDBUNK, 1997. Ithaca. **Proceedings...** Ithaca: NRAES, 1997. p. 222-232.

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

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fatores que influenciam na deterioração aeróbia

2.1.1 Influxo de ar no silo

Segundo Savoie e Jofriet (2003) os efeitos danosos do ar na qualidade da silagem são manifestados por dois caminhos, o primeiro ocorre na camada superficial durante o armazenamento, freqüentemente visível pelo crescimento de fungos, e o segundo está ligado à estabilidade aeróbia durante o período de remoção e fornecimento da silagem, usualmente manifestado pelo aquecimento da massa.

As trocas gasosas durante o período de estocagem são fundamentadas, segundo o modelo de McGechan e Williams (1994), por dois efeitos físicos: o fluxo volumétrico e a difusão. O fluxo volumétrico é dependente dos gradientes de pressão, sendo que estes são influenciados principalmente pelo movimento de CO_2 (principal gás produzido na fermentação) entre o silo e o ar (HONIG, 1991). Após o término da fermentação, a concentração interna de CO_2 é de 90%, muito superior à externa (McGECHAN; WILLIAMS, 1994). Se o silo apresenta algum ponto de escape, ocorre saída de CO_2 , o qual é substituído por O_2 e N_2 (ASHBELL; LISKER, 1988). A intensidade do fluxo é dependente dos gradientes de temperatura, presença de fendas na parede do silo, do filme plástico utilizado na vedação e da porosidade da silagem (WEINBERG; ASHBELL, 2003).

2.1.2 A vedação e a penetração de ar

A lona que veda o silo protegida com terra, areia ou cascalho aumenta a adesão entre esta e a massa e diminui a incidência de raios solares e as trocas gasosas com o ambiente. Porém, podem representar grande demanda de mão-de-obra, seja durante a vedação ou na retirada da silagem, principalmente quando o silo é de grande porte. Por estes motivos, quando materiais extras não são adicionados na cobertura, a lona passa a assumir uma contribuição mais expressiva na etapa de vedação do silo, objetivando a redução da penetração de ar do ambiente externo para o interior.

Em silos do tipo superfície, a presença da lona também se torna relevante, devido à falta de paredes laterais para proteção (SAVOIE; JOFRIET, 2003), e a demanda por filmes mais espessos (0,18 a 0,2 mm) acaba sendo mais significativa, segundo o modelo proposto por Savoie (1988).

Os filmes de polietileno utilizados na cobertura de silos apresentam permeabilidade ao oxigênio, a qual tende a aumentar notavelmente com a elevação da temperatura ambiental (DEGANO, 1999). Isto significa que durante o período do verão as silagens podem se tornar mais propensas à deterioração aeróbia, devido ao aumento da permeabilidade das lonas, com o conseqüente movimento gasoso devido à diferença de temperatura e pressão.

Kuzin e Savoie (2001) desenvolveram um modelo com o objetivo de estudar diferentes espessuras de filmes de polietileno e qual o impacto que os diversos níveis de permeabilidade ao oxigênio poderiam exercer sobre as perdas da silagem. Considerando a profundidade de 3 m ao longo do perfil, o filme com espessura entre 0,1-0,2 mm (comumente comercializado) promoveu menos de 2% de perdas de matéria orgânica após 7000 horas de armazenamento, enquanto que na espessura de 0,001 mm verificou-se 10% de perdas. Segundo os autores, quando o período de estocagem for próximo de 125 dias pode-se utilizar filme com espessura de 0,1 mm e se o tempo for estendido para 300 dias a espessura deverá ser de 0,2 mm.

Snell et al. (2002) utilizaram silos experimentais (0,3 m³) para avaliar a influência de variações na coloração e na espessura do plástico sobre as condições de preservação e qualidade da silagem, sendo comparados cinco tipos de filmes plásticos: a) branco/0,09 mm, b) transparente/0,15 mm, c) branco/0,15 mm, d) preto/0,15 mm, e e) branco/0,2 mm. As características de fermentação da silagem não foram afetadas pelo tipo de filme. Houve diferença na temperatura da superfície externa dos plásticos, sendo que as silagens cobertas por plásticos preto e transparente tiveram valores superiores. Foi observada diferença de temperatura na camada de silagem próxima ao filme (0 a 20 cm), porém esta foi insuficiente para influenciar as condições de desenvolvimento de microrganismos.

Segundo as normas da American Society for Testing and Materials Standards (AMST D3985-81), com a elevação da temperatura de 23 a 50 °C, a permeabilidade ao

ar dos filmes plásticos aumentam de 3 a 5 vezes. Na escolha da lona é preferível optar pela cor branca, pois filmes de outras cores, especialmente os escuros, aumentam a permeabilidade ao O_2 pela característica de absorver calor (TABACCO; BORREANI, 2002).

2.1.3 O desabastecimento do silo e o influxo de ar

Após a quebra da vedação, a face frontal do silo que não é rapidamente removido permanece exposta ao O_2 . A partir deste evento, o principal fator que determina a estabilidade da silagem (anaerobiose) é perdido e a massa se torna potencialmente instável (WEINBERG; ASHBELL, 2003). O influxo do O_2 na face do silo é influenciado pela densidade alcançada durante a fase de enchimento (HONIG, 1991; PITT; MUCK, 1993; WEINBERG; ASHBELL, 2003). Assim, nas regiões mais porosas da massa (áreas periféricas) os riscos de deterioração aeróbia aumentam (D'AMOURS; SAVOIE, 2005).

O processo de deterioração aeróbia é originado pela atividade de microrganismos aeróbios. Desse modo, as perdas durante o desabastecimento também serão influenciadas pela disponibilidade de nutrientes, pela temperatura ambiental (ASHBELL et al., 2002) e pelo tempo de exposição da silagem ao O_2 (WEINBERG; ASHBELL, 2003) e, segundo Ohyama; Masaki e Hara (1975), estes três fatores são interdependentes.

Teoricamente, a rota fermentativa mais desejável durante a conservação da forragem na forma de silagem é a do tipo homolática (conversão de uma molécula de glicose em duas de ácido láctico), pois não propicia perdas de MS ou de energia, o que pode resultar em maior consumo de silagem pelos animais (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Entretanto, o perfil de fermentação desejável nem sempre evita as perdas após a abertura dos silos, ou em alguns casos pode aumentá-las (KUNG; STOKES; LIN, 2003). A alta concentração e predominância de ácido láctico em silagens necessariamente não representam efeito positivo na estabilidade aeróbia. Silagens adequadamente fermentadas, com altas concentrações de ácido láctico e açúcares remanescentes, são mais afetadas pela deterioração aeróbia (WEINBERG; MUCK, 1996). Os fungos, as leveduras e algumas espécies de bactérias promovem a

assimilação aeróbia de lactato da silagem, reduzindo o seu potencial de conservação (PAHLOW et al., 2003).

Portanto, a estratégia de restringir a formação de ácido acético aumenta os riscos de silagens serem instáveis durante a aerobiose (NUSSIO; PAZIANI; NUSSIO, 2002). O conceito de que a concentração de acetato menor que 2% MS classifica a silagem como excelente, como proposto no trabalho de Dulphy e Demarquilly (1981), é questionado na atualidade. A habilidade em se estimar os riscos de deterioração aeróbia, de acordo com o perfil de fermentação, ainda é incerta. Porém, além de todos os cuidados relacionados com o manejo, a maior chance em obter sucesso na ensilagem está na premissa que as silagens devem conter ácido acético em associação ao ácido láctico.

2.2 Aditivos controladores da deterioração aeróbia

2.2.1 Aditivos microbiológicos

Até a metade da década de 90 o principal objetivo das indústrias era desenvolver estratégias com base no uso de bactérias homofermentativas. Entretanto, o meio científico iniciou pesquisas com uma cepa heterofermentativa (*Lactobacillus buchneri*), com o objetivo de empregar alternativas que controlassem a deterioração aeróbia durante a exposição da silagem ao ar (DRIEHUIS; SPOELSTRA; COLE, 1996; WEINBERG; MUCK, 1996).

Segundo Pahlow et al. (2003), as bactérias heteroláticas fermentam glicose, produzindo ácido láctico e etanol, sendo que a frutose é fermentada a ácido láctico, acético e manitol. Contudo, a espécie *L. buchneri* não possui a enzima acetaldeído desidrogenase, responsável pela redução de acetaldeído a etanol. Desse modo, a produção de etanol é reduzida (OUDE ELFERINK et al., 2001) e, conseqüentemente, ocorre aumento na concentração de ácido acético como produto final de sua fermentação (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

A fermentação heterolática pode ser considerada desvantajosa, devido a possibilidade de maiores perdas de matéria seca durante o processo fermentativo (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991) e também porque elevadas

concentrações de acetato na massa ensilada poderia reduzir o consumo voluntário por parte dos animais (CHARMLEY, 2001). Entretanto, em regiões do silo onde a penetração de ar não pode ser controlada adequadamente (áreas marginais), assim como em situações onde se objetiva a redução da produção de etanol, como ocorre em silagens de cana-de-açúcar (NUSSIO; SCHIMIDT; PEDROSO, 2003), algum incremento no controle de perdas pode ser obtido utilizando este microrganismo.

O acetato é considerado um ácido pouco eficiente, quanto a função em reduzir o pH da silagem. No entanto, a sua ação ocorre sobre o metabolismo de leveduras e fungos filamentosos (MOON, 1983). Segundo Davidson (1997), este ácido em pH inferior ao seu pK_a (4,73) permanece na forma não dissociada, onde a membrana dos microrganismos se torna permeável a ele, ocorrendo a entrada do ácido na célula via transporte passivo. Dentro da célula, o ácido é dissociado ($RCOO^- + H^+$) devido ao pH ser próximo de 7,0, liberando íons H^+ , o que reduz o pH intracelular. Para manter uma acidez constante, o microrganismo deve eliminar os íons H^+ , perdendo energia neste processo, retardando o seu crescimento e podendo chegar a morte da célula.

Driehuis; Oude elferink e Spoelstra (1999) verificaram que a presença de *L. buchneri* em silagens de milho (92 dias de fermentação) reduziu a concentração de ácido láctico, enquanto que a de ácido acético foi elevada conforme a população da bactéria aumentou. Segundo Oude Elferink et al. (2001), o *L. buchneri* consegue degradar o ácido láctico em condições de anaerobiose, transformando-o em ácido acético, 1,2 propanodiol e traços de etanol. Além desta observação, Driehuis; Oude elferink e Spoelstra (1999) verificaram elevadas concentrações de 1-propanol e ácido propiônico (236 e 106 mmol/kg MS, respectivamente) quando a silagem de milho foi inoculada com *L. buchneri* (1×10^6 ufc/g forragem).

Ranjit e Kung (2000), estudando a deterioração aeróbia em silagem de milho e utilizando o *L. buchneri* (1×10^6 ufc/g forragem) como um dos tratamentos, observaram aumento de 3,6% na concentração de ácido acético em comparação com a silagem não tratada. As populações de leveduras foram de 10^6 e 10^2 ufc/g de silagem, no tratamento sem e com inóculo, respectivamente. A estabilidade aeróbia das silagens foi de 26,5 h para o tratamento controle e mais de 900 h para o tratamento com *L. buchneri*.

2.2.2 Aditivos químicos

Segundo Kung; Stokes e Lin (2003), aditivos químicos utilizados durante o processo de conservação da forragem são normalmente classificados como inibidores parciais ou totais, restringindo a fermentação da forragem e/ou a deterioração aeróbia.

Agentes antimicrobianos utilizados como conservantes na indústria alimentícia para humanos tem sido utilizados como aditivos para silagens. Woolford (1975) testou sais de ácido sórbico (pKa 4,75) e ácido benzóico (pKa 4,20) na forma de sorbato de potássio e benzoato de sódio, verificando poder inibidor destes sobre clostrídeos, leveduras e fungos filamentosos. O autor avaliou o efeito do benzoato em diferentes valores de pH, relatando que à medida que o pH é reduzido, a necessidade de benzoato na inibição de leveduras e fungos também é reduzida. Em pH igual a 6, necessita-se de 110 e 55 mM de benzoato de sódio para inibir leveduras e fungos filamentosos, respectivamente. Já em pH de 3 a 4, essa necessidade foi reduzida a 2 e 3 mM de benzoato de sódio.

Alli et al. (1985) utilizando sorbato ($0,90 \text{ g.kg}^{-1}$) observaram redução na população de fungos filamentosos e leveduras, reportando também que o aditivo evitou o aquecimento da massa de silagem. Hattori et al. (1995) relataram que a adição de $1,0 \text{ g.kg}^{-1}$ de ácido sórbico em silagens de milho inibiu a deterioração aeróbia quando comparada com quantidades equivalentes de acetaldeído, ácido acético e ácido fórmico.

Pedroso et al. (2007) avaliando silagem de cana-de-açúcar com 94 dias de fermentação observou que, a aplicação de 0,1% de benzoato de sódio reduziu a população de leveduras, o teor de etanol, além de conservar maior quantidade de carboidratos solúveis. Bernardes et al. (2004) avaliando a inclusão de benzoato de sódio na ensilagem do capim-Marandu nas doses de 0,05; 0,1; 0,2 e 0,3%, observaram melhora na recuperação da matéria seca no pós-abertura a partir da dose de 0,1%.

2.3 Microrganismos envolvidos com a deterioração aeróbia

2.3.1 Fungos

O reino Fungi é um grande grupo de organismos eucariontes, cujos membros são denominados fungos, representados pelas leveduras e fungos filamentosos (bolors). Os fungos são classificados num reino separado das plantas, animais e bactérias, sendo que a grande diferença é o fato de suas células apresentarem paredes celulares que contêm quitina, ao contrário das células vegetais que contêm celulose (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

O conhecimento de que os fungos são microrganismos contaminante de alimentos e de que seus produtos metabólicos são responsáveis por intoxicações alimentares no homem e nos animais domésticos data da Idade Média. Os primeiros quadros patológicos, ocorridos na França entre os séculos XI e XVI, foram constatados em populações que se alimentavam com pães elaborados a partir de farinha de centeio, contaminada com fungos. A doença caracterizada posteriormente como ergotismo produzia convulsões, gangrena seca das extremidades, e surgia de forma epidêmica em consequência da ingestão de micotoxinas presentes nos escleródios (esporão do centeio) do fungo Ascomiceto *Claviceps purpurea* (PIER, 1973). A micotoxicose foi inicialmente chamada de Fogo de Santo Antônio porque os romeiros, portadores da doença, quando se afastavam da fonte de infecção, em romaria ao túmulo de Santo Antônio de Pádua, na Itália, retornavam recuperados e às vezes até curados, fato esse considerado pelo povo na época como milagre (FORGACS; CARLL, 1962). Os animais domésticos também eram afetados pelos ergocalcóides quando consumiam feno, centeio ou outros cereais contaminados pelo *Claviceps purpurea*. O ergotismo nesses animais se manifestava sob a forma gangrenosa e nervosa, dependendo das características do ergocalcóide consumido.

As intoxicações pela ingestão de alimentos contaminados com toxinas produzidas por fungos foi uma constante ao longo do século passado. Durante a II Guerra Mundial duas epidemias importantes ocorreram na Rússia, em consequência do consumo de cereais contaminados por fungos. Em 1960 na Inglaterra, ocorreu a morte de 100.000 perus alimentados com rações que continham em sua formulação torta de

amendoim importadas do Brasil, chamada de doença X dos perus. Segundo Morgavi e Riley (2007), a partir desse evento foram iniciados os estudos e a descoberta da aflatoxina.

Dentre as características dos fungos filamentosos, a biossíntese de produtos naturais os tornam de grande interesse para a comunidade científica. Seus metabólitos possuem contrastes marcantes, com funções diversas: as vezes útil no uso farmacêutico (penicilina) e por outro lado apresentando potentes propriedades tóxicas e carcinogênicas (aflatoxinas).

Segundo Hoffmeister e Keller (2007), os estudos sobre os metabólicos fúngicos datam de anos anteriores a 1870, onde pigmentos sintetizados por cogumelos atraíram a atenção dos químicos orgânicos da época. Já no século XX foi testemunhado, isolado e caracterizado quimicamente vasta diversidade de produtos naturais de fungos filamentosos, movido pela descoberta da penicilina.

Segundo Woolford (1990), a atenção direcionada aos microrganismos aeróbios em silagens só foi dada nas últimas duas décadas. Antes desse evento a presença de fungos na superfície de silagens, era tida como evento normal, inevitável, uma manifestação da fermentação ou perda intrínseca ocasionada por esta atividade.

2.3.2 Condições para desenvolvimento

A exigência mais óbvia para desenvolvimento fúngico é a necessidade de fontes de nitrogênio e energia. Um segundo requerimento é a temperatura ambiente. Embora os fungos possam respirar em diversidade de temperaturas, existem limites estabelecidos para seu crescimento e produção de toxinas (NELSON, 1992). *Aspergillus* e *Penicillium* são espécies que apresentam seu desenvolvimento ótimo em condições de temperatura elevada, enquanto que espécies de *Fusarium* tem preferência por menores temperaturas.

Os fungos filamentosos são organismos obrigatoriamente aeróbios, mesmo assim seu crescimento e proliferação podem ser controlados pela aeração durante o armazenamento de grãos, embora essa estratégia não seja opção no caso de preservação da silagem. Apesar da necessidade de ambiente aeróbio, algumas

espécies de fungos são capazes de sobreviver em concentrações baixas de oxigênio, inferiores a 4% (MAGAN; LACEY, 1988).

Segundo Tuite (1969), a maioria dos fungos filamentosos necessita de pelo menos 1 – 2% de oxigênio. Entretanto existe a exceção para a espécie *Fusarium verticillioides*, a qual é capaz de sobreviver em ambiente com 60% de CO₂ e concentração de O₂ inferior a 0,5%. Estas condições reforçam a ideia da necessidade de se realizar o processo de ensilagem de maneira rápida e eficiente, bem como realizar a vedação do silo de maneira adequada.

Fundamentalmente importante no crescimento de fungos é a água livre ou disponível no alimento, também denominada de atividade de água (Aw). A atividade de água é definida pela relação entre a pressão de vapor de determinado alimento e a pressão de vapor da água pura à mesma temperatura, com valores variando entre 0 e 1 (COULTATE, 1996). À medida que se aumenta os valores para atividade de água, a velocidade de reações e crescimento microbiano é beneficiado. Os fungos são os microrganismos mais resistentes à diminuição da atividade de água, sendo os principais responsáveis pela deterioração de alimentos. Alguns bolores, como é o exemplo de *Monascus* sp., podem crescer em condições de baixa atividade de água (0,62). Em razão total, a atividade de água pode variar entre valores de 0,50 a 0,94, sendo dependente da quantidade de silagem e do teor de matéria seca desse volumoso.

2.3.3 Os fungos e a silagem

Os fungos em geral são apontados como principais responsáveis pela deterioração aeróbia de silagens, com destaque para fungos filamentosos e leveduras. As populações de leveduras em silagens podem variar de $< 10^2$ ufc para valores de 10^{12} ufc/ g forragem num intervalo de tempo de 3 dias. Além disso, a vulnerabilidade da silagem para deterioração aeróbia é função da população de leveduras, sendo que, caso a silagem apresente populações acima de 10^5 ufc/g forragem, o problema da deterioração já estará instalado no sistema.

As leveduras relacionadas com o processo de deterioração aeróbia tem sido classificadas dentro de dois grandes grupos: 1) Utilizadoras de ácidos, grupo que compreende os gêneros *Candida*, *Endomycopsis*, *Hansenula* e *Pichia* e; 2) Utilizadoras

de açúcar, tendo o gênero *Torulopsis* como representante. No caso de deterioração da silagem após a exposição ao ar, as leveduras utilizadoras de lactato serão as responsáveis pela maior magnitude da deterioração. Em estudo com 13 diferentes silagens de milho, Middlehoven e Franzen (1986) citado por Woolford (1990), observaram que a micoflora presente foi dominada por dois gêneros principais: *Candida* e *Saccharomyces* e, com a exceção da espécie *S. dairensis*, todas toleraram ácido acético no pH 4,0 e assimilaram os ácidos láctico e acético, bem como, o etanol.

Utilizando combinação de métodos de plaqueamento e testes moleculares para identificação da população fúngica na planta de milho e sua silagem, Mansfield e Kuldau (2007) isolaram seis espécies de *Penicillium* (*P. roqueforti*, *P. paneum*, *P. expansum*, *P. crustosum*, *P. commune* e *P. citrinum*), sete espécies de *Fusarium* (*F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. pseudograminearum*, *F. proliferatum*, *F. sporotrichioides* e *F. verticillioides*) e uma espécie de *Aspergillus*, *A. fumigatus*.

Em termos de abundância das espécies, *P. roqueforti* e *F. graminearum* foram as espécies prevalentes. *P. roqueforti* foi isolado em 50% das amostras de milho na colheita (n = 24) e em 75% das amostras de silagens (n = 24), enquanto *F. graminearum* foi encontrado em 58% de amostras na colheita e não foi verificado na silagem. *P. paneum*, que já foi relatado como sendo pertencente à espécie *P. roqueforti* e, recentemente designado nova espécie (BOYSEN; JACOBSSON; SCHNURER, 2000), foi isolado em amostras obtidas na colheita e nas silagens de milho.

Em adição as espécies micotoxigênicas isoladas, outras espécies de fungos filamentosos e leveduras foram isolados. Os gêneros de fungos filamentosos isolados incluíram: *Acremonium*, *Cladosporium*, *Cordyceps*, *Epicoccum*, *Mortierella* e *Mucor*. De maneira geral, as leveduras representaram o grupo maioritário entre os fungos isolados da silagem. *Geotrichum candidum* foi a espécie mais encontrada, sendo isolada em 75% das amostras da planta na colheita e 21% nas silagens. Outras espécies de leveduras que se apresentaram em altas concentrações incluíram: *Candida intermédia*, *Candida sake*, *Debaryomyces hansenii*, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia anomala*, *Pichia fermentans* e *Pichia membranifaciens*.

2.4 Ocorrência de micotoxinas em silagens

Os fungos filamentosos podem ser considerados coadjuvantes na deterioração aeróbia de silagens, pois durante o desabastecimento do silo, o desenvolvimento deles acontece somente em sucessão ao crescimento das leveduras (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Contudo, a deterioração aeróbia dos ingredientes de rações para animais causada por fungos filamentosos determina perda de elementos nutritivos e de energia (LINDGREN; OLDENBURG; PAHLOW, 2002), além do risco de contaminação com micotoxinas. Recentemente, tem-se observado grande interesse em micotoxinas no que se refere à segurança alimentar, a despeito da origem e qualidade dos produtos destinados à alimentação humana. Dessa forma, um segmento que vem crescendo atualmente é o relacionado com triagem de micotoxinas em vários tipos de alimentos.

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos que causam respostas tóxicas (micotoxicoses) quando ingerida por animais (BINDER et al., 2007). As plantas e forragens podem ser contaminadas pelas micotoxinas, de maneira geral, por dois meios: 1) patogenicidade fúngica e; 2) fungos saprofíticos (GLENN, 2007). Entretanto, a formação das micotoxinas não ocorre obrigatoriamente durante o desenvolvimento fúngico e, o mais importante: a detecção de fungos não implica necessariamente na presença de micotoxinas.

Muitas são as dúvidas e divergências sobre os estímulos que levam a formação dos metabólitos secundários pelos fungos filamentosos. Segundo Calvo et al. (2002), o metabolismo secundário dos microrganismos é comumente associado com o processo de esporulação, incluindo os fungos filamentosos. Esses metabólitos secundários associados a esporulação podem ser agrupados em três grandes categorias: 1) metabólitos que ativam a esporulação (por exemplo, compostos derivados de ácido linoléico produzidos por *Aspergillus nidulans*; 2) Pigmentos requeridos para a estrutura de esporulação (por exemplo, melaninas necessárias para formação ou integridade dos esporos e; 3) metabólitos tóxicos secretados pelas colônias em crescimento no momento da esporulação (por exemplo, produção de micotoxinas).

A relação existente entre a produção da micotoxina e a esporulação do fungo foi documentada em muitos gêneros de fungos micotoxigênicos. Em *Aspergillus*

parasiticus, alguns produtos químicos que inibem sua esporulação também fazem que ocorra inibição da produção de aflatoxina (REIB, 1982). Alguns trabalhos científicos têm apresentado que espécies mutantes de *Aspergillus* deficientes na esporulação também são incapazes de produzir aflatoxinas (CALVO et al., 2002).

Fox e Howlett (2008) destacaram o papel dos metabólitos secundários na biologia dos fungos. Segundo os autores, em muitos casos, o motivo para a produção de toxinas pelos fungos é dada pela falta de resposta do hospedeiro (planta), se este o permitirá completar seu ciclo de vida, dessa maneira, a população fúngica presente produz toxinas. A conclusão dos autores é de que os metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos ainda não são compreendidos claramente, envolvendo algumas proteínas e complexos que respondem a vários estímulos ambientais e do hospedeiro.

2.4.1 Presença de micotoxinas no campo

Os fungos podem se desenvolver em vários tipos de ambiente, sendo que em condições de campo o gênero *Fusarium* tem predominância de crescimento. A exigência mínima para o desenvolvimento de fungos do gênero *Fusarium* é elevada umidade (>70%), oxigênio e temperaturas flutuantes (dias quentes e noites frias). Esse gênero é responsável por ampla gama de doenças de gramíneas e cereais. Em lavouras de milho, esses tem capacidade de causar podridões em partes distintas da planta, tais como: caule, espiga e grão. Em trigo e outros cereais de inverno, *Fusarium* causa uma doença chamada de ferrugem do trigo (*head scab*), considerada bem importante para essas culturas.

A eliminação de esporos de *Fusarium* do ambiente é impraticável, uma vez que esses hibernam durante o inverno no solo, em detritos de plantas ou nas sementes. Sendo assim, o contato do esporo com a planta será inevitável e o grau de infecção será determinado em função das condições de ambiente e de estresse da planta. Segundo Rankin e Grau (2002), a competição por nutrientes na planta se estabelece entre a própria planta e outros microrganismos, e nesta ocasião, os fungos presentes produzem micotoxinas como forma de obter vantagens na competição por alimento.

Segundo Jouany (2007), existem mais de 500 micotoxinas conhecidas, entretanto as espécies de fungos e as toxinas mais conhecidas, pertencentes ao gêneros *Fusarium* são: Deoxinivalenol (DON), produzida por *F. molinoforme* e *F. graminearum*; Toxina T2, produzida por *F. sporotrichioides*; Zearalenona, produzida por *F. graminearum* e; Fumonisina, produzida por *F. moliniforme*.

De maneira geral, a cultura implantada deve ter um programa balanceado para ajustes na fertilidade do solo com vistas à redução do estresse da planta e, conseqüentemente, incidência de doenças. Segundo Rankin e Grau (2002), o nitrogênio (N) e o potássio (K) estão diretamente associados com o aumento na podridão dos colmos em milho. Tanto o excesso como baixas concentrações desses nutrientes conduzem para aumento da incidência dessa doença, o que gera grande probabilidade de produção de micotoxinas.

A escolha do híbrido poderá influir na susceptibilidade ao ataque fúngico, com conseqüente produção de toxinas. Segundo Jouany (2007), o melhoramento de plantas pode ser uma solução para controle de *Fusarium*, entretanto, com a melhoria na resistência ao seu ataque, a qualidade de híbridos é afetada. Miedaner et al. (2006) verificaram que o gene associado a resistência aos fungos do gênero *Fusarium* em trigo são coincidentes com genes que controlam as características morfológicas da planta, havendo conflitos de interesses.

O momento da colheita da planta também é caráter decisório para produção de micotoxinas. Oldenburg e Höppner (2003) verificaram aumento de amostras positivas para deoxinivalenol à medida que o milho foi colhido mais tardiamente. Em plantas de milho colhidas com 30% de MS, os autores obtiveram 34% de amostras positivas (n=82), ao passo que quando a planta foi colhida com 40% de MS, 86% das amostras (n=50) se apresentaram contaminadas pela micotoxina.

A textura do grão é uma característica dos híbridos que vem sendo discutida com relação a qualidade nutricional e a susceptibilidade ao ataque fúngico. Apesar de híbridos de milho com grãos dentados (textura macia) apresentarem maior qualidade nutricional, (maior facilidade ao ataque enzimático para digestão), estes também apresentam maior suscetibilidade a incidências de doenças e ataques de insetos, o que gera porta de entrada para colonização de fungos (RANKIN; GRAU, 2002).

Atualmente, grande foco tem sido dado aos híbridos de milho transgênicos (híbridos *Bt*), aos quais foram inseridos genes de *Bacillus thuringiensis* que levam à produção de proteínas tóxicas a determinadas ordens de insetos considerados pragas na cultura. A premissa para redução de fungos e, conseqüentemente, micotoxinas nesses híbridos é de que a integridade da planta será preservada por menor quantidade de ataques de insetos, fazendo com que a planta apresente menor quantidade de portas de entrada para esporos de fungos e sua posterior colonização nos tecidos da planta (HAMMOND et al., 2004).

Adicionalmente, práticas agrônômicas como a rotação de culturas, controle de pragas e doenças devem ser consideradas para redução da infestação fúngica.

2.4.2 Presença de micotoxinas durante o período fermentativo da silagem

De acordo com a classificação de Pelhate (1977) para fungos filamentosos em silagens, as espécies do gênero *Fusarium* são estritamente aeróbias. Espécies de fungos como *Aspergillus fumigatus*, *Monascus ruber*, *Penicillium varioti* e *Penicillium roqueforti* são consideradas micro-aerofílicas ou indiferentes a presença de oxigênio.

Auerbach (1996) verificou que a população de fungos em silagem de milho decresceu ao longo do período de fermentação em condições estritamente anaeróbias. A partir do 10º dia após a ensilagem, *Penicillium roqueforti* foi a única espécie presente até o 100º dia de fermentação. Em contraste a esse fato, a simulação com o suprimento adicional de oxigênio durante o processo de fermentação (100 mg O₂/kg MS/dia) estimulou o crescimento da população fúngica e aumentou a diversidade de espécies não somente representados pela espécie *Penicillium roqueforti*.

Outro fator que contribui para a sucessão da micoflora em silagens durante a fermentação é a variação no pH causada pela produção dos ácidos orgânicos, tal como láctico, acético, propiônico e butírico. Embora o pH per se não afete os fungos filamentosos, podendo estes crescer ou permanecerem dormentes em amplitude larga de valores, entre 3 a 8, a variação nesse parâmetro pode influenciar sua susceptibilidade a outros fatores ambientais (LACEY, 1989).

A resistência dos esporos de fungos para ácidos orgânicos tem se mostrado variável entre as espécies. Segundo Woolford (1975), o ácido láctico não apresenta

efeito prejudicial importante ao crescimento fúngico, ao passo que os ácidos orgânicos de cadeia curta (acético, propiônico e butírico) são potentes inibidores de fungos. Esporos de *Penicillium roqueforti* mostraram-se menos sensíveis a ação do ácido propiônico em relação à outras espécies do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* (Auerbach, 1996).

Auerbach; Oldenburg e Weissbach (1998) verificaram predominância de *Penicillium roqueforti* tanto em silagens de gramíneas emurchecidas como em silagens de milho. Segundo os autores, essa espécie tem habilidade de crescer em baixas concentrações de oxigênio, altas concentrações de dióxido de carbono, baixas temperaturas e na presença de ácidos orgânicos voláteis. Tanto a silagem de gramínea emurchecida como a silagem de milho apresentaram maior contagem fúngica nas amostras consideradas visualmente contaminadas com a presença de micélios. Entretanto, os valores encontrados para roquefortina C foram maiores na silagem de milho, o que pode ser explicado em função da maior concentração de ácido láctico e componentes solúveis, ou seja, a mesma abundância de substratos para o desenvolvimento fúngico e produção de micotoxinas não foi encontrada na silagem de gramínea.

2.4.3 Presença de micotoxinas no período de pós abertura do silo

Após a quebra da vedação, a face frontal do silo permanece exposta ao O₂. A partir deste evento, o principal fator que determina a estabilidade da silagem (anaerobiose) é perdido e a massa se torna potencialmente instável (WEINBERG; ASHBELL, 2003). O influxo do O₂ na face do silo é influenciado pela densidade alcançada durante a fase de enchimento (HONIG, 1991; PITT; MUCK, 1993; WEINBERG; ASHBELL, 2003). Assim, nas regiões mais porosas da massa (áreas periféricas) aumentam os riscos de deterioração aeróbia (D'AMOURS; SAVOIE, 2005).

O processo de deterioração aeróbia é originado pela atividade de microrganismos aeróbios. Desse modo, as perdas durante o desabastecimento também serão influenciadas pela disponibilidade de nutrientes, pela temperatura ambiental (ASHBELL et al., 2002) e pelo tempo de exposição da silagem ao O₂ (WEINBERG;

ASHBELL, 2003) e, segundo Ohyama; Masaki e Hara (1975), estes três fatores são interdependentes.

Teoricamente, a rota fermentativa mais desejável durante a conservação da forragem na forma de silagem é a do tipo homolática (conversão de uma molécula de glicose em duas de ácido láctico), pois não propicia perdas de MS ou de energia, o que pode resultar em maior consumo de silagem pelos animais (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Entretanto, o perfil de fermentação desejável nem sempre evita as perdas após a abertura dos silos, ou em alguns casos pode inclusive aumentá-las (KUNG; STOKES; LIN, 2003). A alta concentração e predominância de ácido láctico em silagens necessariamente não representam efeito positivo na estabilidade aeróbia. Silagens adequadamente fermentadas, com altas concentrações de ácido láctico e açúcares remanescentes, são mais afetadas pela deterioração aeróbia (WEINBERG; MUCK, 1996). Os fungos, as leveduras e algumas espécies de bactérias promovem a assimilação aeróbia de lactato da silagem, reduzindo o seu potencial de conservação (PAHLOW et al., 2003).

Os fungos filamentosos podem ser considerados coadjuvantes na deterioração aeróbia de silagens, pois, durante o desabastecimento do silo, o desenvolvimento deles acontece em sucessão ao crescimento das leveduras (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Driehuis et al. (2008) realizaram na Holanda o monitoramento de 24 fazendas produtoras de leite. Amostras tanto de silagem de milho como de gramíneas foram utilizadas, sendo colhidas em diferentes regiões do painel dos silos (centro, topo e regiões visualmente mofadas). Adicionalmente, amostras da mistura de silagens, as quais eram oferecidas para os animais, foram coletadas. Os resultados indicaram que a silagem foi a principal fonte de contaminação com micotoxinas. Silagem de gramínea apresentou baixas concentrações de zearalenona (ZEA), roquefortina C (RC) e ácido micofenólico (AMF) e não houve a presença de deoxinivalenol (DON). Em relação aos locais de coleta das amostras, as concentrações de DON e ZEA foram idênticas tanto para a superfície como para o topo do silo, ao contrário para os valores de RC e AMF que apresentaram maiores concentrações na região do topo dos silos.

Micotoxinas como aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina A, patulina e toxina T2 não foram identificadas no presente estudo. Segundo os autores, apesar de não haver presença dessas micotoxinas, a literatura se reporta com relativa frequência a presença dessas em silagens, co-produtos e ingredientes concentrados. Particularmente para aflatoxina B1, a não contaminação das silagens foi relacionada com as condições ambientais encontradas (baixa temperatura), fato que provavelmente impediu seu desenvolvimento. Baixos índices de aflatoxina B1 (0,92%) e ocratoxina A (6,1%) foram verificados em silagens de milho por Schmidt et al. (2011), indicando condições climáticas como um dos responsáveis pela baixa incidência.

As aflatoxinas representam as micotoxinas que mais causam preocupação, pois apresentam propriedades carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas, causando grandes danos à saúde humana e elevados prejuízos econômicos no desempenho de animais domésticos, como os ruminantes (LAZZARI, 1997). São produzidas principalmente pelas espécies *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, presentes em vegetais como o amendoim, o milho e o caroço de algodão.

A aflatoxina B1 (AFB1) é considerada uma das mais tóxicas produzidas por estas espécies. No fígado a AFB1 é biotransformada à aflatoxina M1 (AFM1), a qual é excretada no leite de animais em lactação (BATTACONE et al., 2005). Acreditava-se que a taxa de passagem da micotoxina do alimento para o leite era de 2%. Porém, estudos recentes colocaram em evidência que tal taxa está correlacionada com dois fatores: potencial produtivo do animal e estágio de lactação. Os valores de 2 a 2,5% referem-se a vacas com produção entre 16-25 kg/dia em estágio de lactação avançado. Como os animais estão se tornando cada vez mais produtivos, com produção superior a 30 kg de leite, a taxa se torna mais elevada, com valores próximos a 4% (VELDMAN et al., 1992).

Referências

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4thed. New York: John Wiley e Sons, 1996. 869 p.

ALLI, I.; PABARI, S.; FAIRBAIRN, R.; BAKER, B.E. The effects of sorbates on the ensilage of chopped whole-plant maize and lucerne. **Journal Science and Food Agricultural**, London, v. 36, p. 63-70, 1985.

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

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

AUERBACH, H. Verfahrensgrundlagen zur Senkung des Risikos eines Befalls von Silagen mit *Penicillium roqueforti* und einer Kontamination mit Mykotoxinen dieses Schimmelpilzes. **Landbauforsch Völkenrode**, Sonderheft, v. 168 p. 1-167, 1996.

AUERBACH, H.; OLDENBURG, E.; WEISSBACH, F. Incidence of *Penicillium roqueforti* and roquefortine C in silages. **Journal of Science and Food Agricultural**, London, v. 76, p. 565-572, 1998.

BATTACONE, G.; NUDDA, A.; PALOMBA, M.; PASCALE, M.; NICOLUSSI, P.; PULINA, G. Transfer of aflatoxin B1 from feed to Milk and from Milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 3063-3069, 2005.

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 as ração total e da silagem. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004. 1 CD ROM.

BINDER, E.M.; TAN, L.M.; CHIN, L.J.; HANDL, J.; RICHARD, J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients, **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 137, p. 265-282, 2007.

BOYSEN, M.E.; JACOBSSON, K.G.; SCHNURER, J. Molecular identification of species from the *Penicillium roqueforti* group associated with spoiled animal feed. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 1523-1526, 2000.

CALVO, A.M.; WILSON, R.A.; BOK, J.W.; KELLER, N.P. Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, n. 3, p. 447-459, 2002.

CHARMLEY, E. Towards improved silage quality – A review. **Canadian Journal of Animal Science**, Winnipeg, v. 81, p. 157-168, 2001.

COULTATE, T.P. **Food – The Chemistry of its Components**. 3rd ed. London: Series of the Royal Society of Chemistry Paperbacks, 1996. 501p.

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

DAVIDSON, P.M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTEVILLE, T.J. (Ed.). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 1997. p. 520-556.

DEGANO, L. Improvement of silage quality by innovative covering system. In: THE INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 12th, 1999, Uppsala. **Proceedings...** Uppsala, 1999. p. 296-297.

DRIEHUIS, F.; SPOELSTRA, S.F.; COLE, S.C.J. Improving aerobic stability by inoculation with *Lactobacillus buchneri*. In: THE INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 11th, 1996, Aberystwyth. **Proceedings...** Aberystwyth, 1996. p.106-107.

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

DRIEHUIS, F.; SPANJER, M.C.; SCHOLTEN, J.M.; GIFFEL, M.C. Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes, **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, p. 4261-4271, 2008.

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

FORGACS, J.; CARLL, W.T. Mycotoxicoses. **Advances in Veterinary Science**, Toledo, v. 7, p. 273-282, 1962.

FOX, E.M.; HOWLETT, B.J. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. **Current Opinion in Microbiology**, Paris, v. 11, p. 481-487, 2008.

GLENN, A.E. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 137, p. 213-240, 2007.

HAMMOND, B.G.; CAMPBELL, K.W.; PILCHER, C.D.; DEGOOVER, T.A.; ROBINSON, A.E.; McMILLEN, B.L.; SPANGLER, S.M.; RIORDAN, S.G.; RICE, L.G.; RICHARD, J.L. Lower fumosin mycotoxin levels in the grain of Bt corn grow in the United States in 2000-2002. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 52, p. 1390-1397, 2004.

HATTORI, I.; KUMAI, S.; FUKUMI, R.; BAYORBOR, T.B. The effect of some additives on aerobic deterioration of corn silage. **Animal Science and Technology**, Amsterdam, v. 65, p. 547-550, 1995.

HOFFMEISTER, D.; KELLER, N.P. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. **Natural Product Reports**, San Diego, v. 24, p. 393-416, 2007.

HONIG, H. Reducing losses during storage and unloading of silage. In: PAHLOW, G; HONIG, H. (Ed.). **Forage conservation towards 2000**. Braunschweig: European Grassland Federation, 1991. p.116-128.

JOUANY, J.P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 137, p. 342-362, 2007.

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

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

LACEY, J. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. **Journal of Applied Bacteriology**, Malden, v. 67, p. 11-25, 1989.

LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2 ed. Curitiba:Paranaset, 1997. 134p.

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

MAGAN, N.; LACEY, J. Ecological determinants of mould growth in stored grain. **International Journal of Food Microbiology**, Torino, v. 7, p. 245, 1988.

MANSFIELD, M.A.; KULDAU, G.A. Microbiological and molecular determination of mycobiota in fresh and ensiled maize silage. **Mycologia**, Corballis, v. 99, n. 2, p. 269-278, 2007.

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

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

MIEDANER, T.; WILDE, F.; STEINER, F.; BUERSTMAYR, H. KORZUN, V. EBMEYER, E. Stacking quantitative trait loci (QTL) for *Fusarium* head blight resistance from non adapted sources in an European elite spring wheat background and assessing their effects on deoxynivalenol (DON) content and disease severity. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 112, p. 562-569, 2006.

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

MORGAVI, D.P.; RILEY, R.T. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 137, p. 201-212, 2007.

NELSON, C.E. Strategies of mold control in dairy feeds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 898-902, 1992.

NUSSIO, L.G.; PAZIANI, S.F.; NUSSIO, C.M.B. Ensilagem de capins tropicais. In: BATISTA, A.M.V.; BARBOSA, S.B.P.; SANTOS, M.V.F.; FERREIRA, L.M.C. (Ed.). REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., Recife. **Anais...** Recife.: SBZ, 2002. p. 60-99.

NUSSIO, L.G.; SCHMIDT, P.; PEDROSO, A.F. Silagem de cana-de-açúcar. . 4 ed. In: EVANGELISTA, A.R.; REIS, S.T.; GOMIDE, E.M. (Ed.). **Forragicultura e pastagens: Temas em evidência**. Lavras: UFLA, 2003. p. 49-72.

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

OLDENBURG, E.; HÖPPNER, F. *Fusarium* mycotoxins in forage maize – occurrence, risk assessment, minimization. **Mycotoxin Research**, Giessen, v.19, p. 43-46, 2003.

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

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

PEDROSO, A.F.; NUSSIO, L.G.; LOURES, D.R.S.; PAZIANI, S.F.; IGARASI, M.S.; COELHO, R.M.; HORII, J.; RODRIGUES, 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**. Brasília, v.36, n.3, p.558-564, 2007.

PELHATE, J. Maize silage: Incidence of moulds during conservation. **Folia Veterinaria**, Milano, v.7, p. 1-16, 1977.

PIER, A.C. An overview of the mycotoxicosis of domestic animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v, 163, n.11, p.1259-1261, 1973.

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

RANKIN, M.; GRAU, C. Agronomic considerations for molds and mycotoxins in corn silage. **Focus on Forage**, Madison, v.4, n.1, p.1-4, 2002.

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

REIB, J. Development of *Aspergillus parasiticus* and formation of aflatoxin B1 under the influence of conidiogenesis affecting compounds. **Archives of Microbiology**, Paris v.133, p. 236-238, 1982.

SAVOIE, P. Optimization of plastic covers for stack silos. **Journal of Agricultural Engineering Research**, Easton, v. 41, p. 65-73, 1988.

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

SCHMIDT, P.; SOUZA, C.M.; NOVINSKI, C.O.; JUNGES, D.; REZENDE, D.M.L.C. Níveis de micotoxinas em silagens de milho em cinco bacias leiteiras do Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 48., 2011, Belém. **Anais...** Belém: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2011. 1 CD ROM.

SNELL, H.G.J; OBERNDORFER, C; LUCKE, W.; VAN DEN WEGHE, H.F.A. Effects of the colour and thickness of polyethylene film on ensiling conditions and silage quality of chopped maize, as investigated under ambient conditions and mini-silos. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 57, p. 342-350, 2002.

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

TUITE, J. **Plant pathological methods, fungi and bacteria**. Minneapolis:Burgess Publ. , 1969. 239p,

VELDMAN, A.; MEIJS, J.A.C.; BORGGREVE, G.J.; HEERESVAN DER TOL, J.J Carry-over of aflatoxin from cows food to milk. **Animal Production**, Washington, v.55, p.163-168, 1992.

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

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

WOOLFORD, M.K. Microbiological screening of the straight chain fatty acids (C1-C12) as potential silage additive. **Journal of Science and Food Agricultural**, London, v.26, p. 219-228, 1975.

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

3 DETERIORAÇÃO AERÓBIA EM SILAGENS DE MILHO VEDADAS POR DIFERENTES TIPOS DE LONAS E USO DE ADITIVOS NA CAMADA SUPERIOR DOS SILOS

Resumo

O objetivo desse trabalho foi avaliar as características fermentativas e a estabilidade aeróbia das silagens de milho vedadas com diferentes tipos de filme plástico, aplicação na camada superior de aditivo químico ou microbiano e proteção do filme com terra, visando o controle da deterioração aeróbia. Os experimentos foram desenvolvidos em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, compondo 12 tratamentos, com três repetições. Como tratamentos foram utilizados dois tipos de filmes plásticos: lona de polietileno dupla face, com espessura de 200 µm e lona coextruzada de polietileno e poliamida dupla face, com espessura de 125 µm, associados ou não a presença de inoculante bacteriano heterolático: *Lactobacillus buchneri* ou aditivo químico: benzoato de sódio, no topo da massa, com ou sem a compressão por terra sobre o filme plástico. Houve diferença para o tipo de filme plástico utilizado, onde foi observado maiores valores de temperatura para as silagens vedadas com o filme de polietileno. Com relação ao uso de aditivos, não foi observada diferença entre os mesmos. O tempo para a ocorrência da máxima temperatura foi menor para filme de polietileno em relação ao filme que continha poliamida, gerando diferença de 2,45 horas. Entre os aditivos o tempo para esse alcance foi semelhante, com valor médio de 15,5 horas. As perdas de MS, os valores de pH, as concentrações de ácido acético, ácido butírico e a contagem de fungos filamentosos não apresentaram diferença entre os tipos de lonas utilizadas. As silagens aditivadas com benzoato de sódio ou *Lactobacillus buchneri* apresentaram menores perdas de matéria seca e menores valores de pH com relação a silagem não aditivada. Apenas em três amostras foram detectadas a presença de aflatoxina B1, sendo 16,67% das silagens providas da vedação com o filme plástico de polietileno, 25% das silagens não aditivadas e 16,67% das silagens que não tiveram sobre o filme plástico, o uso de terra. O filme de polietileno apresentou temperatura superior ao filme coextruzado de polietileno e poliamida em todos os momentos da exposição aeróbia. Não houve diferença entre o tipo de filme utilizado, porém a medida que se prolongou o tempo de exposição aeróbia, houve aumento nos valores de pH das silagens. Em relação ao uso de aditivos, os valores de pH apresentaram diferença entre os tratamentos e ao longo do período de exposição aeróbia das silagens. O uso do filme coextruzado de polietileno com poliamida e o uso de *Lactobacillus buchneri* ou benzoato de sódio durante o período fermentativo diminuíram o risco de deterioração das silagens na área periférica dos silos. As silagens tratadas com benzoato de sódio e vedadas com o filme coextruzado de polietileno com poliamida apresentaram maior estabilidade aeróbia.

Palavras-chave: Controle de perdas; Filme plástico; Micotoxinas; Poliamida; Polietileno

Abstract

The objectives of this experiment were to evaluate the fermentation profile and aerobic stability of corn silage covered with different types of plastic sheets, applying additives in the top layer and, protect the film with soil, to reduce the top losses in corn silages. The experiments were carried out in a factorial completely randomized design, composed by 12 treatments with three replications. The treatments used were: plastic sheet (black-on-white polyethylene film with 200 μm thick or black-on-white coextruded polyethylene-polyamide film with 125 μm thick); bacterial or chemical additives applied onto the top of the silos; addition of a soil layer over the external surface of the plastic sheets. There was a difference between the plastic sheets, which was observed higher temperature values for the corn silage covered with the polyethylene film. Regarding the use of additives, there was no difference between them. The time to reach the maximum temperature was lower in polyethylene film, which showed 2.45 hours early than polyamide film. In relation to additives, the time to reach the maximum temperature was similar, with an average of 15.5 hours. The DM losses, pH values, acetic acid, butyric acid and molds counts showed no difference between the plastic sheets. The use of additives showed lower DM losses and pH values in relation the control silage. The presence of aflatoxin B1 was detected in three samples from only the silage covered with polyethylene film, without additive and without soil layer over the external surface of the film. During aerobic exposure, the polyethylene film showed higher temperature than polyamide film. There was no difference between in pH values among the plastic sheets used, but as time was prolonged, there was an increase in silages pH values. In relation the use of additives and throughout the air exposure time the pH values were similar between treatments. The use of polyamide plastic film and additives (sodium benzoate or *Lactobacillus buchneri*) diminished the potential silage spoilage risks at the top of the silos. The results indicate that silages treated with sodium benzoate and sealed with the polyamide film were more aerobically stable.

Keywords: Losses control; Mycotoxins; Plastic sheet; Polyamide; Polyethylene

3.1 Introdução

A silagem de milho é um dos volumosos conservados mais conhecido e utilizado em todo o mundo, principalmente por sua qualidade nutricional desejável e características favoráveis a ensilagem. Entretanto, por apresentar elevado valor nutritivo, a probabilidade de este alimento ser deteriorado é grande, principalmente por descuidos de manejo e práticas adotadas durante a ensilagem e pós abertura dos silos, tendo como principal vilão, o oxigênio.

Os efeitos deletérios do oxigênio ocorrem no abastecimento e durante o armazenamento pela permeabilidade das lonas, furos acidentais ou pelo fechamento inadequado, principalmente nas áreas marginais do silo (WEINBERG; ASHBELL, 2003). Entretanto, durante a remoção e fornecimento das silagens aos animais, o contato com O₂ se torna inevitável. As leveduras assimiladoras de ácidos orgânicos consomem o ácido láctico (LINDGREN et al., 1985), elevando o pH da silagem e aumentando os riscos no desenvolvimento de bactérias oportunistas (*Bacillus*; *Clostridium*; *Listeria*), levedura e fungos filamentosos, depreciando o valor nutritivo e alterando a qualidade higiênica do volumoso (LINDGREN; OLDENBURG; PAHLOW, 2002).

As estratégias para conter a deterioração aeróbia de silagens são aquelas que tentam impedir o influxo de oxigênio para dentro do silo, bem como a tentativa de controlar microrganismos deterioradores. Os filmes de polietileno utilizados na cobertura de silos apresentam permeabilidade ao oxigênio, a qual tende a aumentar notavelmente com a elevação da temperatura ambiental (DEGANO, 1999). Isto significa que durante o período do verão as silagens podem se tornar mais propensas à deterioração aeróbia, devido ao aumento da permeabilidade das lonas, com o conseqüente movimento gasoso devido à diferença de temperatura e pressão.

Atualmente, existem formas de controle de microrganismos indesejáveis, como uso de ácidos (acético, fórmico, benzóico e propiônico), por seu efeito antifúngico (WOOLFORD, 1975) e também microrganismos, como por exemplo, a inclusão da bactéria *Lactobacillus buchneri*.

Nos países do hemisfério Norte, como EUA e Europa já existem empresas especializadas na comercialização de *Lactobacillus buchneri* para ensilagem de milho,

promovendo diversas opções de cepas e diferentes concentrações da bactéria no momento da aplicação (KLEINSCHMIT; SCHMIDT; KUNG, 2005).

Dentro desse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar as características fermentativas e a estabilidade aeróbia das silagens de milho vedadas com diferentes tipos de filme plástico, aplicação na camada superior de aditivo químico ou microbiano e proteção do filme com terra, visando o controle da deterioração aeróbia.

3.2 Materias e Métodos

3.2.1 Ensilagem e tratamentos

O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP/ESALQ). O híbrido de milho utilizado foi o Pioneer 30F90 *Bt* e quando o mesmo atingiu média de 35% de matéria seca, procedeu-se a ensilagem (Tabela 1) no dia 17/04/2008.

As plantas foram colhidas mecanicamente com colhedora de forragem marca Mentamint[®], tracionada por trator, regulada para corte com tamanho médio de partículas entre 5 a 10 mm.

Como tratamentos foram utilizados dois tipos de filmes plásticos: lona de polietileno dupla face, com espessura de 200 µm e lona coextruzada de polietileno e poliamida dupla face, com espessura de 125 µm, associados ou não a presença de inoculante bacteriano heterolático: *Lactobacillus buchneri* ou aditivo químico: benzoato de sódio, no topo da massa, com ou sem a compressão por terra sobre o filme plástico, totalizando 12 tratamentos, sendo os mesmos exemplificados na Figura 1.

Adotou-se como topo do silo, a região periférica compreendida pelos 25 cm restantes para a vedação dos silos. O aditivo bacteriano foi aplicado à forragem na porção superior do silo (25 cm), na forma de solução aquosa e concentração 1×10^6 ufc/g de forragem. O benzoato de sódio foi aplicado à forragem como descrito para o aditivo bacteriano, na concentração de 0,02% (% matéria natural). Ambos, por meio de pulverizador costal e diluídos em água deionizada (10 L/tonelada de forragem), buscando-se distribuição uniforme na massa de forragem (Figura 2). Os tratamentos representados pela compressão por terra receberam carga de 100 kg de terra/m².

Figura 1 - Detalhamento dos tratamentos utilizados na confecção das silagens (T: compressão por terra)

Figura 2 - Aplicação do aditivo na massa de forragem para o abastecimento dos 25 cm finais da caixa d'água

Como silos experimentais (unidades experimentais) foram utilizadas caixas d'água de fibrocimento (500 L), com superfície superior de 1,045 m². Durante a ensilagem, os silos foram abastecidos em camadas de 15 – 25 cm e compactados por

pisoteio humano até atingir densidade de 650 kg/m^3 . Após o abastecimento, os silos foram vedados com o uso de fitas adesivas e de borracha (Figura 3), permanecendo expostos ao ambiente durante 88 dias, momento em que ocorreu a abertura dos mesmos.

Figura 3 - A) Compactação da forragem por meio de pisoteio humano; B) Detalhe da vedação da lona com fita adesiva e de borracha; C) Visão geral da área experimental

3.2.2 Amostragens e variáveis analisadas na forragem fresca

Durante a ensilagem, a forragem foi amostrada e fragmentada em cinco sub-amostras. A primeira sub-amostra foi pesada e levada à estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas. Após este período foram pesadas novamente, moídas até as partículas atingirem menos de um milímetro e armazenadas em recipientes de plástico. A partir das amostras secas e moídas foram determinadas as concentrações de matéria seca (MS) e de matéria mineral (MM) conforme AOAC (1990) e a concentração de proteína bruta (PB) segundo os métodos descritos por Wiles, Gray e Kissling (1998), por meio da combustão das amostras segundo o método de Dumas, utilizando auto-analisador de nitrogênio, marca LECO modelo FP-528.

As concentrações de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram realizadas com base no método seqüencial proposto pela ANKOM[®] Fiber Analyser (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY) e descrito por Holden (1999), assim como a digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca (DVIVMS). Para determinação da FDN foi utilizado amilase e sulfito de sódio.

A segunda sub-amostra foi utilizada na avaliação do tamanho de partículas das silagens com base na estratificação das partículas por meio do método "Penn State

Particle Size" (LAMMERS; BUCKMASTER; HEINRICHS, 1996). Entretanto, foi incorporada uma adaptação ao método original realizada por Mari e Nussio (2002) com a inserção de uma peneira adicional com orifícios de diâmetro de 38 mm. Dessa forma, foi obtido o material retido com diâmetro superior a 38 mm, entre 38 e 19 mm, entre 19 e 7,80 mm e inferior a 7,80 mm. O tamanho médio de partículas foi estimado por meio da ponderação da proporção de retenção do material em cada uma das peneiras.

A terceira sub-amostra foi utilizada para o preparo do extrato aquoso, onde uma alíquota de 30 g de amostra diluída em 270 g de água deionizada foram pesadas em sacos plásticos e homogeneizadas durante 4 minutos mediante aparelho Lab-Blender Stomacher 400 (Steward Laboratory, London). Após esse procedimento foram obtidos os valores de pH, por meio de um potenciômetro digital modelo DM 20, marca Digimed®. Em seguida, a solução foi filtrada em papel de filtro Whatman® 54 e o extrato obtido foi utilizado para análises de carboidratos solúveis (CHO's).

A concentração de carboidratos solúveis foi obtida pelo método colorimétrico, segundo a metodologia descrita por Dubois et al. (1956) com leitura em comprimento de onda de 490 nm.

A quarta sub-amostra foi utilizada na contagem da população de fungos filamentosos. As amostras frescas da forragem foram pesadas (30 g) em sacos plásticos esterilizados e diluídas em 270 g de solução tampão (Oxoid Ringer's tablets) mais 0,1% de peptona (Difco bacto peptone # 0118-01-8) e homogeneizadas durante 4 minutos mediante aparelho Lab-Blender Stomacher 400 (Steward Laboratory, London). A partir dos extratos diluídos e filtrados foram realizadas as demais diluições (10^{-2} a 10^{-6}) e realizado o plaqueamento em placas de Petri contendo o meio de cultura YGC agar (Fluka). A determinação da população de fungos filamentosos foi realizada após incubação de 5 dias, a 25°C. Os números de microrganismos presentes foram contados como unidade formadora de colônia (ufc) e expressos como logaritmo na base 10.

A quinta sub-amostra foi levada à estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 horas, moídas até as partículas atingirem menos de um milímetro e encaminhada para o Laboratório de Micotoxinas do Departamento de Ciências dos Alimentos da USP/ESALQ para determinação de aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 , G_2), segundo metodologia

descrita por Soares e Rodriguez-Amaya (1989), utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência.

3.2.3 Perdas de matéria seca durante o armazenamento

Durante o enchimento dos silos experimentais, foi colocado um saco de nylon por unidade experimental, contendo cerca de 3 kg de forragem, localizado na zona periférica do silo (25 cm), para determinação das perdas fermentativas, de acordo com a equação 1:

$$PMS = 100 - \left(\frac{MF_f \times MS_f}{MF_i \times MS_i} \times 100 \right) \quad (1)$$

Onde:

PMS = perdas de matéria seca (%); MFi = massa de forragem inicial (kg); MSi = concentração de matéria seca inicial (%); MFf = massa de forragem final (kg); MSf = concentração de matéria seca final (%).

3.2.4 Perfil de temperatura no armazenamento

Como a elevação da temperatura da massa é um importante indicador do fenômeno de deterioração aeróbia, na camada superficial (25 cm) de cada unidade experimental, foram acondicionados sensores de temperatura associados à sistema informatizado e eletrônico de aquisição de dados (Chiplog[®], IMPAC, USA), programados para a tomada de temperatura da massa em intervalos constantes de 4 horas até a respectiva época de abertura.

Com a obtenção do banco de dados foram geradas as seguintes variáveis: Tmax: temperatura máxima alcançada; TTmax: tempo para alcançar a temperatura máxima; T média: temperatura média. Com o conjunto de dados também foi possível obter gráficos das temperaturas das unidades experimentais ao longo de todo o período do ensaio.

3.2.5 Amostragens e variáveis analisadas na silagem

Decorridos 88 dias de armazenamento, os silos foram abertos e os sacos de nylon recuperados e pesados para determinação da PMS das silagens, conforme descrito anteriormente. A quantidade de silagem contida na camada superficial (25 cm) foi retirada (Figura 4), homogeneizada e fracionada em quatro porções.

Figura 4 - Abertura dos silos e retirada da camada superior para amostragens

Para análise dos ácidos graxos voláteis (ácido acético e ácido butírico), 800 μL do extrato aquoso da silagem, juntamente com 200 μL de ácido fórmico e 100 μL de padrão interno foram transferidos para um frasco de vidro. A leitura foi realizada em cromatógrafo líquido gasoso, CLG (Hewlett Packard® 5890, series II). A determinação da concentração de ácido láctico foi realizada por meio da adaptação do método espectrofotométrico (565 nm) de Pryce (1969).

3.2.6 Estabilidade aeróbia das silagens

Após a abertura dos silos, aproximadamente 4 kg de silagem foram colocadas sem compactação em baldes de plástico sem tampa (Figura 5), os quais foram mantidos em ambiente protegido, à temperatura ambiente, por um período de 240 horas (10 dias). No centro geométrico dos baldes foram acondicionados sensores de temperatura associados à sistema informatizado e eletrônico de aquisição de dados (Chiplog®, IMPAC, USA), programados para a tomada de temperatura da massa em intervalos constantes de 4 horas.

Durante o período de estabilidade aeróbia foram realizadas coleta de amostras das silagens no momento da abertura dos silos e após 120 horas (5º dia) e 240 horas (10º dia) para análise laboratorial de pH.

Figura 5 - Avaliação da estabilidade aeróbia das silagens e do ambiente

Para a determinação da estabilidade aeróbia utilizando-se dos dados de temperatura, foram estudadas as seguintes variáveis: Tmax: temperatura máxima alcançada; TTmax: tempo para alcançar a temperatura máxima; T média: temperatura média; TmaxA: temperatura máxima da silagem descontando-se a temperatura ambiente; Tquebra: tempo necessário para a temperatura da silagem atingir 2°C acima da temperatura ambiente.

Com base no conjunto de dados gerados pelos sensores eletrônicos foi possível obter valor entre a diferença da temperatura da unidade experimental com a temperatura ambiente ao longo de todo o período do ensaio. Dessa maneira, foi possível determinar o acúmulo total de temperatura em cada balde. Esta variável foi obtida por meio da diferença entre a temperatura do volumoso e a do ambiente registrada nos intervalos de tempo determinados e, para fins de comparação entre os tratamentos, foi calculada na primeira metade do ensaio (1º ao 5º dia) e no período total (1º ao 10º dia).

3.2.7 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2x3x2), com três repetições, sendo os fatores, o tipo de vedação, a presença ou não de aditivos e a compressão por terra. Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância e as suas médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o recurso PROC MIXED do programa SAS (2003).

O delineamento experimental utilizado na avaliação da estabilidade aeróbia foi o inteiramente casualizado, com três repetições, com medidas repetidas no tempo. Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância e as suas médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o recurso PROC MIXED do programa SAS (2003).

3.3 Resultados

Neste item as variáveis estudadas estão apenas descritas, as comparações e discussões estão apresentadas no item 3.4. A maioria das variáveis foi posicionada em dois tipos de tabelas, a primeira mostra a estatística descritiva, com dados de média geral, valores de mínimo, valores de máximo e coeficiente de variação. Juntamente são apresentados valores de significância para cada fator estudado (lona, aditivos e cobertura sobre a lona), bem como suas interações.

Em função do fator terra não apresentar significância nas variáveis estudadas, o mesmo foi abolido da descrição e discussão dos dados, entretanto, não houve a retirada dos dados do modelo estatístico.

3.3.1 Características da forragem no momento da ensilagem

Na Tabela 1 estão apresentadas as variáveis referentes a forragem no momento da ensilagem, sendo apresentado apenas valores para caracterização da forragem, sem comparações estatísticas.

Os teores de matéria seca e matéria mineral apresentaram amplitude valores entre 33,48% a 36,62 e 4,12% a 4,75, respectivamente. Os valores de proteína bruta, fibra insolúvel em detergente neutro e fibra em detergente ácido apresentaram valores médios de 6,22%, 46,37% e 22,95%, respectivamente. A fração carboidrato solúvel e a

digestibilidade *in vitro* da matéria seca variaram entre 6,22% a 6,69% e 73,17% a 74,84%.

No momento da ensilagem foi verificada a presença de fungos filamentosos, os quais apresentaram contagem média de 2 ufc/g forragem. Entretanto, não foram identificadas aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 na forragem.

Os valores de pH e tamanho médio de partícula apresentaram valores médios de 5,16 e 1,31 cm, respectivamente.

Tabela 1 - Características da forragem no momento da ensilagem

Variável ¹	Polietileno			Polietileno + Poliamida		
	C	BS	LB	C	BS	LB
MS,%	33,88	36,03	35,30	33,48	36,62	35,40
MM, % MS	4,24	4,12	4,57	4,70	4,38	4,75
PB, % MS	6,75	5,73	6,15	6,93	5,63	6,15
FDN, % MS	45,08	47,18	46,04	46,45	45,40	48,08
FDA, % MS	22,43	23,27	22,32	23,06	22,66	23,93
CHO's, % MS	6,56	6,44	6,42	6,68	6,22	6,64
DVIVMS, % MS	73,51	74,84	73,64	73,17	74,17	73,88
FF, log ₁₀ ufc/g	2,27	2,43	2,31	1,45	1,68	1,83
Aflatoxinas, ppb	nd	nd	nd	nd	nd	nd
pH	5,25	4,99	5,18	5,22	5,10	5,24
TMP, cm	1,38	1,18	1,32	1,36	1,38	1,25

¹MS: matéria seca; MM: matéria mineral; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; CHO's = carboidratos solúveis; DVIVMS: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca; FF: fungos filamentosos; UFC: unidades formadoras de colônias; TMP = tamanho médio de partículas; C: controle; BS: benzoato de sódio; LB: *Lactobacillus buchneri* nd = não detectado para aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.

3.3.2 Temperatura da silagem durante o armazenamento

Os valores de temperatura das silagens de milho em função do tipo de filme plástico e do aditivo utilizado durante o armazenamento estão apresentados nas Figuras 6 e 7, respectivamente. Houve diferença ($P < 0,05$) para o tipo de filme plástico utilizado, onde foi observado maiores valores de temperatura para as silagens vedadas

com o filme de polietileno. Com relação ao uso de aditivos, não foi observada diferença ($P>0,05$) entre os mesmos.

Figura 6 - Variação temporal da temperatura em silagens de milho, localizadas na zona periférica dos silos, sob a vedação de filme de polietileno (PE) ou filme de polietileno+poliamida (PA) (média incluindo os aditivos e terra). Efeito de lona: $P<0,05$; Efeito de dia: $P<0,001$; Interação Tratamento*dia: $P<0,001$

Para comparação das temperaturas das silagens ao longo dos 88 dias do período fermentativo foi verificada diferença ($P<0,001$), evidenciando queda nos valores com o passar dos dias de fermentação. No momento do fechamento dos silos, os valores médios de temperatura da forragem foram de 33,7 e 34,4 °C, já na abertura dos silos a temperatura apresentou valores de 22,5 e 19,2 °C, respectivamente, para o filme de polietileno e para o filme que também continha em sua composição a poliamida. Valores próximos aos verificados para os filmes plásticos foram observados na comparação com os aditivos, onde no fechamento dos silos a temperatura média verificada foi de 33,0 °C, e na abertura observou-se um valor médio de 20,7 °C.

Figura 7 - Variação temporal da temperatura em silagens de milho, localizadas na zona periférica dos silos, sob o uso de aditivos controladores da deterioração aeróbia (média incluindo lonas e cobertura). Efeito de aditivo: $P=0,52$; Efeito de dia: $P<0,001$; Interação Tratamento*dia: $P<0,001$

Na Tabela 2 estão apresentadas as estatísticas descritivas para as avaliações relacionadas com a temperatura das silagens entre o momento do fechamento dos silos e a abertura dos mesmos.

Tabela 2 - Estatística descritiva para variáveis de temperatura de silagens de milho sob diferentes estratégias de vedação ao longo do período fermentativo

Variável ¹	Valores ²				Efeitos ³			Interações			
	Média geral	CV %	Mín	Máx	L	A	C	LxA	LxC	AxC	LxAxC
Tmax, °C	34,02	2,04	31,5	37,5	*	**	NS	NS	NS	NS	NS
TTmax, horas	12,52	19,85	4,00	20,0	*	**	NS	NS	*	NS	NS
T média, °C	22,19	4,19	19,5	25,7	**	*	NS	NS	*	NS	NS

¹Tmax: temperatura máxima alcançada; TTmax: tempo para alcançar a temperatura máxima; T média: temperatura média; ²CV: coeficiente de variação; Mín: mínimo; Máx: máximo; ³L: lona; A: aditivo; C: cobertura; ** $P<0,001$; * $P<0,05$; NS: não significativo.

As comparações das variáveis relacionadas com a temperatura das silagens em função do tipo de lona e do tipo de aditivo utilizado são apresentadas na Tabela 3. A silagem vedada com o filme de polietileno com poliamida apresentou maiores valores

($P < 0,05$) de temperatura máxima alcançada durante o armazenamento em relação às vedadas pelo filme de polietileno. Entretanto, o tempo para a ocorrência da máxima temperatura foi menor ($P < 0,05$) para filme de polietileno em relação ao filme que continha poliamida, gerando diferença de 2,45 horas.

A temperatura média das silagens não seguiu a mesma tendência da temperatura máxima alcançada, mostrando maior valor ($P < 0,001$) para a silagem vedada com filme de polietileno.

Tabela 3 - Temperatura de silagens de milho sob diferentes estratégias de vedação ao longo do período fermentativo

Variável ¹	Lonas ²			Aditivos ²			
	PE	PA	EPM ³	C	BS	LB	EPM ³
Tmax, °C	33,76 ^b	34,40 ^a	0,18	36,63 ^a	33,40 ^b	32,27 ^c	0,22
TTmax, horas	11,33 ^b	13,78 ^a	0,63	6,67 ^b	15,17 ^a	15,83 ^a	0,76
T média, °C	23,07 ^a	21,26 ^b	0,24	21,43	22,75	22,31	0,30

¹Tmax: temperatura máxima alcançada; TTmax: tempo para alcançar a temperatura máxima; T média: temperatura média; ²PE: lona de polietileno dupla face (200 µm); PA: lona coextruzada de polietileno e poliamida dupla face (125 µm); C: controle; BS: benzoato de sódio; LB: *Lactobacillus buchneri*; ³EPM: erro padrão da média.

Quanto ao uso de aditivos, houve redução ($P < 0,001$) nos valores da temperatura máxima atingida, onde o aditivo bacteriano apresentou valor inferior ($P < 0,001$) ao aditivo químico (Tabela 3). O tempo para atingir a máxima temperatura foi menor ($P < 0,001$) para a silagem controle. Entre os aditivos o tempo para esse alcance foi semelhante ($P > 0,05$), com valor médio de 15,5 horas para a temperatura atingir o máximo valor. Para temperatura média das silagens não foi verificado diferença ($P > 0,05$) entre os aditivos utilizados.

3.3.3 Características fermentativas e microbiológicas das silagens

As estatísticas descritivas para as avaliações relacionadas com as características fermentativas e microbiológicas das silagens no momento da abertura dos silos estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Estatística descritiva para variáveis do padrão de fermentação de silagens de milho sob diferentes estratégias de vedação no momento da abertura dos silos

Variável ¹	Valores ²				Efeitos ³			Interações			
	Média geral	CV %	Mín	Máx	L	A	C	LxA	LxC	AxC	LxAxC
Perdas MS, % MS	8,21	17,69	4,55	15,45	NS	*	NS	*	*	NS	NS
pH	3,97	1,54	3,80	4,33	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS
Ác. láctico, % MS	3,25	23,59	0,54	6,52	*	**	NS	NS	NS	NS	NS
C2, % MS	2,59	70,18	1,19	12,56	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C4, % MS	0,173	36,34	0,011	0,441	**	**	NS	NS	*	NS	NS
FF, log ufc/g	2,95	34,46	1,00	4,50	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS
Aflatoxinas, ppb											
B1	11,33	-	3,71	19,65	-	-	-	-	-	-	-
B2	0,81	-	0,55	1,07	-	-	-	-	-	-	-
G1	0,88	-	0,81	0,96	-	-	-	-	-	-	-
G2	nd	-	nd	nd	-	-	-	-	-	-	-

¹MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; C2: ácido acético; C4: ácido butírico; FF: fungos filamentosos; UFC: unidades formadoras de colônias; ²CV: coeficiente de variação; Mín: mínimo; Máx: máximo; nd: não detectado; ³L: lona; A: aditivo; C: cobertura; **P<0,001; *P<0,05; NS: não significativo.

Para os valores referentes a presença de aflatoxinas nas silagens não foi possível comparação de médias em virtude de apenas no tratamento com a lona de polietileno, sem aditivo e sem terra ter-se detectado sua presença.

As perdas de MS, os valores de pH, as concentrações de ácido acético, ácido butírico e a contagem de fungos filamentosos não apresentaram diferença (P>0,05) entre os tipos de lonas utilizadas (Tabela 5). A concentração de ácido láctico foi maior (P<0,05) para a silagem vedada com a lona coextruzada de polietileno e poliamida em relação ao filme de polietileno.

As silagens aditivadas com benzoato de sódio ou *Lactobacillus buchneri* apresentaram menores (P<0,05) perdas de matéria seca e menores (P<0,001) valores de pH com relação a silagem não aditivada (Tabela 5). A redução dos valores das silagens aditivadas em comparação a silagem controle representou 1,97% e 0,26, para perdas de matéria seca e pH, respectivamente.

Tabela 5 - Padrão de fermentação de silagens de milho sob diferentes estratégias de vedação no momento da abertura dos silos

Variável ¹	Lonas ²			Aditivos ²			
	PE	PA	EPM ³	C	BS	LB	EPM ³
Perdas MS, % MS	8,07	8,77	0,42	9,73 ^a	7,83 ^b	7,69 ^b	0,58
pH	3,97	3,96	0,01	4,14 ^a	3,86 ^b	3,91 ^b	0,02
Ác. láctico, % MS	2,79 ^b	3,70 ^a	0,18	1,81 ^c	3,46 ^b	4,47 ^a	0,22
C2, % MS	3,25	1,99	0,46	2,57	3,00	2,28	0,56
C4, % MS	0,22	0,12	0,02	0,26 ^a	0,14 ^b	0,11 ^b	0,02
FF, log ₁₀ ufc/g	3,21	2,70	0,24	2,94	2,75	3,17	0,29

¹MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; C2: ácido acético; C4: ácido butírico; FF: fungos filamentosos; UFC: unidades formadoras de colônias; ²PE: lona de polietileno dupla face (200 µm); PA: lona coextruzada de polietileno e poliamida dupla face (125 µm); C: controle; BS: benzoato de sódio; LB: *Lactobacillus buchneri*; ³EPM: erro padrão da média.

Dentre os ácidos orgânicos presentes nas silagens, o ácido láctico e o ácido butírico apresentaram diferenças ($P < 0,05$) na comparação para o fator aditivo. Foram verificadas maiores concentrações de ácido láctico (3,97% *versus* 1,81%) e menores valores de ácido butírico (0,13% *versus* 0,26%) para silagens aditivadas em relação a silagem não tratada. Não houve diferença ($P > 0,05$) para a concentração de ácido acético entre os tratamentos, apresentando valor médio de 2,62%. A contagem de fungos filamentosos não foi influenciada ($P > 0,05$) pelo uso de aditivos (Tabela 5), apresentando valor médio de 2,95 ufc/g forragem.

Na Tabela 6 são apresentados os valores de ocorrência de aflatoxina B1 em função dos fatores utilizados no arranjo experimental. Vale ressaltar que não foi considerada a presença de aflatoxinas B2, G1 e G2 em virtude da baixa concentração das mesmas frente a concentração obtida para a aflatoxina B1.

As amostras analisadas foram provenientes de amostragens durante a ensilagem ($n=36$) e no momento da abertura dos silos ($n=36$). Os dados das amostras realizadas no momento da ensilagem não atingiram nível mínimo de detecção, dessa forma, não foi possível incluí-las na discussão.

Das 36 amostras coletadas no momento da abertura dos silos, apenas em três foram detectadas a presença de aflatoxina B1. Esse número de amostras positivas representou contaminação de 16,67% das silagens providas da vedação com o filme

plástico de polietileno, 25% das silagens não aditivadas e 16,67% das silagens que não tiveram sobre o filme plástico, o uso de terra.

Tabela 6 - Ocorrência de aflatoxina B1 em silagem de milho no sob diferentes estratégias de vedação no momento da abertura dos silos

Fatores	Número de amostras		Ocorrência
	Relativa ao fator	Positivas	(%)
Lonas			
Polietileno	18	3	16,67
Poliamida	18	0	0,00
Aditivos			
Controle	12	3	25,00
Benzoato de sódio	12	0	
<i>Lactobacillus buchneri</i>	12	0	
Cobertura sobre a lona			
Sem terra	18	3	16,67
Com terra	18	0	0,00

3.3.4 Valor nutritivo das silagens na abertura dos silos

As estatísticas descritivas referentes às variáveis de valor nutritivo das silagens no momento da abertura dos silos estão apresentadas na Tabela 7. A comparação de médias entre os tipos de filmes plásticos e entre os aditivos utilizados são mostrados na Tabela 8.

Não houve diferença ($P>0,05$) entre as variáveis relacionadas à composição bromatológica (MS, MM, PB, FDN, FDA e DVIVMS) para as silagens vedadas com os diferentes filmes plásticos, exceto para o teor de carboidratos solúveis, onde o maior valor ($P<0,05$) encontrado foi para a silagem vedada com o filme coextruzado de polietileno com poliamida.

Tabela 7 - Estatística descritiva para variáveis de valor nutritivo de silagens de milho sob diferentes estratégias de vedação no momento da abertura dos silos analisadas durante o período fermentativo das silagens

Variável ¹	Valores ²				Efeitos ³			Interações			
	Média geral	CV %	Mín	Máx	L	A	C	LxA	LxC	AxC	LxAxC
MS, %	36,04	1,97	32,31	38,21	NS	**	*	NS	NS	**	NS
MM, % MS	4,69	8,09	3,94	5,36	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS
PB, % MS	7,06	4,19	6,30	8,12	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS
FDN, % MS	41,04	11,11	33,23	43,19	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
FDA, % MS	20,74	15,29	16,26	28,47	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CHO's, % MS	2,27	23,56	0,33	5,20	*	**	NS	*	NS	NS	NS
DVIVMS, % MS	72,48	5,20	64,14	78,78	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS

¹MS: matéria seca; MM: matéria mineral; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; CHO's: carboidratos solúveis; DVIVMS: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca; ²CV: coeficiente de variação; Mín: mínimo; Máx: máximo; ³L: lona; A: aditivo; C: cobertura; **P<0,001; *P<0,05; NS: não significativo.

Na comparação do fator aditivo, foi observada queda (P<0,001) no valor de matéria seca para a silagem controle com relação as silagens aditivadas. Para os valores de matéria mineral, fibra insolúvel em detergente neutro e fibra insolúvel em detergente ácido não houve diferença (P>0,05) entre os tratamentos, apresentando as variáveis médias de 4,69%, 41,04% e 20,74, respectivamente. O teor de proteína bruta foi maior (P<0,001) para a silagem vedada sem o uso de aditivo.

A concentração de carboidratos solúveis foi maior (P<0,001) para a silagem aditivada com benzoato de sódio (3,60%), seguida da silagem controle (1,90%). O menor valor foi verificado para a silagem tratada com *Lactobacillus buchneri* (1,32%).

Tabela 8 - Valor nutritivo de silagens de milho sob diferentes estratégias de vedação no momento da abertura dos silos

Variável ¹	Lonas ²			Aditivos ²			
	PE	PA	EPM ³	C	BS	LB	EPM ³
MS, %	36,21	35,88	0,17	34,89 ^b	36,96 ^a	36,29 ^a	0,21
MM, % MS	4,67	4,71	0,09	4,79	4,52	4,76	0,11
PB, % MS	7,07	7,06	0,07	7,68 ^a	6,61 ^b	6,90 ^b	0,09
FDN, % MS	41,52	40,56	1,07	41,90	40,02	41,19	1,32
FDA, % MS	20,81	20,67	0,75	21,06	20,25	20,91	0,91
CHO's, % MS	1,92 ^b	2,63 ^a	0,13	1,90 ^b	3,60 ^a	1,32 ^c	0,15
DVIVMS, % MS	72,19	72,76	0,89	72,14 ^{ab}	74,89 ^a	70,40 ^b	1,09

¹MS: matéria seca; MM: matéria mineral; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; CHO's: carboidratos solúveis; DVIVMS: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca; ²PE: lona de polietileno dupla face (200 µm); PA: lona coextruzada de polietileno e poliamida dupla face (125 µm); C: controle; BS: benzoato de sódio; LB: *Lactobacillus buchneri*; ³EPM: erro padrão da média.

A digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca apresentou maior valor ($P<0,05$) para a silagem aditivada com benzoato de sódio, sendo que a silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* apresentou o menor valor. A silagem controle apresentou valor intermediário, não diferindo estatisticamente entre as silagens aditivadas (Tabela 8).

3.3.5 Estabilidade aeróbia das silagens

Os valores de temperatura das silagens de milho em função do tipo de filme plástico e do aditivo utilizado durante a exposição aeróbia estão apresentados nas Figuras 8 e 9, respectivamente.

Houve diferença ($P<0,05$) entre os tipos de lonas utilizadas, bem como durante o período de exposição aeróbia das silagens. O filme de polietileno apresentou temperatura superior ao filme coextruzado de polietileno e poliamida em todos os momentos da exposição aeróbia. O primeiro pico termal para lona de polietileno foi observado na 76^a hora de exposição aeróbia (26,8 °C), já para o filme coextruzado de polietileno e poliamida este pico ocorreu na 112^a hora com temperatura de 23,3 °C.

Figura 8 - Variação temporal da temperatura em silagens de milho durante a exposição aeróbia, sob a vedação de filme de polietileno (PE) ou filme de polietileno+poliamida (PA) (média incluindo os aditivos e terra). Efeito de lona: $P < 0,05$; Efeito de horas: $P < 0,001$; Interação Tratamento*dia: $P = 0,47$

Com relação ao uso de aditivos, foi observado diferença ($P < 0,05$) para os valores de temperatura, sendo que a silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri* apresentou o primeiro pico termal (29 °C) após 80 h oras de exposição aeróbia, seguida da silagem controle, a qual apresentou temperatura de 26,5 °C após 112 horas de exposição aeróbia. A silagem tratada com benzoato de sódio não apresentou pico termal com a mesma intensidade das demais silagens.

Foi verificada diferença ($P < 0,001$) ao longo do período de exposição aeróbia, sendo que tanto para a silagem tratada com *Lactobacillus buchneri* como para a silagem controle foi verificada queda nos valores de temperatura na metade do período de exposição. A silagem tratada com benzoato de sódio teve elevação contínua de sua temperatura, porém com valores inferiores para as demais silagens (Figura 9).

Figura 9 - Variação temporal da temperatura em silagens de milho durante a exposição aeróbia, sob o uso de aditivos (média incluindo as lonas e terra). Efeito de lona: $P < 0,05$; Efeito de horas: $P < 0,001$; Interação Tratamento*dia: $P < 0,05$

As estatísticas descritivas referentes às variáveis de estabilidade aeróbia das silagens ao longo das 240 horas de avaliação estão apresentadas na Tabela 9.

Na Tabela 10 estão apresentadas as variáveis referentes às determinações de temperatura das silagens ao longo do período de exposição aeróbia. Os valores de temperatura máxima e temperatura média foram superiores ($P < 0,05$) para as silagens vedadas com o filme de polietileno em relação ao filme coextruzado de polietileno e poliamida.

O tempo para alcançar a temperatura máxima das silagens foi menor ($P < 0,05$) nas vedadas com o filme de polietileno, tempo esse alcançado cerca de 22 horas antes que a silagem vedada com filme coextruzado de polietileno e poliamida, a qual obteve temperatura máxima após 155,11 horas de exposição aeróbia.

O tempo para a temperatura das silagens ultrapassarem $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a temperatura ambiente, denominado tempo para quebra de estabilidade, diferiu ($P < 0,001$) entre os tipos de filmes plásticos utilizados. A silagem vedada com o filme coextruzado de polietileno e poliamida apresentou sua quebra de estabilidade em momento posterior a silagem vedada com filme de polietileno (Tabela 10).

Tabela 9 - Estatística descritiva para variáveis relacionadas com a estabilidade aeróbia de silagens de milho sob diferentes estratégias de vedação ao longo do período de exposição aeróbia

Variável ¹	Valores ²				Efeitos ³			Interações			
	Média geral	CV %	Mín	Máx	L	A	C	LxA	LxC	AxC	LxAxC
Tmax, °C	33,98	17,29	20,5	45,0	*	*	NS	NS	NS	NS	NS
TTmax, horas	140,0	25,86	48,0	240,0	*	**	NS	NS	NS	NS	NS
T média, °C	22,73	7,33	18,4	28,1	*	*	NS	NS	NS	NS	NS
TmaxA, °C	15,92	27,80	0,80	27,3	*	*	NS	NS	NS	NS	NS
Tquebra, horas	100,67	31,69	24,0	240,0	**	**	NS	NS	NS	NS	*
pH	5,09	29,38	3,63	7,68	*	*	NS	NS	NS	NS	NS
ST 0-120, °C	87,25	49,39	-18,5	253,0	**	**	NS	*	*	NS	*
ST 0-240, °C	246,0	37,76	-6,7	526,3	*	*	NS	NS	NS	NS	NS

¹Tmax: temperatura máxima alcançada; TTmax: tempo para alcançar a temperatura máxima; T média: temperatura média; TmaxA: temperatura máxima da silagem descontando-se a temperatura ambiente; Tquebra: tempo necessário para a temperatura da silagem atingir 2°C acima da temperatura ambiente; ST: somatório de temperatura da silagem acima da temperatura ambiente ao longo de 120 ou 240 horas de estabilidade aeróbia; ²CV: coeficiente de variação; Mín: mínimo; Máx: máximo; ³L: lona; A: aditivo; C: cobertura; **P<0,001; *P<0,05; NS: não significativo.

O somatório de temperatura da silagem acima da temperatura ambiente ao longo das 120 e 240 horas, foram afetadas (P<0,05) pelo tipo de filme plástico utilizado (Tabela 10). As silagens vedadas com o filme de polietileno apresentaram maior valor acumulado durante 120 horas (122,79 °C) e 240 horas (308,04 °C) em relação ao filme coextruzado de polietileno e poliamida.

Com relação ao uso de aditivos, a temperatura máxima alcançada (P<0,05) foi para a silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri*. O menor valor foi verificado na silagem aditivada com benzoato de sódio, sendo que a silagem controle apresentou valores intermediários, os quais não diferiram entre os aditivos utilizados.

Houve diferença (P<0,001) entre os aditivos para o tempo para atingir a máxima temperatura. Em ordem decrescente, o tempo para alcance da máxima temperatura foi de 208,67 horas para silagem aditivada com benzoato de sódio, 134,01 horas para a silagem controle e 89,67 para a silagem aditivada com *Lactobacillus buchneri*. A temperatura média e a temperatura máxima alcançada pela silagem descontando-se a temperatura ambiente foram menores (P<0,05) para a silagem aditivada com benzoato

de sódio. As silagens controle e aditivada com *Lactobacillus buchneri* foram semelhantes, diferindo apenas do tratamento com benzoato de sódio.

Tabela 10 - Temperatura de silagens de milho sob diferentes estratégias de vedação ao longo do período de exposição aeróbia

Variável ¹	Lonas ²			Aditivos ²			
	PE	PA	EPM ³	C	BS	LB	EPM ³
Tmax, °C	36,32 ^a	31,15 ^b	1,50	35,00 ^{ab}	28,52 ^b	37,69 ^a	1,86
TTmax, horas	133,12 ^b	155,11 ^a	9,22	134,01 ^b	208,67 ^a	89,67 ^c	11,68
T média, °C	23,86 ^a	21,22 ^b	0,45	22,97 ^a	20,87 ^b	23,77 ^a	0,56
TmaxA, °C	18,72 ^a	12,31 ^b	1,12	17,98 ^a	9,09 ^b	19,48 ^a	1,36
Tquebra, horas	79,67 ^b	131,56 ^a	8,12	95,67 ^b	158,67 ^a	62,50 ^b	10,79
ST 0-120, °C	122,79 ^a	40,39 ^b	10,95	83,22 ^b	9,25 ^c	152,29 ^a	13,16
ST 0-240, °C	308,04 ^a	164,19 ^b	23,65	246,34 ^a	142,05 ^b	319,95 ^a	31,44

¹Tmax: temperatura máxima alcançada; TTmax: tempo para alcançar a temperatura máxima; T média: temperatura média; TmaxA: temperatura máxima da silagem descontando-se a temperatura ambiente; Tquebra: tempo necessário para a temperatura da silagem atingir 2°C acima da temperatura ambiente; ST: somatório de temperatura da silagem acima da temperatura ambiente ao longo de 120 ou 240 horas de estabilidade aeróbia; ²PE: lona de polietileno dupla face (200 µm); PA: lona coextruzada de polietileno e poliamida dupla face (125 µm); C: controle; BS: benzoato de sódio; LB: *Lactobacillus buchneri*; ³EPM: erro padrão da média.

O tempo para quebra de estabilidade aeróbia foi maior ($P < 0,001$) para a silagem tratada com benzoato de sódio com relação as silagens controle e aditivada com *Lactobacillus buchneri*.

Durante as primeiras 120 horas, o maior acúmulo de temperatura foi verificado para a silagem aditivada *Lactobacillus buchneri*, seguida da silagem controle e apresentando o menor acúmulo a silagem tratada com benzoato de sódio. Em relação ao acúmulo de 240 horas, as silagens controle e aditivada com *Lactobacillus buchneri* apresentaram os maiores valores e novamente a silagem aditivada com benzoato de sódio apresentou os menores valores.

Na Figura 10 são apresentados os valores de pH em função do tipo de filme utilizado e em função do período de exposição ao ar das silagens.

Figura 10 - Valores de pH da região periférica do silo de silagens de milho em função do tipo de lona utilizada. Letras minúsculas comparam médias entre os tempos de exposição aeróbia

Não houve diferença ($P > 0,05$) entre o tipo de filme utilizado, porém a medida que se prolongou o tempo de exposição aeróbia, houve aumento nos valores de pH das silagens ($P < 0,05$). Em relação ao uso de aditivos, os valores de pH apresentaram diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos e ao longo do período de exposição aeróbia das silagens. No tempo zero os valores foram semelhantes entre os tratamentos, entretanto, a partir da 120^a hora até a 240^a a silagem controle e a aditivada *Lactobacillus buchneri* apresentaram valores superiores ($P < 0,05$) aos da silagem tratada com benzoato de sódio.

Figura 11 - Valores de pH da região periférica do silo de silagens de milho em função do tipo de tipo de aditivo utilizado. Letras minúsculas comparam médias entres os tempos de exposição aeróbia e letras maiúsculas comparam médias no mesmo tempo para tipo de aditivo utilizado

3.4 Discussão

3.4.1 Características da forragem no momento da ensilagem

A recomendação do ponto ideal de colheita das plantas de milho para ensilagem aponta para o estágio compreendido entre 32 e 35% de matéria seca (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991), valor que se enquadra aos obtidos no presente estudo.

O valor de fibra insolúvel em detergente neutro foi de 46,37%, o que condiz com o encontrado por Filya (2004), onde em plantas de milho com 35,8% de matéria seca, este autor observou teor de FDN de 48,4%.

Bal, Coors e Shaver (1997) observaram teor médio de 7,1% de proteína bruta quando a planta atingiu 2/3 da linha do leite. O teor de proteína bruta observada no presente experimento esta coerente com os autores, onde verificou-se valor médio de 6,22%.

Russell et al. (1992) observaram variações na DVIVMS da planta em híbridos de milho colhidos entre 34,8 e 51,4% de MS. Para estes materiais, a DVIVMS ficou entre 71,9 e 73,1%. Estes valores são próximos aos encontrados no presente estudo, de 73,17 a 74,84%.

3.4.2 Temperatura da silagem durante o armazenamento

O tipo de filme plástico utilizado influenciou a temperatura das silagens, sendo também representativa ao longo do período fermentativo, onde no momento da abertura dos silos o filme plástico coextruzado de polietileno com poliamida apresentou 3,3 °C a menos do que o filme de polietileno. Considerando-se a temperatura média entre os filmes plásticos, o de polietileno apresentou 1,81 °C superiores ao filme coextruzado de polietileno com poliamida. Provavelmente, os menores valores de temperatura verificados para o filme coextruzado de polietileno com poliamida estão relacionados com a baixa permeabilidade ao oxigênio apresentada por este filme plástico, o qual reduz as taxas de trocas gasosas do silo com o ambiente externo, tornando o local vedado com menor probabilidade de crescimento microbiano aeróbio.

Bernardes; Amaral e Nussio (2009) mostraram taxas de permeabilidade ao oxigênio diferentes entre filmes plásticos produzidos com diferentes polímeros. Os autores verificaram que o filme coextruzado de polietileno com poliamida apresentou valor de 75 cm³ de O₂/m²/dia contra 722 cm³ de O₂/m²/dia para o filme de polietileno. Bernardes et al. (2009) observaram menores perdas de matéria seca, menor contagem de leveduras e menor valor de pH para silagem de milho vedada com o filme coextruzado de polietileno com poliamida.

A diminuição da temperatura das silagens ao longo do período de fermentação, tanto em função dos filmes plásticos como em função dos aditivos (Figuras 6 e 7), representa a queda na temperatura ao longo do ano, coincidindo com o final do outono e início do inverno. Vale ressaltar que as temperaturas máximas observadas ocorreram no início do processo fermentativo, e o motivo para esta ocorrência pode estar relacionado a dois fatores, o primeiro se referindo à temperatura ambiental estar mais elevada, em função da época do ano e/ou a intensa respiração da planta e atividade microbiana verificada na fase inicial de conservação da forragem (McDONALD; HANDERSON; HERON, 1991).

Com relação ao uso de aditivos pode-se verificar que seu uso, tanto benzoato de sódio como *Lactobacillus buchneri*, reduziu a temperatura máxima das silagens, bem como o tempo para o alcance dessa temperatura. Apesar da redução na temperatura máxima com o uso dos aditivos, era também esperada redução nos valores de

temperatura média das silagens. Os aditivos utilizados no presente estudo são classificados como inibidores parciais ou totais da deterioração aeróbia (KUNG; STOKES; LIN, 2003), o que dessa forma era esperado controle do aquecimento das silagens.

3.4.3 Características fermentativas e microbiológicas das silagens

Apesar da menor temperatura encontrada para o filme coextruzado de polietileno com poliamida e apoiada pela literatura de menor permeabilidade ao oxigênio para este filme plástico, não houve diferença estatística na contagem de fungos filamentosos (Tabela 5). Entretanto, essa silagem apresentou maiores valores de ácido láctico (3,70%), comparativamente a silagem vedada com filme de polietileno (2,79%).

Segundo Pahlow et al. (2003), não somente os fungos filamentosos, mas também as leveduras e algumas espécies de bactérias promovem a assimilação aeróbia de lactato da silagem, reduzindo o seu potencial de conservação, o que pode ser observado na silagem vedada com filme de polietileno, a qual apresentou menor valor de ácido láctico.

As variáveis perdas de matéria seca, pH, ácido acético, ácido butírico e fungos filamentosos (Tabela 5) não apresentaram diferença estatística entre os filmes plásticos estudados, o que não era esperado, visto que com a maior temperatura verificada para a silagem vedada com o filme de polietileno, esperava-se maior atividade microbiana aeróbia, resultando em silagens com maiores perdas de matéria seca, maiores valores de pH, ácido acético e ácido butírico. Apesar de contrariar as expectativas do presente experimento, o valor médio de perdas de matéria seca (8,42%), mostrou-se abaixo dos valores reportados por Ashbell e Liskes (1988), onde em silagem de milho verificaram 10,2% de perdas de matéria seca na região superior do silo.

Segundo McDonald, Henderson e Heron (1991), a elevação da temperatura na silagem é bom indicador de eventuais fenômenos de deterioração aeróbia e da atividade de oxidação por parte das leveduras e fungos filamentosos.

As menores temperaturas verificadas nas silagens que tiveram adição de aditivo químico ou microbiano se relacionaram positivamente com as características fermentativas dessas silagens. Com o uso dos aditivos (químico ou microbiano) os

valores de perdas de matéria seca foram reduzidos 1,97% em relação à silagem na aditivada. Apesar de não haver diferença estatística para contagem de fungos filamentosos, provavelmente ocorreu inibição de outros microrganismos deterioradores, visto que houve maiores concentrações de ácido láctico nas silagens aditivadas, gerando menores valores de pH e refletindo também em menores concentrações de ácido butírico.

A concentração de ácido acético não apresentou diferença entre os tipos de aditivos utilizados, fato este que contraria as expectativas do presente experimento principalmente referenciando-se ao uso de *Lactobacillus buchneri*. Driehuis; Oude elferink e Spoelstra (1999) verificaram que a presença de *Lactobacillus buchneri* em silagens de milho reduziu a concentração de ácido láctico, enquanto houve aumento na concentração de ácido acético. Com relação a este tratamento era esperada maior concentração de ácido acético, bem como redução no teor de ácido láctico, visto que segundo Oude Elferink et al. (2001), o *L. buchneri* consegue degradar o ácido láctico transformando-o em ácido acético, 1,2 propanodiol e traços de etanol. Provavelmente a explicação para esta ocorrência, pode estar relacionada com maiores teores de oxigênio na região superior do silo, o que segundo os autores citados acima, afirmam a necessidade de condições anaeróbias para a ocorrência dessa rota metabólica.

A presença de aflatoxinas nas silagens não foi expressiva, ocorrendo em apenas 16,67% das amostras de silagens. Entretanto, a ocorrência dessas micotoxinas foi observada apenas na silagem sem aditivo e vedada com lona de polietileno. Além da baixa representatividade, a concentração média para a soma das aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) foi de 13,02 ppb, observando concentração máxima 21,68 ppb. Segundo MAPA (1988), os alimentos destinados a alimentação animal não devem ultrapassar valor de 50 ppb de aflatoxinas.

Provavelmente, a baixa ocorrência e baixo valor da toxina podem estar relacionados com o tipo de híbrido utilizado, o híbrido Bt, o qual pode ter preservado a integridade da planta por menor quantidade de ataques de insetos e com conseqüente redução na população de fungos, principalmente do gênero *Fusarium* (HAMMOND et al., 2004), o que posteriormente impediu o aumento da competição entre gêneros de

fungos e, conseqüentemente a produção de aflatoxinas por fungos do gênero *Aspegillus*.

3.4.4 Valor nutritivo das silagens na abertura dos silos

As variáveis referentes ao valor nutritivo das silagens estão dentro dos valores observados na literatura para silagens de milho vedadas com diferentes filmes plásticos (BERNARDES et al., 2009; BASSO et al., 2009). Entretanto, no presente experimento não era esperada reduções nos teores de fibra insolúvel em detergente neutro e ácido com relação à forragem no momento da ensilagem (Tabelas 1 e 8). Provavelmente, o erro ocorreu em função das amostras não serem analisadas no mesmo momento. Esperava-se elevação na concentração desses nutrientes nas silagens, visto que o processo de fermentativo é detentor de perdas fermentativas, onde os componentes solúveis da planta são consumidos para geração de ácidos e nas rotas metabólicas ocorre perda de gases para o ambiente externo (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Dessa forma, a porção fibrosa da silagem deveria ser aumentada em relação a forragem de origem, pelo simples fato da proporcionalidade dos nutrientes.

Entre os filmes plásticos utilizados, a detecção de diferença estatística apenas foi verificada para o teor de carboidratos solúveis (Tabela 8), tendo a silagem vedada com lona coextruzada de polietileno com poliamida superioridade de 0,71 unidades percentuais com relação à silagem vedada com filme de polietileno. Esta maior concentração de carboidratos solúveis se relaciona positivamente com o maior teor de ácido láctico verificado para a mesma silagem. Possivelmente, a maior presença do ácido permitiu término da fermentação antecipado frente a silagem vedada com filme de polietileno, e assim, auxiliou na maior recuperação desse nutriente.

Com relação ao uso de aditivos, as variáveis referentes ao valor nutritivo apresentaram maiores inter-relações (Tabela 8). O teor de matéria seca apresentou menor valor para a silagem controle frente às aditivadas, o que provavelmente pode estar relacionadas com as maiores perdas verificadas nesse tratamento (Tabela 5).

O maior teor de proteína bruta observado na silagem não tratada com aditivo pode estar relacionado com dois fatores, redução de carboidratos solúveis e aumento

na concentração e/ou contaminação fúngica, a qual pode elevar o teor de proteína da silagem (AMARAL et al., 2009a).

Com relação aos teores de carboidratos solúveis, a maior concentração foi verificada para a silagem tratada com benzoato de sódio, passando para a silagem controle e o menor valor observado para silagem tratada com *Lactobacillus buchneri*. Não era esperada a drástica redução no valor de carboidratos solúveis na silagem tratada com *Lactobacillus buchneri*, principalmente em função de esta ter apresentado o maior valor de ácido láctico, porém apesar da elevada concentração de ácido láctico frente às demais silagens, a fermentação heterolática pode ter prevalecido o que gerou o maior consumo dos carboidratos solúveis, mesmo não havendo diferença estatística para a concentração de ácido acético das silagens.

A digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca das silagens acompanhou os valores de carboidratos solúveis, entretanto, a silagem controle apresentou valor intermediário entre as demais silagens.

3.4.5 Estabilidade aeróbia das silagens

As variáveis estudadas no período de pós abertura para as silagens vedadas com os diferentes filmes plásticos mostraram superioridade para a silagem vedada com o filme coextruzado de polietileno com poliamida. Na Figura 8 pode ser observada a evolução das temperaturas das silagens, onde as temperaturas observadas para a silagem vedada com filme de polietileno apresentam maiores valores ao longo do tempo de exposição aeróbia.

Na Tabela 10 pode ser verificado que a silagem vedada com o filme de polietileno também apresentou maior temperatura máxima (36,32 °C vs. 31,15 °C), maior temperatura média (23,86 °C vs. 21,22 °C), maior temperatura da silagem descontada a temperatura ambiente (18,72 °C vs. 12,31 °C) e maior acúmulo de temperatura durante 120 e 240 horas. Por outro lado, a silagem vedada com o filme coextruzado de polietileno com poliamida apresentou maior tempo para o alcance da temperatura máxima, bem como maior tempo para quebra de estabilidade.

Segundo Kung, Stokes e Lin (2003), o perfil de fermentação desejável nem sempre evita as perdas após a abertura dos silos, sendo que em alguns casos pode

aumentá-las. Silagens caracterizadas por alta concentração e a predominância de ácido láctico, bem como presença de açúcares remanescentes, são mais afetadas pela deterioração aeróbia (WEINBERG; MUCK, 1996). Entretanto, o cenário verificado para o presente experimento não foi condizente com a literatura mencionada, possivelmente por a silagem estudada estar presente em região do silo que geralmente não representa a maioria das silagens estudadas. Porém, outra possibilidade pode estar relacionada com o fato da silagem vedada com filme de polietileno ter sido possuidora de maiores contaminações microbiana, como por exemplo, presença de leveduras, as quais iniciaram mais rapidamente o processo de deterioração aeróbia.

Os valores de pH não diferiram entre os tipos de filme plástico utilizados, porém houve aumento nos valores com o decorrer do tempo de exposição aeróbia (Figura 10). Este comportamento, possivelmente está relacionado com o consumo dos ácidos orgânicos produzidos durante o período fermentativo, principalmente o ácido láctico, sendo reportados em trabalhos encontrados na literatura, como o de Amaral et al. (2009b).

A evolução dos valores de temperatura das silagens em função do uso de aditivos (Figura 9) mostrou que a silagem tratada com *Lactobacillus buchneri* alcançou pico termal em tempo inferior as demais silagens, sendo que a silagem não aditivada apresentou seu pico em momento posterior. A silagem tratada com benzoato de sódio apresentou evolução da temperatura em menor intensidade, não visualizando no gráfico, picos proeminentes como os verificados para a silagem tratada com o aditivo microbiano, bem como a silagem controle.

Os valores de temperatura máxima alcançada, temperatura média e temperatura máxima descontando-se a temperatura ambiente apresentaram comportamentos semelhantes, apresentando os menores valores nas silagens tratadas com benzoato de sódio (Tabela 10). Quando se refere ao tempo para atingir a máxima temperatura e para a quebra de estabilidade aeróbia, a silagem tratada com benzoato de sódio foi a mais estável comparativamente as demais silagens.

Não era esperada para a silagem tratada com *Lactobacillus buchneri* sua baixa estabilidade aeróbia, visto que esta bactéria por ter sua rota metabólica heterolática tem capacidade de produzir ácido acético durante a fermentação e durante o pós abertura

ser efetiva no controle de leveduras e fungos filamentosos (PAHLOW et al., 2003). Por outro lado, o aumento da temperatura mais acelerada nesse tratamento pode estar relacionada a mesma argumentação dirigida à redução dos carboidratos solúveis. Outros microrganismos aeróbios poderiam estar presentes na massa de silagem durante o armazenamento, os quais consumiram em maior intensidade os carboidratos solúveis e, dessa maneira, no momento da abertura dos silos estavam em maior quantidade. Assim, com o aumento da disponibilidade de oxigênio e presença de ácido láctico (Tabela 5), os microrganismos proliferaram-se em maior velocidade, gerando maior quantidade de calor. As baixas temperaturas observadas para a silagem tratada com benzoato de sódio podem estar relacionadas com a presença do ácido fraco inserido no momento da ensilagem, o qual auxiliou para que os microrganismos aeróbios se desenvolvessem em menor intensidade frente aos demais tratamentos, mesmo tendo a concentração de ácido láctico elevada e sendo substrato para consumo de leveduras (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1981).

Os valores de pH se elevaram ao longo do período de exposição aeróbia, bem como apresentaram diferença estatística entre os tipos de aditivos. Após 120 e 240 horas de exposição das silagens ao oxigênio, os valores de pH para a silagem tratada com benzoato de sódio foram inferiores aos demais tratamentos.

A elevação do pH das silagens ocorreu possivelmente pelo consumo de ácido láctico presente nas silagens por microrganismos deterioradores, principalmente leveduras. Possivelmente os menores valores de pH observados para a silagem tratada com benzoato de sódio podem estar relacionados com a menor intensidade de deterioração da silagem, em função do ácido fraco deste produto atuar sobre o crescimento desses microrganismos, o que condiz com a evolução da temperatura dessa silagem.

Os fungos, as leveduras e algumas espécies de bactérias promovem a assimilação aeróbia de ácido láctico da silagem, o qual é degradado em dióxido de carbono e água, resultando em excessiva produção de calor e perdas de nutrientes (PAHLOW et al., 2003). Além disso, McDonald, Henderson e Heron (1991) descreveram que a degradação desse ácido se torna benéfica para a elevação do pH

da silagem, permitindo o crescimento de microrganismos oportunistas como bactérias e mofo.

3.5 Conclusões

O uso do filme coextrudado de polietileno com poliamida e o uso de *Lactobacillus buchneri* ou benzoato de sódio durante o período fermentativo diminuíram o risco de deterioração das silagens na área periférica dos silos.

As silagens tratadas com benzoato de sódio e vedadas com o filme coextrudado de polietileno com poliamida apresentaram maior estabilidade aeróbia.

Referências

- AMARAL, R.C.; PIRES, A.V.; SUSIN, I.; NUSSIO, L.G.; MENDES, C.Q.; GASTALDELLO JR, A. Cana-de-açúcar ensilada com ou sem aditivos químicos: fermentação e composição química. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Brasília, v. 38, n. 8, p. 1413-1421, 2009a.
- AMARAL, R.C.; PIRES, A.V.; SUSIN, I.; NUSSIO, L.G.; FERREIRA, E.M.; GENTIL, R.S. Cana-de-açúcar *in natura* ou ensilada com e sem aditivos químicos: estabilidade aeróbia dos volumosos e das rações. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Brasília, v. 38, n. 10, p. 1857-1864, 2009b.
- ASHBELL, G.; LISKER, N. Aerobic deterioration in maize silage stored in a bunker silo under farm conditions in a subtropical climate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 45, p. 307-315, 1988.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington, 1990. v. 1, 1117 p.
- BAL, M.A.; COORS, J.G.; SHAVER, R.D. Impact of maturity of corn for use as silage in the diets of dairy cows on intake, digestion and milk production. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.80, n.10, p.2497-2503, 1997.
- BASSO, F.C.; BERNARDES T.F.; CASAGRANDE, D.R.; LODO, B.N.; ROTH, A.P.T.P.; REIS, R. A. Aerobic deterioration in corn silage sealed with oxygen barrier film under farm conditions. In: BRODERICK G.A., ADESOGAN A.T., BOCHER L.W., BOLSEN K. K.; CONTRERAS-GOVEA F.E., HARRISON J.H.; MUCK R.E. (Ed.). INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 15., 2009, Madison. **Proceedings...** Madison, 2009. p. 211-212.

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

Proceedings... Madison, 2009. p. 213-214.

BERNARDES, T.F.; AMARAL, R.C.; NUSSIO, L.G. Sealing strategies to control the top losses in horizontal silos. In: ZOPOLLATO, M.; MURARO, G.B; NUSSIO, L.G. (Ed.). INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2009, São Pedro. **Proceedings...** São Pedro, 2009. p. 209-224.

DEGANO, L. Improvement of silage quality by innovative covering system. In: THE INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 12, 1999, Uppsala. **Proceedings...** Uppsala, 1999. p. 296-297.

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

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

FILYA, I. Nutritive value and aerobic stability of whole crop maize silage harvested at four stages of maturity. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.116, p.141-150, 2004.

HAMMOND, B.G.; CAMPBELL, K.W.; PILCHER, C.D.; DEGOOVER, T.A.; ROBINSON, A.E.; McMILLEN, B.L.; SPANGLER, S.M.; RIORDAN, S.G.; RICE, L.G.; RICHARD, J.L. Lower fumosin mycotoxin levels in the grain of Bt corn grow in the United States in 2000-2002. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 52, p. 1390-1397, 2004.

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.

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**, Champaign, v. 88, p. 2130-2139, 2005.

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

LAMMERS, B.P.; BUCKMASTER, D.R.; HEINRICHS, E.J. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 5, p. 922-928, 1996.

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

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

MARI, L.J.; NSSIO, L.G. **O método Penn State Particle Size Separator para a predição do tamanho de partículas de silagens**. 2002. Disponível em: <<http://www.beefpoit.com.br/bn/radarestecnicos>>. Acesso em: 03 jul. 2011.

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

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Portaria MA/SNAD/SFA No. 07, de 09/11/88 - publicada no Diário Oficial da União de 09 de novembro de 1988 - Seção I, página 21.968, 1988**. Disponível em: < <http://www.micotoxinas.com.br/legisla.html>>. Acesso em: 04 ago. 2011.

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

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

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

RUSSELL, J.R.; IRLBECK, N.A.; HALLAUER, A.R.; BUXTON, D.R. Nutritive value and ensiling characteristics of maize herbage as influenced by agronomic factors. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.38, p.11-24, 1992.

SOARES, L.M.V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxin, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian food by using multitoxin thin-layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 72, p. 22-36, 1989.

STATISTICAL ANALYSIS SYTEM. **SAS User's guide:** statistics. version 9.1.3. Cary, 2003. 965 p.

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

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

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

WOOLFORD, M.K. Microbiological screening of the straight chain fatty acids (C1-C12) as potential silage additive. **Journal of Science and Food Agricultural**, London, v.26, p. 219-228, 1975.

4 ESTRATÉGIAS DE PROTEÇÃO DO FILME PLÁSTICO UTILIZADO NO PROCESSO DE VEDAÇÃO DO SILO

Resumo

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar estratégias de vedação, com base na proteção do filme plástico, visando o controle da deterioração aeróbia nas zonas periféricas do silo e o comportamento dessas silagens durante o período de aerobiose. Os experimentos foram desenvolvidos em delineamento inteiramente casualizado, compondo 3 tratamentos, com cinco repetições. Como tratamentos foram utilizadas estratégias de proteção do filme plástico de polietileno preto, com espessura de 200 μm , o uso de bagaço de cana-de-açúcar ou terra. No final do período fermentativo verificou-se distanciamento entre os valores de temperatura das silagens vedadas com proteção de bagaço ou terra em relação à silagem que estava sem proteção sobre a lona. No momento da abertura dos silos a diferença de temperatura entre essa comparação foi de 3 $^{\circ}\text{C}$. Não houve diferença para as perdas de matéria seca entre os tratamentos, apresentando média geral de 7,2%. Do mesmo modo, os valores de pH, ácido acético e ácido butírico não diferiram entre os tipos de cobertura sobre a lona. No momento da abertura dos silos a contagem de leveduras foi maior para a silagem que não teve proteção sobre o filme plástico. A contagem de fungos filamentosos não apresentou diferença entre os tratamentos, apresentado valor médio de 4,43 ufc/ g de forragem. Após a abertura dos silos, por período de 240 horas foi verificado diferença no acúmulo de temperatura das silagens. A silagem sem proteção sobre a lona apresentou o maior acúmulo, sendo o menor valor verificado para a silagem com proteção de terra sobre a lona. Os valores de carboidratos solúveis foi maior para a silagem com proteção de terra sobre a lona (6,24), seguida da silagem com proteção de bagaço (4,24) e por final, o menor valor foi observado para a silagem controle (2,41). A digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca apresentou diferença, sendo que as silagens que receberam proteção sobre a lona apresentaram os maiores valores em relação a silagem sem proteção sobre o filme plástico. Durante o ensaio de estabilidade aeróbia foram verificados valores de picos com 24, 60 e 104 horas após a exposição das silagens, para as silagens controle, com proteção de bagaço e proteção de terra sobre a lona, respectivamente. O uso de bagaço de cana-de-açúcar ou terra como estratégia de proteção do filme plástico foi efetivo em controlar o aquecimento da silagem e retardar o início da deterioração aeróbia na camada superior do silo.

Palavras-chave: Controle de perdas; Deterioração aeróbia; Fungos; Temperatura

Abstract

The experiment was designed to study the effectiveness of covering methods to reduce the top losses in maize silages. The experiment comprised a completely randomized design, composed by three treatments with five replications: black polyethylene (PE) film 200 μm thick, black PE plus sugarcane bagasse over the film, and black PE plus soil over the film. At the end of fermentative period, the control silage temperature showed higher values in relation the protected silages. When the silos were opened, the difference between control and protected silage was 3 $^{\circ}\text{C}$. The dry matter losses was similar among treatments, with an average of 7.2%. Similarly, the pH values, acid acetic and acid butyric did not differ among covering methods adopted. The yeast count was higher for control silage. The molds count was not different between treatments, with average of 4.43 cfu/ g of forage. After 240 hours the silos opening was observed difference in the temperature sum of the silage. Silage without protection had the highest accumulation, the lowest value was observed for treatment protected by soil. The water soluble carbohydrates value was higher for treatment with soil protection (6.24), followed by sugarcane bagasse protection (4.24), and the lowest value for the control treatment (2.41). The dry matter digestibility showed higher values for the protected silos in relation to unprotected treatment. During the aerobic stability were observed temperatures peaks of 24, 60 and 104 hours for the control silage, protected with sugarcane bagasse and, protected with soil, respectively. The use sugarcane bagasse or soil as strategies to cover silos was effective in controlling the silage heating and delay yhe onset of aerobic deterioration in the silo upper layer.

Keywords: Aerobic deterioration; Losses control; Molds; Temperature

4.1 Introdução

A conservação da forragem na forma de silagem é caracterizada pela fermentação láctica espontânea que ocorre em ambiente anaeróbio, sendo que, os principais agentes fermentadores são bactérias lácticas que metabolizam os açúcares e produzem o ácido láctico. Desse modo, a manutenção da anaerobiose e a queda do pH constituem os fatores que são responsáveis pela preservação da forragem armazenada (PAHLOW et al., 2003), pois os microrganismos capazes de deteriorar a silagem são inibidos pelo efeito sinérgico dos ácidos produzidos durante a fermentação, pela pressão osmótica elevada e pela ausência de oxigênio (WOOLFORD, 1990).

Quanto aos fatores ligados à acidificação da massa, estes são obtidos quando ocorre predominantemente fermentação homoláctica (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; SPOELSTRA, 1999) e podem ser alcançados com facilidade, por exemplo, na cultura do milho, devido às suas características desejáveis relacionadas a capacidade de fermentação (alta concentração de carboidratos solúveis, baixo poder tamponante e umidade reduzida) (ALLEN; COORS; ROTH, 2003).

Entretanto, ocorrem processos de oxidação de nutrientes pelos microrganismos aeróbios, com conseqüente deterioração da silagem. A impossibilidade de mensurar as perdas totais por manejo inadequado que ocorre nas propriedades rurais e a dificuldade de as determinarem quantitativa e qualitativamente por meio de trabalhos experimentais, resultam em falta do estímulo à percepção e à divulgação de resultados para a economia de produção. Dificilmente os produtores acreditam em perdas elevadas pelo problema de oxidação da massa, pois só consideram aquelas que são visíveis (com presença de fungos), o que subestima as reais perdas envolvidas na ensilagem.

Falhas na vedação podem comprometer seriamente a eficiência na conservação de forragens devido ao ingresso de ar na massa, o que se traduz em aumento da temperatura, das perdas pela presença de fungos e possível contaminação de produtos de origem animal (exemplo: leite) com microrganismos indesejáveis (BORREANI; TABACCO, 2008).

Além da importância da qualidade do filme plástico utilizado na vedação do silo, a proteção dessa cobertura pode trazer benefícios, diminuindo a incidência de raios

solares e as trocas gasosas com o ambiente. Ainda, o emprego de materiais na parte superior do silo provoca adesão entre a lona e a massa ensilada, o que dificulta o caminho do oxigênio na massa.

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar estratégias de vedação, com base na proteção do filme plástico, visando o controle da deterioração aeróbia nas zonas periféricas do silo e o comportamento dessas silagens durante o período de aerobiose.

4.2 Materias e Métodos

4.2.1 Ensilagem e tratamentos

O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP/ESALQ). O híbrido de milho utilizado foi o Pioneer 30F90 *Bt* e quando o mesmo atingiu média de 30% de matéria seca, procedeu-se a ensilagem (Tabela 11) no dia 23/03/2009. As plantas foram colhidas mecanicamente com colhedora de forragem marca Mentamint[®], tracionada por trator, regulada para corte com tamanho médio de partículas entre 5 a 10 mm.

Foram utilizadas duas estratégias de proteção do filme plástico de polietileno preto, com espessura de 200 μm , o uso de bagaço de cana-de-açúcar ou terra, compondo experimento com 3 tratamentos (Figura 12):

- Silagem de milho vedada com filme plástico de polietileno preto, com espessura de 200 μm , sem cobertura;
- Silagem de milho vedada com filme plástico de polietileno preto, com espessura de 200 μm , com cobertura por terra (30 kg/m^2);
- Silagem de milho vedada com filme plástico de polietileno preto, com espessura de 200 μm , com cobertura por bagaço de cana (10 kg/m^2);

Adotou-se como topo do silo, a região periférica compreendida pelos 25 cm restantes para a vedação dos silos.

Como silos experimentais (unidades experimentais) foram utilizadas caixas d'água de fibrocimento (500 L), com superfície superior de 1,045 m^2 . Durante a

ensilagem, os silos foram abastecidos em camadas de 15 – 25 cm e compactados por pisoteio humano até atingir densidade de 650 kg/m^3 . Após o abastecimento, os silos foram vedados com o uso de fitas adesivas e de borracha (Figura 12), permanecendo expostos ao ambiente durante 95 dias, momento em que ocorreu a abertura dos mesmos.

Figura 12 - Estratégias de proteção do filme plástico utilizadas: A) Controle; B) Bagaço de cana e C) Terra

4.2.2 Amostragens e variáveis analisadas na forragem fresca

Durante a ensilagem, a forragem foi amostrada e fragmentada em quatro sub-amostras. A primeira sub-amostra foi pesada e levada à estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas. Após este período foram pesadas novamente, moídas até as partículas atingirem menos de um milímetro e armazenadas em recipientes de plástico. A partir das amostras secas e moídas foram determinadas as concentrações de matéria seca (MS) e de matéria mineral (MM), conforme AOAC (1990).

As concentrações de fibra em detergente neutro (FDN) foi realizada com base no método proposto pela ANKOM® Fiber Analyser (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY) e descrito por Holden (1999), assim como a digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca (DVIVMS). Para determinação da FDN foi utilizado amilase e sulfato de sódio.

A segunda sub-amostra foi utilizada na avaliação do tamanho de partículas das silagens com base na estratificação das partículas por meio do método "Penn State Particle Size" (LAMMERS; BUCKMASTER; HEINRICHS, 1996). Entretanto, foi incorporada uma adaptação ao método original realizada por Mari e Nussio (2002) com a inserção de uma peneira adicional com orifícios de diâmetro de 38 mm. Dessa forma, foi obtido o material retido com diâmetro superior a 38 mm, entre 38 e 19 mm, entre 19 e 7,80 mm e inferior a 7,80 mm. O tamanho médio de partículas foi estimado por meio da ponderação da proporção de retenção do material em cada uma das peneiras.

A terceira sub-amostra foi utilizada para o preparo do extrato aquoso, onde uma alíquota de 30 g de amostra diluída em 270 g de água deionizada foram pesadas em sacos plásticos e homogeneizadas durante 4 minutos mediante aparelho Lab-Blender Stomacher 400 (Steward Laboratory, London). Após esse procedimento foram obtidos os valores de pH, por meio de um potenciômetro digital modelo DM 20, marca Digimed®. Em seguida, a solução foi filtrada em papel de filtro Whatman® 54 e o extrato obtido foi utilizado para análises de carboidratos solúveis (CHO's).

A concentração de carboidratos solúveis foi obtida pelo método colorimétrico, segundo a metodologia descrita por Dubois et al. (1956) com leitura em comprimento de onda de 490 nm.

A quarta sub-amostra foi utilizada na contagem da população de leveduras e fungos filamentosos. As amostras frescas da forragem foram pesadas (30 g) em sacos plásticos esterilizados e diluídas em 270 g de solução tampão (Oxoid Ringer's tablets) mais 0,1% de peptona (Difco bacto peptone # 0118-01-8) e homogeneizadas durante 4 minutos mediante aparelho Lab-Blender Stomacher 400 (Steward Laboratory, London). A partir dos extratos diluídos e filtrados foram realizadas as demais diluições (10^{-2} a 10^{-6}) e realizado o plaqueamento em placas de Petri contendo o meio de cultura YGC agar (Fluka). A determinação da população de leveduras e fungos filamentosos foi realizada após incubação de 2 e 5 dias, respectivamente, a 25°C. Os números de microrganismos presentes foram contados como unidade formadora de colônia (ufc) e expressos como logaritmo na base 10.

4.2.3 Perdas de matéria seca durante o armazenamento

Durante o enchimento dos silos experimentais, foi colocado um saco de nylon por unidade experimental, contendo cerca de 3 kg de forragem, localizado na zona periférica do silo (25 cm), para determinação das perdas fermentativas, de acordo com a equação 1:

$$PMS = 100 - \left(\frac{MFf \times MSf}{MFi \times MSi} \times 100 \right) \quad (1)$$

Onde:

PMS = perdas de matéria seca (%); MFi = massa de forragem inicial (kg); MSi = concentração de matéria seca inicial (%); MFf = massa de forragem final (kg); MSf = concentração de matéria seca final (%).

4.2.4 Perfil de temperatura no armazenamento

Como a elevação da temperatura da massa é um importante indicador do fenômeno de deterioração aeróbia, na camada superficial (25 cm) de cada unidade experimental, foram acondicionados sensores de temperatura associados à sistema informatizado e eletrônico de aquisição de dados (Chiplog[®], IMPAC, USA), programados para a tomada de temperatura da massa em intervalos constantes de 4 horas até a respectiva época de abertura. Três sensores de temperatura foram distribuídos aleatoriamente na área experimental e protegidos da radiação solar para obtenção dos valores de temperatura ambiente.

Com o conjunto de dados foi possível obter gráfico das temperaturas das unidades experimentais ao longo de todo o período do ensaio.

4.2.5 Amostragens e variáveis analisadas na silagem

Decorridos 95 dias de armazenamento, os silos foram abertos e os sacos de nylon recuperados e pesados para determinação da PMS das silagens, conforme descrito anteriormente.

A quantidade de silagem contida na camada superficial (Figura 13) foi retirada, homogeneizada e fracionada em quatro porções.

Figura 13 - Visualização da camada superficial das silagens em função dos tratamentos no momento da abertura dos silos

Todas variáveis descritas no item 4.2.2 foram realizadas para as amostras das silagens. Adicionalmente para este grupo de análises foram determinadas as concentrações de alguns ácidos orgânicos (ácido láctico, ácido acético e ácido butírico).

Para análise dos ácidos graxos voláteis (ácido acético e ácido butírico), 800 μL do extrato aquoso da silagem, juntamente com 200 μL de ácido fórmico e 100 μL de padrão interno foram transferidos para um frasco de vidro. A leitura foi realizada em cromatógrafo líquido gasoso, CLG (Hewlett Packard® 5890, series II). A determinação da concentração de ácido láctico foi realizada por meio da adaptação do método espectrofotométrico (565 nm) de Pryce (1969).

4.2.6 Estabilidade aeróbia das silagens

Após a abertura dos silos, aproximadamente 4 kg de silagem foram colocadas sem compactação em baldes de plástico sem tampa, os quais foram mantidos em ambiente protegido, à temperatura ambiente, por um período de 240 horas (10 dias). No centro geométrico dos baldes foram acondicionados sensores de temperatura associados à sistema informatizado e eletrônico de aquisição de dados (Chiplog®, IMPAC, USA), programados para a tomada de temperatura da massa em intervalos constantes de 4 horas.

Com base no conjunto de dados gerados pelos sensores eletrônicos foi possível obter valor entre a diferença da temperatura da unidade experimental com a temperatura ambiente ao longo de todo o período do ensaio. Dessa maneira, foi possível determinar o acúmulo total de temperatura em cada balde. Esta variável foi

obtida por meio da diferença entre a temperatura do volumoso e a do ambiente registrada nos intervalos de tempo determinados e, para fins de comparação entre os tratamentos, foi calculada no período total (1° ao 10° dia).

4.2.7 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância e as suas médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o recurso PROC MIXED do programa SAS (2003).

O delineamento experimental utilizado na avaliação da estabilidade aeróbia foi o inteiramente casualizado, com três repetições, com medidas repetidas no tempo. Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância e as suas médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o recurso PROC MIXED do programa SAS (2003).

4.3 Resultados

Neste item as variáveis estudadas estão descritas com seus valores de significância. As discussões e inter-relações das variáveis estão apresentadas no item 4.4.

4.3.1 Características da forragem no momento da ensilagem

Na Tabela 11 estão apresentadas as variáveis referentes a forragem no momento da ensilagem, sendo apresentado apenas valores para caracterização da forragem, sem comparações estatísticas.

Os teores de matéria seca e matéria mineral apresentaram amplitude valores entre 27,8,48% a 28,4 e 5,87% a 5,97, respectivamente. Os valores de fibra insolúvel em detergente neutro, carboidratos solúveis e digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca apresentaram valores médios de 51,88%, 6,80% e 71,18%, respectivamente.

No momento da ensilagem foi verificada a presença de leveduras e fungos filamentosos, os quais apresentaram contagem média de 3,74 e 3,56 ufc/g forragem.

Os valores de pH e tamanho médio de partícula apresentaram valores médios de 5,90 e 1,37 cm, respectivamente.

Tabela 11 - Características da forragem no momento da ensilagem

Variável ¹	Tratamentos		
	Controle	Bagaço	Terra
MS, %	27,8	28,6	28,4
MM, % MS	5,7	5,6	5,6
FDN, % MS	52,45	51,64	51,54
CHO's, % MS	6,16	7,48	6,75
DVIVMS. %	71,54	70,32	71,68
Leveduras, log10 ufc/ g	3,56	3,76	3,90
FF, log10 ufc /g	3,30	3,90	3,48
pH	5,97	5,87	5,87
TMP, cm	1,37	1,32	1,41

¹MS: matéria seca; MM: matéria mineral; FDN: fibra em detergente neutro; CHO's: carboidratos solúveis; DVIVMS: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca; UFC: unidades formadoras de colônia; FF: fungos filamentosos; TMP: tamanho médio de partículas.

4.3.2 Temperatura da silagem durante o armazenamento

Na Figura 14 está apresentado o comportamento das temperaturas das silagens em relação aos tratamentos e ao longo do período fermentativo das silagens. Não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos, porém foi observado queda ($P<0,001$) nos valores de temperatura com o decorrer do período fermentativo.

No final do período fermentativo (80° dia) verificou-se distanciamento entre os valores de temperatura das silagens vedadas com proteção de bagaço ou terra em relação à silagem que estava sem proteção sobre a lona. No momento da abertura dos silos a diferença de temperatura entre essa comparação foi de 3 °C.

Figura 14 - Temperaturas das silagens de milho na camada superior do silo cobertas sob diferentes estratégias de vedação durante 95 dias de armazenamento. Efeito de tratamento: $P=0,49$; Efeito de dia: $P<0,001$; Interação Tratamento*dia: $P<0,001$

4.3.3 Características fermentativas e microbiológicas das silagens

As características fermentativas, microbiológicas e do pós abertura das silagens no momento da abertura dos silos estão apresentadas na Tabela 12.

Não houve diferença ($P>0,05$) para as perdas de matéria seca entre os tratamentos, apresentando média geral de 7,2%. Do mesmo modo, os valores de pH, ácido acético e ácido butírico não diferiram ($P>0,05$) entre os tipos de cobertura sobre a lona, apresentando valores médios de 3,89, 0,66% e 0,020%, respectivamente.

A concentração de ácido láctico apresentou diferença ($P<0,05$) entre os tratamentos, sendo que as silagens com proteção de terra ou bagaço sobre a lona apresentaram os maiores valores em relação ao tratamento sem proteção.

Com relação aos microrganismos aeróbios (Tabela 12), no momento da abertura dos silos a contagem de leveduras foi maior ($P<0,05$) para a silagem que não teve proteção sobre o filme plástico. A silagem que teve o filme plástico protegido com terra apresentou a menor ($P<0,01$) contagem. O tratamento com cobertura de bagaço apresentou valores intermediários, apresentando valor semelhante aos demais tratamentos. A contagem de fungos filamentosos não apresentou diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos, apresentado valor médio de 4,43 ufc/ g de forragem.

Tabela 12 - Padrão fermentativo, microbiológico e pós abertura das silagens no momento da abertura dos silos

Variável ¹	Tratamentos			EPM ²	Efeito ³
	Controle	Bagaço	Terra		
Perdas MS, % MS	6,66	7,21	7,73	0,53	NS
pH	3,91	3,92	3,84	0,02	NS
Ác. láctico, % MS	1,68 ^b	2,27 ^a	3,33 ^a	0,16	*
C2, % MS	0,72	0,76	0,50	0,09	NS
C4, % MS	0,067	0,071	0,064	0,005	NS
Leveduras, log ₁₀ ufc/ g	4,80 ^a	4,54 ^{ab}	2,44 ^b	0,41	*
FF, log ₁₀ ufc/ g	5,44	4,35	3,50	0,47	NS
ST 0-240, °C	298,9 ^a	269,4 ^{ab}	235,6 ^b	11,7	*

¹MS: matéria seca; C2: ácido acético; C4: ácido butírico; FF: fungos filamentosos; ST: somatório de temperatura da silagem acima da temperatura ambiente ao longo de 240 horas de estabilidade aeróbia;

²EPM: erro padrão da média; ³**P<0,001; *P<0,05; NS: não significativo.

Após a abertura dos silos, por período de 240 horas foi verificado diferença (P<0,05) no acúmulo de temperatura das silagens (Tabela 12). A silagem sem proteção sobre a lona apresentou o maior acúmulo, sendo o menor valor verificado para a silagem com proteção de terra sobre a lona. O tratamento com bagaço apresentou valores intermediários de acúmulo de temperatura.

4.3.4 Valor nutritivo das silagens na abertura dos silos

Os valores de composição bromatológica das silagens estão apresentados na Tabela 13.

Não houve diferença (P>0,05) entre os tratamentos para os valores de matéria seca e matéria mineral, apresentando valores médios de 27,4% e 5,21%, respectivamente.

A concentração de fibra insolúvel em detergente neutro apresentou diferença (P<0,05) entre os tratamentos. A maior concentração observada foi para a silagem controle (54,67%), sendo a menor verificada na silagem com proteção de terra sobre a lona (52,45%). Valor intermediário (53,34%) foi verificado para silagem com proteção de bagaço sobre a lona.

Tabela 13 - Composição bromatológica das silagens no momento da abertura dos silos

Variável ¹	Tratamentos			EPM ²	Efeito ³
	Controle	Bagaço	Terra		
MS, %	27,4	27,5	27,2	0,09	NS
MM, % MS	5,13	5,29	5,23	0,10	NS
FDN, % MS	54,67 ^a	53,34 ^{ab}	52,45 ^b	1,03	*
CHO's, % MS	2,41 ^c	4,24 ^b	6,24 ^a	1,74	*
DVIVMS, %	65,78 ^b	70,76 ^a	70,61 ^a	4,72	*

¹MS: matéria seca; MM: matéria mineral; FDN: fibra em detergente neutro; CHO's: carboidratos solúveis; DVIVMS: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca; ²EPM: erro padrão da média; ³**P<0,001; *P<0,05; NS: não significativo.

Com relação aos valores de carboidratos solúveis, verificou-se maior ($P<0,05$) concentração para a silagem com proteção de terra sobre a lona (6,24), seguida da silagem com proteção de bagaço (4,24) e por final, o menor valor foi observado para a silagem controle (2,41). A digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca apresentou diferença ($P<0,05$), sendo que as silagens que receberam proteção sobre a lona apresentaram os maiores valores em relação a silagem sem proteção sobre o filme plástico.

4.3.5 Estabilidade aeróbia das silagens

Na Figura 15 está apresentado o comportamento temperatura da silagem, descontando-se o valor da temperatura ambiente durante a exposição aeróbia. Na análise estatística não foi detectado diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos, porém os tratamentos mostraram picos termais dos tratamentos em momentos distintos ao longo da exposição aeróbia das silagens. Foram verificados valores de picos com 24, 60 e 104 horas após a exposição aeróbia das silagens, para as silagens controle, com proteção de bagaço e proteção de terra sobre a lona, respectivamente.

Figura 15 - Diferença entre a temperatura da silagem e a temperatura ambiente expostas ao ambiente aeróbio durante 240 horas. Efeito de tratamento: $P=0,48$; Efeito de hora: $P<0,001$; Interação tratamento*hora: $P<0,017$

Ainda em relação aos picos termais, estes podem ser observados para todos os tratamentos em dois momentos ao longo da exposição aeróbia das silagens (Figura 15). Ao longo da exposição aeróbia das silagens a temperatura apresentou menores variações após 140 horas de exposição aeróbia.

4.4 Discussão

4.4.1 Características da forragem no momento da ensilagem

Com relação ao ponto colheita das plantas de milho, o valor obtido no presente experimento está abaixo do recomendado, compreendido entre 32 e 35% de matéria seca (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

O valor de fibra insolúvel em detergente neutro foi de 51,88%. Antoniali et al. (2003) verificaram teores de FDN próximos aos verificados no presente experimento, com variações entre 57,4 e 60,1% para planta de milho colhida quando a linha do leite apresentou entre 1/3 e 2/3 do grão.

Russell et al. (1992) observaram variações na DVIVMS da planta em híbridos de milho colhidos entre 34,8 e 51,4% de MS. Para estes materiais, a DVIVMS ficou entre 71,9 e 73,1%. Apesar do teor de matéria seca não condizer com o presente estudo, os valores de digestibilidade são próximos aos encontrados de 71,18%.

4.4.2 Temperatura da silagem durante o armazenamento

O perfil de temperatura das silagens ao longo do período de armazenamento não demonstrou diferenças entre os tratamentos. Entretanto, o fato da temperatura da silagem que não apresentava cobertura sobre a lona se distanciar em valores das temperaturas das demais silagens a partir do 80º dia de armazenamento e no momento da abertura essa apresentar 3 °C acima dos demais tratamentos chama a atenção para a questão de durabilidade do filme plástico. O aumento da temperatura da silagem controle, possivelmente pode estar relacionado com a maior contagem de microrganismos aeróbios presentes, principalmente a contagem de leveduras (Tabela 12), a qual foi maior para este tratamento. Dessa maneira, com maior atividade metabólica desses microrganismos, ocorreu incremento de temperatura.

Para este fato ter ocorrido apenas nos dias finais do período de armazenamento, o trabalho de Borreani e Tabacco (2008) corrobora na discussão, visto que os autores verificaram aumento na permeabilidade da lona de polietileno ao oxigênio com o aumento do tempo de exposição da lona ao ambiente. Possivelmente, com o passar dos dias, a efetividade contra os raios ultravioletas do filme plástico exposto à radiação foi reduzida, o que permitiu aumento da permeabilidade da lona ao oxigênio, aumentando a atividade de microorganismos aeróbios.

4.4.3 Características fermentativas e microbiológicas das silagens

Os valores de perdas de MS, pH, ácido acético e ácido butírico não apresentaram diferenças entre os tratamentos. Entretanto, a concentração de ácido lático foi maior nos tratamentos que receberam cobertura sobre a lona. A maior produção desse ácido nos tratamentos com proteção de terra e bagaço pode estar relacionada pelo efeito de proteção sobre a lona, a qual reduziu a quantidade de raios solares incidentes, impossibilitando o elevado aquecimento dos filmes plásticos e,

dessa maneira, tornando a permeabilidade da lona ao oxigênio menor, visto que esta é dependente de temperatura (BORREANI; TABACCO, 2008).

Com relação aos microrganismos aeróbios quantificados, apenas a contagem de leveduras apresentou diferença estatística, tendo a população de fungos filamentosos semelhante entre tratamentos. A maior contagem de leveduras na silagem que não teve proteção sobre a lona é coerente com o valor de ácido láctico observado para este tratamento, comparativamente aos demais, mostrando maior deterioração da massa pelo baixo valor de ácido láctico observado e também da maior temperatura observada no momento da abertura dos silos. Segundo Pahlow et al. (2003), leveduras iniciam a deterioração aeróbia da silagem, consumindo parte do ácido láctico existente para seu desenvolvimento e reprodução. Após mudanças ocorrerem em função do desenvolvimento das leveduras, como por exemplo, elevação de pH da silagem, tem-se início ao desenvolvimento da população de fungos filamentosos.

A não constatação de diferença estatística para a contagem de fungos filamentosos, pode estar relacionada ao fato de que a deterioração da silagem controle teve seu início muito próximo a abertura dos silos, o que representou apenas em atividades de leveduras, não havendo oportunidade de elevação do pH para seu desenvolvimento. Portanto, para não detecção de diferenças estatísticas as demais variáveis, como perdas de matéria seca e pH, a possível explicação pode estar relacionado ao pequeno tempo ocorrido do início deterioração (80 ° dia) até a abertura do silo.

4.4.4 Valor nutritivo das silagens na abertura dos silos

Não houve diferença estatística para os valores de MS e cinzas. O conteúdo de carboidratos solúveis foi maior para o tratamento que continha terra para proteção da lona, seguido pela proteção com bagaço e por final, o tratamento controle. Estes valores estão coerentes com os dados observados para a contagem de leveduras e concentração de ácido láctico, os quais também têm reflexo na comparação dos teores de fibra insolúvel em detergente neutro e da digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca. Primeiramente, os tratamentos que continham proteção sobre a lona apresentaram ao longo do período de armazenamento melhores condições para que

ocorresse fermentação homolática, o que foi observado com a constatação de maior teor de ácido láctico nessas silagens. Dessa maneira, provavelmente o abaixamento de pH ocorreu em menor tempo, preservando a concentração de carboidratos solúveis nesse tratamentos, o que refletiu em silagens com menores teores de fibra e com maior digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca.

4.4.5 Estabilidade aeróbia das silagens

A diferença entre a temperatura da silagem e a temperatura ambiente apresentou vários picos durante o período de exposição aeróbia das silagens. Esta ocorrência pode ser associada ao desenvolvimento de diferentes grupos de microrganismos deterioradores, pois segundo Yamashita et al. (1975) apud McDonald, Henderson e Heron (1991) a deterioração da massa de forragem está associada a picos termais, sendo que, com dois a três dias de exposição aeróbia, pode ocorrer o primeiro pico, sendo este atribuído às leveduras, enquanto que de três a quatro dias mais tarde ocorre o segundo pico termal, sendo este atribuído aos fungos filamentosos.

No momento da abertura dos silos o tratamento controle apresentou maior população de microrganismos aeróbios (leveduras), possivelmente em função da maior difusão de oxigênio possibilitada pela lona não protegida. Dessa forma, a maior quantidade de microrganismos deterioradores, no período pós-abertura, permitiu a antecipação do início da deterioração da silagem. Outra possibilidade para explicar o aumento tardio da temperatura nos tratamentos bagaço e terra poderia estar relacionada com a pressão exercida sobre o silo pela cobertura, impedindo o influxo de oxigênio para a massa de silagem e conseqüentemente, retardando a proliferação de microrganismos aeróbios.

O acúmulo de temperatura durante 240 horas de exposição aeróbia (Tabela 12) foi maior para a silagem controle, sendo que o tratamento que recebeu a cobertura com terra apresentou menor somatório. Tanto os dados de leveduras, como os de acúmulo de temperatura seguiram o mesmo comportamento, o que se pode inferir que maior população de microrganismos aeróbios presentes na massa de silagem aceleram o processo de deterioração (LINDGREN; PETTERSSON; KASPERSON, 1985) e

possivelmente na comparação entre os tratamentos a silagem controle apresentou maior acúmulo de temperatura em função da maior população de leveduras.

4.5 Conclusões

O uso de bagaço de cana-de-açúcar ou terra como estratégia de proteção do filme plástico foi efetivo em controlar o aquecimento da silagem e retardar o início da deterioração aeróbia na camada superior do silo.

Referências

ALLEN, M.S.; COORS, J.G.; ROTH, G.W. Corn silage. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America, 2003. p. 547-608.

ANTONIALI, M.; REIS, R.A.; MOREIRA, A.L.; SIMILI, F.F.; MARCELINO, H.A.B. Avaliação de cultivares de milho (*Zea mays* L.) para a produção de silagem: produção de matéria seca e análise morfológica. 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.

BORREANI, G.; TABACCO, E. Low permeability to oxygen of a new barrier film prevents butyric acid bacteria spore formation in farm corn silage. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 91, n. 11, p. 4272-4281, 2008.

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

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

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.

LAMMERS, B.P.; BUCKMASTER, D.R.; HEINRICHS, E.J. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 5, p. 922-928, 1996.

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

MARI, L.J.; NSSIO, L.G. **O método Penn State Particle Size Separator para a predição do tamanho de partículas de silagens**. 2002. Disponível em: <<http://www.beefpoit.com.br/bn/radarestecnicos>>. Acesso em: 03 jul. 2011.

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

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

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

STATISTICAL ANALYSIS SYTEM. **SAS User's guide**: statistics. version 9.1.3. Cary, 2003. 965 p.

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

5 DESEMPENHO E QUALIDADE DO LEITE DE VACAS DE ALTA PRODUÇÃO EM FUNÇÃO DO USO DE SILAGENS DE MILHO CONFECCIONADAS A PARTIR DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE VEDAÇÃO

Resumo

O presente trabalho teve por objetivo avaliar diferentes tipos de filmes plásticos na vedação de silos horizontais e suas interferências relativas a qualidade das silagens, ao desempenho de vacas em lactação e qualidade do leite produzido. Foram utilizados 4 tipos de vedação: filme plástico transparente de poliamida, recoberta por filme plástico de polietileno dupla face, filme plástico de polietileno dupla face, filme plástico de polietileno preto confeccionado a partir de material virgem, filme plástico de polietileno preto confeccionado a partir de material reciclado, recoberto por bagaço de cana. Não houve diferença entre os tratamentos para as variáveis fermentativas. Na região do topo e topo lateral dos silos houve diferença entre os tratamentos para os valores de temperatura das silagens, sendo os maiores observados para as lonas, preta e preta coberta com bagaço. As maiores quantidades de silagem descartada foram para os tratamentos com a lona preta e lona dupla face. As maiores taxas de permeabilidade da lona ao oxigênio foram observadas para os filmes dupla face e preto de material virgem. Não houve diferença para os consumos de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta e fibra insolúvel em detergente neutro, os quais apresentaram valores médios de 21,89; 20,51; 3,61; 8,56 kg/dia, respectivamente. A dieta que continha silagem proveniente do silo vedado com lona preta de material reciclado com proteção de bagaço apresentou o maior valor para a produção de leite, sendo a menor média verificada para o tratamento que continha filme plástico preto de material virgem. Ao longo das semanas de experimentação foi verificada a presença de aflatoxina B1 em todas as silagens. Quando comparado as concentrações de aflatoxina B1 entre a silagem normal e silagem deteriorada, verificou-se que na silagem normal o valor foi inferior (0,93 ppb) ao da silagem deteriorada (1,72 ppb). A partir do mês de agosto foi verificada positividade para aflatoxina M1 entre as amostras de leite. A digestibilidade da matéria seca e da matéria orgânica das dietas apresentou diferença entre os tratamentos. A dieta que continha silagem proveniente do silo vedado com lona preta de material reciclado e proteção de bagaço apresentou o maior valor de digestibilidade, tanto da matéria seca como da matéria orgânica das dietas. O polímero de poliamida e a proteção da lona auxiliaram para redução do descarte de silagens. A proteção sobre a lona com bagaço de cana foi efetiva para o controle de perdas e maximizou o desempenho animal. O filme de coloração preta não é recomendado para vedação de silos, visto suas chances de contaminação da silagem com micotoxinas e a drástica redução na produção de leite dos animais. A permeabilidade da lona ao oxigênio pode ser utilizada como parâmetro para relacionar com a deterioração aeróbia na camada superior do silo.

Palavras-chave: Aflatoxinas; Cobertura da lona; Desempenho animal; Filmes plásticos

Abstract

The objectives of this experiment were to evaluate different plastic sheets to seal horizontal silos and their influence on the silage quality, Holstein dairy cows performance and milk quality. The experiment was composed by four covering types: polyamide plastic film covered with black-on-white polyethylene plastic film, black-on-white polyethylene plastic film, black polyethylene plastic film made from virgin material and, black polyethylene plastic film made from recycled material covered by sugarcane bagasse. There was no difference between treatments for the fermentation profile. The silages temperatures values in the silo top and top side increase in relation to samples in the panel center. The highest values were observed in silages covered with black polyethylene films. The deteriorated discarded silage showed high values in silages covered with Black virgin polyethylene and black-on-white polyethylene films. The same plastics films showed the highest rates of oxygen permeability. There was no difference in dry matter, organic matter, crude protein and neutral detergent fiber intakes, which showed average values of 21.89, 20.51, 3.61, 8.56 kg/day, respectively. The diet containing silage from black recycled polyethylene with bagasse protection showed the highest value for milk production, with the smallest average found in the black virgin polyethylene treatment. Over the experimentation weeks was verified aflatoxin B1 presence in silage. The aflatoxin B1 concentration in normal and spoiled silage was 0.93 ppb and 1.72 ppb, respectively. From the August was found positive aflatoxin M1 in milk samples. The dry matter and organic matter digestibility differ among the treatments. The diet containing silage from black recycled film protect with bagasse treatment showed the highest digestibility of both dry matter and organic matter. The polyamide film and sugarcane bagasse protection over the plastic film reduce the silage discarded. The protection over the plastic films was effective for controlling losses and maximizes the animal performance. The black color film is not recommended for covering silos in relation to risk of aflatoxin contamination and the drastic reduction in milk production. The oxygen permeability of plastic films can be used as a parameter to relate the aerobic deterioration in silo upper layer.

Keywords: Aflatoxins; Animal performance; Cover silos; Plastic films

5.1 Introdução

De modo geral, o armazenamento dos volumosos conservados no Brasil na forma de silagem é realizado em silos horizontais, representados principalmente pelo silo trincheira e o de superfície. Esses silos são atrativos em razão de seu baixo custo de confecção, porém suas conformações determinam grande superfície de exposição da silagem, o que torna as silagens mais susceptíveis a deterioração aeróbia e, conseqüentemente, às perdas, principalmente nas regiões periféricas do silo, devido à intensa troca gasosa que existe com o ambiente.

Deve-se considerar que o silo não é um ambiente hermético, ou seja, mesmo o silo sendo bem vedado, durante o período de armazenamento, o ar penetra no seu interior, principalmente no topo e nas zonas laterais em contato com a parede por meio de trocas gasosas, sendo que este problema pode se agravar, sobretudo durante o fornecimento da silagem aos animais. A presença de O₂ desencadeia a proliferação de microrganismos indesejáveis presentes na massa (leveduras, fungos e bactérias aeróbias) que se desenvolvem com base na utilização de fontes de energia presentes na forragem, acarretando em perdas no valor nutritivo da silagem e redução do consumo de silagem pelos animais (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991; PAHLOW et al., 2003).

No Brasil existe o problema da especificação para produção de lonas para vedação de silos ainda ser pouco restritiva. Dessa forma, existe grande variabilidade na espessura e qualidade do filme comercializado, muitas vezes sendo a espessura negligenciada por algumas empresas. As lonas comercializadas não apresentam a espessura nominal que alguns fabricantes divulgam no rótulo da embalagem, sendo os valores abaixo da referência mostrada no rótulo da embalagem. Além do problema de espessura do filme plástico, enfrenta-se outra dificuldade que é a vida útil do plástico quando este é exposto ao ambiente. Como o tratamento desses filmes plásticos contra os raios ultra-violeta é considerado de alto custo pela indústria plástica, algumas lonas tem apresentado rasgos espontâneos quando exposta à radiação solar por um período reduzido de tempo.

Contrariando a expectativa geral, as falhas na vedação podem comprometer seriamente a eficiência na conservação de forragens devido ao ingresso de ar na

massa, o que se traduz em aumento da temperatura, das perdas devido à presença de microrganismos aeróbios deterioradores, prejuízos ao desempenho dos animais e possível contaminação de produtos de origem animal com toxinas produzidas por fungos filamentosos, como é o caso da excreção de aflatoxina no leite (BATTACONE et al., 2005; VELDMAN et al., 1992).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar diferentes tipos de filmes plásticos na vedação de silos horizontais e suas interferências relativas a qualidade das silagens, ao desempenho de vacas em lactação e qualidade do leite produzido.

5.2 Materias e Métodos

5.2.1 Ensilagem e tratamentos

O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP/ESALQ). O híbrido de milho utilizado foi o Pioneer 30F90 *Bt* e quando o mesmo atingiu média de 35% de matéria seca, procedeu-se a ensilagem (Tabela 15) entre os dias 11/03/2010 e 13/03/2010. As plantas foram colhidas mecanicamente com colhedora de forragem marca Mentamint[®], tracionada por trator, regulada para corte com tamanho médio de partículas entre 5 a 10 mm.

Como tratamentos foram utilizados filmes plásticos com diferenças na composição dos polímeros e a proteção da lona com bagaço de cana, originando experimento com 4 tratamentos (Figura 16):

- Silagem de milho vedada com filme plástico transparente de poliamida, com espessura de 45 µm, recoberta por filme plástico de polietileno dupla face, com espessura de 200 µm (PA+DF);
- Silagem de milho vedada com filme plástico de polietileno dupla face, com espessura de 200 µm (DF);
- Silagem de milho vedada com filme plástico de polietileno preto, com espessura de 200 µm e confeccionado a partir de material virgem (P);
- Silagem de milho vedada com filme plástico de polietileno preto, com espessura de 200 µm e confeccionado a partir de material reciclado, recoberta por camada de 10 cm de bagaço de cana (PR+BC).

Figura 16 - Vedação dos silos e imposição dos tratamentos experimentais

Para o armazenamento da forragem foram utilizados silos do tipo trincheira, sendo o enchimento realizado de forma mútua para os quatros silos e a compactação da forragem ocorreu durante tempo equivalente ao período de colheita, utilizando-se trator com peso de 40% do peso total de forragem recebida ao silo por hora (Ruppel et al., 1995). Sacos com seixo rolado foram colocados ao redor dos silos e ao longo do mesmo para garantir a vedação da massa de forragem (Figura 16).

5.2.2 Amostragens e variáveis analisadas na forragem fresca

Durante a ensilagem, a forragem foi amostrada e fragmentada em quatro sub-amostras. A primeira sub-amostra foi pesada e levada à estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 horas. Após este período foram pesadas novamente, moídas até as partículas atingirem menos de um milímetro e armazenadas em recipientes de plástico. A partir das amostras secas e moídas foram determinadas as concentrações de matéria seca (MS) e de matéria mineral (MM) conforme AOAC (1990).

A determinação da composição bromatológica foi realizada utilizando-se o método de espectroscopia de reflectância de infravermelho proximal (NIRS) (BERZAGHI; COZZI; ANDRIGHETTO, 1997; COZZOLINO; ACOSTA; GARCIA, 2001), visando à redução no número de amostras a serem analisadas pelo método convencional. O material moído 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 escaneadas geraram as seguintes variáveis: proteína bruta (PB), fibra insolúvel em detergente neutro (FDN), fibra insolúvel em detergente ácido (FDA), hemicelulose, extrato etéreo, amido e digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria orgânica (DVIVMO).

A segunda sub-amostra foi utilizada na avaliação do tamanho de partículas das silagens com base na estratificação das partículas por meio do método "Penn State Particle Size" (LAMMERS; BUCKMASTER; HEINRICHS, 1996). Entretanto, foi incorporada uma adaptação ao método original realizada por Mari e Nussio (2002) com a inserção de uma peneira adicional com orifícios de diâmetro de 38 mm. Dessa forma, foi obtido o material retido com diâmetro superior a 38 mm, entre 38 e 19 mm, entre 19 e 7,80 mm e inferior a 7,80 mm. O tamanho médio de partículas foi estimado por meio da ponderação da proporção de retenção do material em cada uma das peneiras.

A terceira sub-amostra foi utilizada para o preparo do extrato aquoso, onde uma alíquota de 30 g de amostra diluída em 270 g de água deionizada foram pesadas em sacos plásticos e homogeneizadas durante 4 minutos mediante aparelho Lab-Blender Stomacher 400 (Steward Laboratory, London). Após esse procedimento a solução foi filtrada em papel de filtro Whatman® 54 e o extrato obtido foi utilizado para análises de carboidratos solúveis (CHO's). A concentração de carboidratos solúveis foi obtida pelo método colorimétrico, segundo a metodologia descrita por Dubois et al. (1956) com leitura em comprimento de onda de 490 nm.

A quarta sub-amostra foi levada à estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 horas, moídas até as partículas atingirem menos de um milímetro e encaminhada para o Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC/UFSM) para determinação de aflatoxinas (B1, B2, G1, G2), segundo metodologia descrita por Soares e Rodriguez-Amaya (1989), utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas triplo quadrupolo (LC-MS/MS). Os limites de quantificação e o coeficiente de recuperação para as aflatoxinas foram: B1= 1µg/kg/94,5%; B2 = 1µg/kg/80,0%; G1 = 1µg/kg/88,5%; G2 = 1µg/kg/88,1%.

5.2.3 Perfil de temperatura no armazenamento

No centro de cada silo (região mediana entre a base e o topo) foram acondicionados no início, meio e fim sensores de temperatura associados à sistema informatizado e eletrônico de aquisição de dados (Chiplog[®], IMPAC, USA), programados para a tomada de temperatura da massa em intervalos constantes de 4 horas até a respectiva época de abertura. Com o conjunto de dados foi possível obter gráfico das temperaturas das unidades experimentais ao longo de todo o período do ensaio.

5.2.4 Avaliações nos silos

Decorridos 136 dias de armazenamento, os silos foram abertos e, dessa forma, iniciada as avaliações nas silagens. As silagens foram utilizadas para alimentação de vacas em lactação, as quais também foram inseridas nas avaliações.

Diariamente fatias de aproximadamente 15 cm foram retiradas ao longo de todo o painel do silo, sendo a retirada realizada no período matutino e vespertino. Assim, 50% do painel foi retirado no período da manhã (05:30) e outros 50% no período da tarde (15:30).

Primeiramente ao descarregamento do silo, a porção visualmente deteriorada foi retirada e armazenada em sacos para posterior quantificação e amostragem. Após essa etapa, a silagem considerada visualmente normal foi retirada manualmente, ensacada, pesada e amostrada, para posterior fornecimento aos animais. Esse procedimento perdurou-se por 14 semanas, onde no final de cada semana, tanto a silagem normal como deteriorada, as amostras foram compostas para posterior análise de matéria seca (MS) e matéria mineral (MM) conforme AOAC (1990).

Em relação à pesagem das silagens retiradas diariamente, foi realizada a proporcionalidade de silagem deteriorada em relação à silagem normal, e expressas com base na matéria natural e matéria seca.

Com a análise do teor de cinzas das silagens, foi realizado o cálculo do quanto representou a porção mineral da silagem deteriorada (MMd) em relação à porção mineral total (MMt), bem como, a elevação do teor de cinzas da silagem deteriorada (MMd) em relação a silagem normal (MMn).

As perdas de matéria orgânica da porção superior do silo foram realizadas conforme equação 2, proposta por Dickerson et al. (1992):

$$PMO_{\text{topo}} = \left[1 - \left(\frac{MMn \times MOd}{MMd \times MOn} \right) \right] \times 100 \quad (2)$$

Onde:

PMO_{topo} = perdas de matéria orgânica no topo (%); MMn = matéria mineral proveniente da silagem normal (%); MMd = matéria mineral proveniente da silagem deteriorada (%); MOn = matéria orgânica proveniente da silagem normal (%); MOd = matéria orgânica proveniente da silagem deteriorada (%).

Ao longo das 14 semanas de retirada das silagens foram realizadas 4 avaliações (julho, agosto, setembro e outubro) no painel do silos, tendo espaçamento de 20 dias entre avaliações. As amostragens foram realizadas no painel dos silos posteriormente a retirada da silagem no período da manhã para alimentação dos animais.

Três regiões da face do silo foram amostradas (Figura 17): a) porção central (C), com distância de 0,8 m do topo; b) porção do topo (T), com distância de 0,2 m do topo e, c) porção do topo lateral esquerda (TL), com distância de 0,2 m do topo e 0,4 m da lateral do silo.

Figura 17 - Regiões amostradas durante avaliações nos silos: C – centro; T – topo e TL – topo lateral

Logo após a retirada da silagem, termômetros foram posicionados na face dos silos, sendo dispostos na largura de 0; 60; 120; 180 e 240 cm da lateral dos silos e na altura de 0; 10; 20; 30; 50; 70 e 100 cm do topo dos silos, totalizando dessa maneira 35 pontos de coleta de temperatura por silo. A partir desses pontos foram geradas médias para as três regiões da face do silo, mencionadas na descrição das avaliações (C, T e TL).

Todas variáveis descritas no item 5.2.2 foram realizadas para as amostras das silagens. Adicionalmente para este grupo de análises foram determinadas as concentrações de alguns ácidos orgânicos (ácido láctico, ácido acético e ácido butírico) e pH.

Para análise dos ácidos graxos voláteis (ácido acético e ácido butírico), 800 µL do extrato aquoso da silagem, juntamente com 200 µL de ácido fórmico e 100 µL de padrão interno foram transferidos para um frasco de vidro. A leitura foi realizada em cromatógrafo líquido gasoso, CLG (Hewlett Packard® 5890, series II). A determinação da concentração de ácido láctico foi realizada por meio da adaptação do método espectrofotométrico (565 nm) de Pryce (1969).

Na avaliação das características microbiológicas, amostras das silagens (30 g) foram pesadas em sacos plásticos esterilizados e diluídas em 270 g de solução tampão (Oxoid Ringer's tablets) mais 0,1% de peptona (Difco bacto peptone # 0118-01-8) e homogeneizadas durante 4 minutos mediante aparelho Lab-Blender Stomacher 400 (Steward Laboratory, London). A partir dos extratos diluídos e filtrados foram realizadas as demais diluições (10^{-2} a 10^{-6}) e realizado o plaqueamento das diluições em placas com meio seletivo (Petrifilm 3M®).

As contagens de bactérias ácido lácticas e bactérias aeróbias foram realizadas após incubação das placas por dois dias a 35 °C. A determinação da população de leveduras e fungos filamentosos foram realizadas após incubação de 3 e 5 dias, respectivamente, a 25°C. Os números de microrganismos presentes foram contados como unidade formadora de colônia (ufc) e expressos como logaritmo na base 10.

Amostras das silagens foram encaminhadas para o Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC/UFSM) para determinação de aflatoxinas (B1, B2, G1, G2), segundo metodologia descrita por Soares e Rodriguez-Amaya (1989), utilizando-se

cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas triplo quadrupolo (LC-MS/MS). Os limites de quantificação e o coeficiente de recuperação para as aflatoxinas foram: B1= 1µg/kg/94,5%; B2 = 1µg/kg/80,0%; G1 = 1µg/kg/88,5%; G2 = 1µg/kg/88,1%.

5.2.5 Propriedades físicas dos filmes plásticos

No momento da vedação dos silos, bem como na 7ª e 14ª semana de experimentação, uma amostra por silo de aproximadamente 1 m² foi coletada e encaminhada para o Laboratório da Dow Chemical do Brasil para a realização das seguintes determinações seguindo as normas da ASTM (2010): espessura da lona; resistência a propagação do rasgo; resistência a perfuração e alongamento na ruptura.

A taxa de permeabilidade ao oxigênio foi calculada apenas para amostras dos filmes plásticos no momento da vedação e realizada em duas temperaturas de determinação, 25 e 35 °C.

5.2.6 Animais e instalações experimentais

Foram utilizadas 40 vacas da raça Holandesa de alto potencial de produção leiteira, com peso corporal (PC) médio inicial de 619,9 ± 56,8 kg, as quais entraram no experimento com média de 110,6 ± 35,7 dias pós-parto, com período experimental de 14 semanas. Os animais foram mantidos em sistema de confinamento, equipados com bebedouro e cochos, o qual permitiu o controle do consumo alimentar individual, e sistema de arrefecimento, com micro pulverizadores e ventiladores (Figura 18).

Figura 18 - Detalhamento das instalações com cocho individual, bebedouro e sistema de arrefecimento

Dez dias antes do início do experimento, os animais foram adaptados às instalações e ao volumoso oferecido. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completos casualizados, sendo os mesmos determinados de acordo com a produção leiteira e ordem de lactação (primípara e múltipara). O peso corporal dos animais e o escore de condição corporal foram obtidos por três dias consecutivos, realizados no início e no final do experimento.

5.2.7 Rações experimentais e manejo alimentar

Os tratamentos foram constituídos de rações contendo as silagens descritas no item 5.2.1, sendo formuladas de acordo com o NRC (2001), visando permitir produção potencial de 35 kg/dia. Os ingredientes concentrados utilizados na ração foram: milho moído, polpa cítrica, farelo de soja, metionina e núcleo mineral (Tabela 14).

A alimentação foi fornecida *ad libitum*, duas vezes ao dia, sendo permitida sobras de 10% do fornecido. A quantidade de alimento fornecido e as sobras foram quantificadas diariamente, sendo que, semanalmente foram efetuados ajustes quanto ao teor de MS dos ingredientes. A distribuição da ração foi realizada durante os períodos de ordenha (6:30h e 17:30) na forma de ração completa.

Os ingredientes concentrados das rações foram pesados em balança eletrônica e misturados em misturador horizontal, com capacidade para 500 kg. O volumoso e o concentrado de cada tratamento foram pesados em vagão autopropelido (Super Callan, American callan, USA) por período de 15 minutos. Após este período o alimento foi pesado e distribuído para os cochos individuais. Previamente ao início do experimento foram realizadas análises bromatológica dos volumosos e dos ingredientes concentrados utilizados na formulação das rações.

As amostragens do volumoso e do concentrado oferecido de cada tratamento foram coletadas diariamente, sendo compostos por semana de experimentação. As sobras de cada animal foram colhidas semanalmente, juntamente com o momento de compor amostras do oferecido.

Amostras dos volumosos, concentrados e sobras dos animais foram analisadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP. A

partir das amostras secas e moídas foram determinadas as concentrações de matéria seca (MS) e de matéria mineral (MM) conforme AOAC (1990).

Tabela 14 - Proporção dos ingredientes e composição química das rações utilizadas

	Tratamentos ¹			
	PA+DF	DF	P	PR+BC
Ingredientes				
Silagem de milho	51,39	51,04	50,79	51,32
Milho moído	17,81	17,94	18,03	17,84
Polpa cítrica peletizada	7,82	7,88	7,92	7,83
Farelo de soja	20,89	21,04	21,15	20,92
Metionina	0,13	0,13	0,14	0,13
Núcleo mineral ²	1,96	1,97	1,98	1,96
Composição química³				
MS	48,88	48,66	47,04	48,77
PB	15,91	15,91	15,98	15,91
FDN	40,33	40,72	40,90	40,40
EE	2,42	2,44	2,46	2,44
MM	6,54	6,46	6,52	6,48

¹PA+DF: lona transparente de poliamida (45 µm) recoberta por lona de polietileno dupla face (200 µm); DF: lona de polietileno dupla face (200 µm); P: lona de polietileno preta (200 µm); PR+BC: lona de polietileno reciclada preta (200 µm) recoberta por 10 cm de bagaço de cana; ²Composição por kg de produto: 10% Ca; 2% S; 4% P; 5% Mg; 2% K; 2800 ppm Zn; 490 ppm Cu; 18 ppm Se; 1400 ppm Mn; 14 ppm Co; 56 ppm I; 20 ppm Cr; 400 KU.I. Vit. A; 40 KU.I. Vit. D; 1200 U.I Vit. E; 80 mg Biotina; 600 mg Monensina sódica; ³MS: matéria seca; PB: proteína bruta; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro; EE: extrato etéreo; MM: matéria mineral.

Amostras da ração (ingredientes concentrados) foram determinadas na forma de química líquida para os teores de proteína bruta e fibra insolúvel em detergente neutro.

A determinação da composição bromatológica dos volumosos e das sobras foram realizadas utilizando-se o método de espectroscopia de reflectância de infravermelho proximal (NIRS) (BERZAGHI; COZZI; ANDRIGHETTO, 1997; COZZOLINO; ACOSTA; GARCIA, 2001). O material moído 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 escaneadas geraram as seguintes variáveis: proteína bruta (PB) e fibra insolúvel em detergente neutro (FDN), as quais juntamente com as variáveis MS e MM foram utilizadas para cálculo do consumo dos nutrientes.

Amostras das silagens e concentrados foram encaminhadas para o Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC/UFSM) para determinação de aflatoxinas (B1, B2, G1, G2), segundo metodologia descrita por Soares e Rodriguez-Amaya (1989), utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas triplo quadrupolo (LC-MS/MS). Os limites de quantificação e o coeficiente de recuperação para as aflatoxinas foram: B1= 1µg/kg/94,5%; B2 = 1µg/kg/80,0%; G1 = 1µg/kg/88,5%; G2 = 1µg/kg/88,1%.

5.2.8 Controle leiteiro e análises no leite

A produção de leite foi medida diariamente (Figura 19) por meio de medidor automático da marca Tru-Test®. Amostras compostas (ordenha da manhã e ordenha da tarde) foram colhidas semanalmente e conservadas em bromopol Broad Spectrum Microtabs® II (D&F Control Systems®, Inc., Califórnia – EUA) para posterior quantificação dos constituintes do leite.

Figura 19 - Ordenha mecânica com medidor automático de leite e coleta de amostra para análises

Foram realizados os cálculos de produção de leite corrigida para 4% de acordo com Gaines (1928) apud NRC (2001):

$$PLC = (PL \times 0,40) + (PG \times 15) \quad (3)$$

Onde:

PLC = produção de leite corrigida para 4% de gordura (kg/dia); PL = produção de leite (kg/dia); PG = produção de gordura (kg/dia).

As amostras foram enviadas no mesmo dia para o Laboratório de Análise de Leite, da Clínica do Leite do Departamento de Zootecnia da USP/ESALQ, para determinações de proteína, gordura, lactose, sólidos totais, contagem de células somáticas e nitrogênio ureico, por leitura de absorção de infravermelho próximo utilizando-se o equipamento Bentley 2000®.

Concomitante com a quantificação diária do leite, 20 vacas foram selecionadas (5 animais/tratamento) para quantificação de aflatoxina M1 no leite. Diariamente foram tomadas amostras de leite (ordenha da manhã e ordenha da tarde) e compostas por período de 4 semanas. As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC/UFSM), sendo utilizado na determinação o método descrito por Tuinstra et al. (1993), onde a aflatoxina M1 tem sua extração do leite após passagem da amostra em coluna de imunoafinidade, sendo a quantificação determinada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (LC-FLD). O limite de quantificação do método foi de 0,015 µg/kg com coeficiente de recuperação de 78%.

5.2.9 Comportamento Ingestivo dos animais

Durante o experimento de desempenho descrito anteriormente, foi avaliado na 11ª semana o comportamento ingestivo dos animais.

As avaliações foram realizadas de maneira individual para todos os animais, durante 24h, com observações visuais realizadas em intervalos de dez minutos. Foram determinados os tempos gastos com ingestão, ruminação, mastigação e ócio em

minutos/hora do dia. O tempo despendido em cada atividade foi calculado multiplicando-se o número total de observações por dez.

A atividade de mastigação foi obtida por meio do somatório das atividades de ingestão e ruminação. Na avaliação de ócio dos animais foi incluída a atividade de ingestão de água.

As atividades de ingestão, ruminação e mastigação foram também expressas em minutos/kg MS consumida e minutos/kg FDN consumida. A eficiência de ingestão e ruminação foram calculadas em kg MS/ hora e kg FDN/hora.

5.2.10 Digestibilidade *in vivo*

No dia seguinte a avaliação do comportamento ingestivo dos animais foi realizado o ensaio de digestibilidade *in vivo* das rações experimentais, utilizando-se 16 animais (4 por tratamento). A avaliação teve duração de três dias, sendo que no 1º dia foram coletadas fezes (Figura 20) dos animais das 22:00 as 06:00, no 2º dia das 14:00 as 22:00 e no 3º dia das 06:00 as 14:00 (DA SILVA, 2009). O fornecimento da dieta foi realizado duas vezes ao dia, sendo as sobras coletadas no período da manhã do dia subsequente.

Figura 20 - Instalações e coleta total de fezes dos animais na 11ª semana de experimentação

No final do terceiro dia, amostras do oferecido, sobras e fezes foram compostas e analisadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP. Depois de descongeladas, as amostras foram pesadas e levadas à estufa

de ventilação forçada a 55 °C por 72 horas. Após este período foram pesadas novamente, moídas até as partículas atingirem menos de um milímetro e armazenadas em recipientes de plástico. A partir das amostras secas e moídas foram determinadas as concentrações de matéria seca (MS), matéria mineral (MM) e extrato etéreo (EE) conforme AOAC (1990) e a concentração de proteína bruta (PB) segundo os métodos descritos por Wiles, Gray e Kissling (1998), por meio da combustão das amostras segundo o método de Dumas, utilizando auto-analisador de nitrogênio, marca LECO modelo FP-528.

As concentrações de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram realizadas com base no método seqüencial proposto pela ANKOM® Fiber Analyser (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY) e descrito por Holden (1999). Para determinação da FDN foi utilizado amilase e sulfito de sódio.

A matéria orgânica foi calculada descontando-se o teor de matéria mineral no teor de matéria seca. Os valores de carboidratos não fibrosos foram gerados subtraindo de 100 a soma dos teores de matéria mineral, proteína bruta, fibra insolúvel em detergente neutro e extrato etéreo.

5.2.11 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado para o experimento de desempenho dos animais foi o de blocos completos casualizados, composto por quatro tratamentos e dez repetições por tratamento, com medidas repetidas no tempo. Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância e as suas médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o recurso PROC MIXED do programa SAS (2003).

O delineamento experimental utilizado na avaliação do comportamento ingestivo e da digestibilidade *in vivo* foi o inteiramente casualizado, composto por quatro tratamentos e com dez e quatro repetições por tratamento, respectivamente. Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância e as suas médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o recurso PROC MIXED do programa SAS (2003).

5.3 Resultados

Neste item as variáveis estudadas estão descritas com seus valores de significância. As discussões e inter-relações das variáveis estão apresentadas no item 5.4.

5.3.1 Características da forragem no momento da ensilagem

Na Tabela 15 estão apresentadas as variáveis referentes a forragem no momento da ensilagem, sendo apresentado apenas valores para caracterização da forragem, sem comparações estatísticas.

Tabela 15 - Características da forragem no momento da ensilagem

Variável ¹	Tratamentos ²			
	PA+DF	DF	P	PR+BC
MS,%	33,55	33,09	34,02	33,17
MM, % MS	5,32	5,03	4,44	4,42
PB, % MS	6,85	6,26	6,69	6,72
FDN, % MS	54,46	52,41	53,24	53,45
FDA, % MS	31,59	31,88	30,54	32,12
EE, % MS	2,13	2,03	2,23	2,19
Amido, % MS	20,72	21,42	20,88	21,83
CHO's, %MS	5,73	6,02	5,79	5,86
DVIVMO, % MS	64,06	62,50	64,52	63,18
Aflatoxinas, ppb	nd	nd	nd	nd
TMP, cm	1,34	1,29	1,40	1,44

¹MS: matéria seca; MM: matéria mineral; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; EE: extrato etéreo; CHO's: carboidratos solúveis; DVIVMO: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria orgânica; TMP: tamanho médio de partículas; nd = não detectado para aflatoxinas B1, B2, G1 e G2; ²PA+DF: lona transparente de poliamida (45 µm) recoberta por lona de polietileno dupla face (200 µm); DF: lona de polietileno dupla face (200 µm); P: lona de polietileno preta (200 µm); PR+BC: lona de polietileno reciclada preta (200 µm) recoberta por 10 cm de bagaço de cana; ³C: centro; T: topo; TL: topo lateral; ⁴EPM: erro padrão da média.

Os teores de matéria seca e matéria mineral apresentaram amplitude de valores entre 33,09% a 34,02 e 4,42% a 5,32, respectivamente. Os valores de proteína bruta, fibra insolúvel em detergente neutro e fibra em detergente ácido apresentaram valores médios de 6,63%, 53,39% e 31,53%, respectivamente. A fração carboidrato solúvel e a

digestibilidade *in vitro* da matéria seca variaram entre 5,73% a 6,02% e 62,50% a 64,52%. A forragem apresentou valor médio de extrato etéreo e amido de 2,15% e 21,21%, respectivamente.

No momento da ensilagem não foram identificadas aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 na forragem. O tamanho médio de partícula apresentou valor médio de 1,37 cm.

5.3.2 Avaliações na silagem no armazenamento e descarregamento dos silos

Na Figura 21 estão apresentados os valores de temperatura das silagens, referentes aos sacos alojados no topo dos silos ao longo do período de armazenamento. Em função de falhas nos *dataloggers* para aquisição dos dados de temperatura, o número de repetições foi limitado, o que impossibilitou o cálculo estatístico dos dados.

Figura 21 - Temperaturas das silagens do topo ao longo do período de armazenamento

Descritivamente, pode-se observar que para todas as silagens houve intensa elevação de temperatura até o 7º dia após a vedação dos silos, e a partir deste momento as temperaturas começaram sua queda, verificando que no 31º dia a taxa de queda desacelerou.

Após a estabilização das temperaturas, a silagem vedada com o filme de polietileno preto e com proteção de bagaço sobre a lona apresentou as menores temperaturas. As silagens vedadas com o filme de polietileno dupla face e às vedadas com o filme de poliamida coberto pelo filme de polietileno dupla face apresentaram temperaturas semelhantes e entre os tratamentos, mostraram-se em posição intermediária. A silagem vedada com filme de polietileno preto de material virgem foi o que apresentou maior valor de temperatura ao longo do período de armazenamento. No momento da abertura dos silos os valores de temperatura para as silagens foram 31,5 °C, 25,7 °C, 25,7 °C e 21,1 °C, para os tratamentos P, DF, PA+DF e PR+BC, respectivamente.

As variáveis relacionadas com as características fermentativas das silagens em função dos tratamentos e do local de amostragem estão apresentadas na Tabela 16.

Não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos para as variáveis fermentativas, apresentando valores médios de 3,43%, 4,26, 3,28%, 1,24% e 0,06%, respectivamente, para carboidratos solúveis, pH, ácido láctico, ácido acético e ácido butírico.

Tabela 16 - Características fermentativas de silagens de milho sob estratégias de vedação

Variável ¹	Tratamentos ²					Local de amostragem ³			
	PA+DF	DF	P	PR+BC	EPM ⁴	C	T	TL	EPM ⁴
CHO's, % MS	3,70	3,01	3,44	3,58	0,29	4,08 ^a	3,61 ^a	2,61 ^b	0,25
pH	4,17	4,23	4,35	4,27	0,05	4,23	4,21	4,32	0,04
Ác. láctico, % MS	2,91	3,08	3,35	3,78	0,44	3,92	3,12	2,80	0,38
C2, % MS	1,31	1,44	1,08	1,14	0,10	0,97 ^b	1,43 ^a	1,32 ^a	0,09
C4, % MS	0,05	0,07	0,08	0,03	<0,01	0,03	0,04	0,04	<0,01

¹CHO's: carboidratos solúveis; C2: ácido acético; C4: ácido butírico; ²PA+DF: lona transparente de poliamida (45 µm) recoberta por lona de polietileno dupla face (200 µm); DF: lona de polietileno dupla face (200 µm); P: lona de polietileno preta (200 µm); PR+BC: lona de polietileno reciclada preta (200 µm) recoberta por 10 cm de bagaço de cana; ³C: centro; T: topo; TL: topo lateral; ⁴EPM: erro padrão da média.

Com relação ao local de amostragem foi verificada diferença ($P<0,05$) para valores de carboidratos solúveis e ácido acético (Tabela 16). Os maiores valores de carboidratos solúveis foram observados nas regiões do centro e do topo dos silos, e na

região do topo lateral foi verificado o menor valor ($P < 0,05$). Os valores de ácido acético foram maiores na região do topo e do topo lateral, tendo a região do centro dos silos como local de menor valor para esta variável.

Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) para as variáveis pH, ácido láctico e ácido butírico entre os locais de amostragem, apresentando valores médios de 4,25, 3,28%, 0,04%, respectivamente.

Na Tabela 17 estão apresentadas as características microbiológicas das silagens em função dos tratamentos e dos locais de amostragem.

Não houve diferença ($P > 0,05$) para a contagem de microrganismos, tanto anaeróbios como aeróbios em relação aos tratamentos impostos, apresentando valores médios de 5,78, 5,58, 3,87 e 3,69 ufc/g forragem para bactérias ácido lácticas, bactérias aeróbias, leveduras e fungos filamentosos.

Não foi detectada a presença de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 nas silagens amostradas, tanto em função dos tratamentos, como em função do local de amostragem.

Tabela 17 - Características microbiológicas ($\log_{10}$ ufc/g) de silagens de milho sob estratégias de vedação

Variável ¹	Tratamentos ²					Local de amostragem ³			
	PA+DF	DF	P	PR+BC	EPM ⁴	C	T	TL	EPM ⁴
BAL	5,56	6,01	6,13	5,41	0,32	5,29	5,90	6,13	0,28
BA	5,43	5,58	5,72	5,54	0,34	5,13	5,63	5,96	0,29
LEV	3,25	3,47	4,23	4,51	0,67	2,41 ^b	3,56 ^a	5,63 ^a	0,55
FF	3,62	2,93	4,36	3,83	0,68	2,99	3,88	4,18	0,61
AFLA, ppb	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	-

¹BAL: bactérias ácido lácticas; BA: bactérias aeróbias; LEV: leveduras; FF: fungos filamentosos; AFLA: aflatoxinas; nd = não detectado para aflatoxinas B1, B2, G1 e G2; TEMP: temperatura no painel do silo;

²PA+DF: lona transparente de poliamida (45 μ m) recoberta por lona de polietileno dupla face (200 μ m); DF: lona de polietileno dupla face (200 μ m); P: lona de polietileno preta (200 μ m); PR+BC: lona de polietileno reciclada preta (200 μ m) recoberta por 10 cm de bagaço de cana; ³C: centro; T: topo; TL: topo lateral; ⁴EPM: erro padrão da média.

Apenas a contagem de leveduras apresentou diferença ($P < 0,05$) entre os locais de amostragem. As maiores contagens foram verificadas na região do topo e topo lateral dos silos, sendo a menor contagem na região do centro dos silos.

Não houve diferença ($P>0,05$) para as demais contagens de microrganismos, apresentando valores médios de 5,77, 5,57 e 3,68 para bactérias ácido lácticas, bactérias aeróbias e fungos filamentosos, respectivamente.

A avaliação da temperatura da silagem em função dos tratamentos juntamente com o local de amostragem é apresentada na Figura 22.

Não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos para as temperaturas das silagens obtidas no centro dos silos. Porém, na região do topo e topo lateral dos silos houve diferença ($P<0,05$) entre os tratamentos, sendo os maiores valores observados para as lonas, preta e preta coberta com bagaço. Na região do topo, a silagem vedada com lona de poliamida sobreposta por lona de polietileno apresentou o menor ($P<0,05$) valor de temperatura, verificando valor intermediário para o tratamento com a lona dupla face. Já para região lateral do topo, as temperaturas das silagens provenientes dos tratamentos PA+DF e DF apresentaram os menores valores, e nos tratamentos P e PR+BC, os maiores valores foram verificados (Figura 22).

Figura 22 - Temperaturas das silagens de milho em função do tipo de lona utilizada na vedação e da localidade da silagem no painel do silo. Letras minúsculas comparam médias entre os tipos de lonas e maiúsculas entre as regiões amostradas.

A temperatura das silagens apresentou diferença ($P<0,05$) entre os locais de amostragens, verificando maiores valores para as silagens vedadas com lona preta e preta com sobreposição de bagaço na região do topo e topo lateral em relação as

silagens amostradas no centro dos silos. Para os demais tratamentos não houve diferença ($P>0,05$) entre os locais de amostragem.

Na Tabela 18 estão apresentados indicadores de deterioração aeróbia das silagens ao longo do período de descarregamento dos silos.

A quantidade de silagem descartada, tanto com base na matéria seca como na matéria verde, apresentaram diferenças ($P<0,05$) entre os tratamentos. As maiores quantidades de silagem descartada foram para os tratamentos com a lona preta e lona dupla face. Os menores valores foram observados para os tratamentos PA+DF e PR+BC, quando comparado com base na matéria seca e, somente PR+BC quando comparado com base na matéria verde, sendo o tratamento com o filme de poliamida sobreposto por lona dupla face, apresentou-se em posição intermediária para essa comparação.

Tabela 18 - Indicadores de deterioração das silagens durante 14 semanas de descarregamento dos silos

Variável ¹	Tratamentos ³				EPM ⁴	Efeito ⁵
	PA+DF	DF	P	PR+BC		
Silagem descartada, % MS	3,86 ^b	5,96 ^a	7,42 ^a	2,87 ^b	0,40	**
Silagem descartada, % MV	5,61 ^b	7,78 ^a	8,96 ^a	3,38 ^c	0,46	**
MMd/ MMt, %	5,33 ^c	8,10 ^b	11,00 ^a	3,96 ^c	0,73	**
Aumento MMd/MMn, %	40,87	41,51	53,76	41,56	6,78	NS
Perdas de MO, % ²	27,44	29,19	34,86	28,41	3,47	NS

¹MS: matéria seca; MV: matéria verde; MMd: matéria mineral da porção de silagem deteriorada; MMn: matéria mineral da porção de silagem normal; MMt: somatório de MMd+MMn; MO: matéria orgânica;

²Dickerson et al. (1992); ³PA+DF: lona transparente de poliamida (45 µm) recoberta por lona de polietileno dupla face (200 µm); DF: lona de polietileno dupla face (200 µm); P: lona de polietileno preta (200 µm); PR+BC: lona de polietileno reciclada preta (200 µm) recoberta por 10 cm de bagaço de cana;

⁴EPM: erro padrão da média; ⁵** $P<0,001$; * $P<0,05$; NS: não significativo.

A proporção de matéria mineral da porção deteriorada de silagem em relação porção total apresentou diferença ($P<0,001$) entre os tratamentos. O tratamento com vedação do silo com lona preta apresentou o maior valor dessa relação, sendo os menores valores verificados para os tratamentos PA+DF e PR+BC. O tratamento com vedação da lona dupla face apresentou valores intermediários.

Não houve diferença ($P>0,05$) para o aumento da concentração de matéria mineral da porção deteriorada de silagem em relação à concentração de matéria mineral da porção normal e para as perdas de matéria orgânica (Tabela 18), apresentando valor médio de 44,43% e 29,98%, respectivamente.

Na Tabela 19 estão apresentadas as variáveis relacionadas com o valor nutritivo das silagens em função dos tratamentos e do local de amostragem.

Não foi verificado diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos para nenhuma das variáveis relacionadas com o valor nutritivo das silagens. Os valores médios foram: 33,98% de matéria seca, 4,30% de matéria mineral, 7,06% de proteína bruta, 51,88% de fibra insolúvel em detergente neutro, 31,66% de fibra insolúvel em detergente ácido, 22,20% de amido, 2,29% de extrato etéreo e 59,79% de digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca.

Tabela 19 - Valor nutritivo de silagens de milho sob estratégias de vedação

Variável ¹	Tratamentos ²					Local de amostragem ³			
	PA+DF	DF	P	PR+BC	EPM ⁴	C	T	TL	EPM ⁴
MS, %	33,30	35,80	33,70	33,10	1,48	36,20	32,80	33,00	1,28
MM, % MS	4,10	4,15	4,54	4,39	0,16	4,27	4,33	4,39	0,10
PB, %MS	7,20	6,98	7,06	6,98	0,16	6,81	7,44	6,92	0,14
FDN, % MS	50,60	51,54	52,78	52,61	0,91	51,81	51,20	52,62	0,78
FDA, % MS	31,18	30,85	31,96	32,66	0,62	32,21	31,07	31,71	0,54
Amido, % MS	23,15	23,07	21,40	21,16	0,70	21,38	22,42	22,79	0,60
EE, % MS	2,28	2,34	2,31	2,24	0,04	2,32	2,22	2,33	0,03
DVIVMO, % MS	59,38	60,38	57,94	61,47	0,74	63,32 ^a	58,46 ^b	59,11 ^b	0,64

¹MS: matéria seca; MM: matéria mineral; PB: proteína bruta; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro; FDA: fibra insolúvel em detergente ácido; EE: extrato etéreo; DVIVMO: digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria orgânica; ²PA+DF: lona transparente de poliamida (45 µm) recoberta por lona de polietileno dupla face (200 µm); DF: lona de polietileno dupla face (200 µm); P: lona de polietileno preta (200 µm); PR+BC: lona de polietileno reciclada preta (200 µm) recoberta por 10 cm de bagaço de cana; ³C: centro; T: topo; TL: topo lateral; ⁴EPM: erro padrão da média.

Entre os locais de amostragem, a digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca apresentou diferença ($P<0,05$), sendo a maior digestibilidade verificada para as silagens presentes no centro dos silos. As silagens provenientes das regiões do topo e topo lateral apresentaram os menores valores.

Para as demais variáveis não foram observadas diferenças ($P>0,05$) entre os locais de amostragens, apresentando valor médio de 34% de matéria seca, 4,33% de matéria mineral, 7,06% de proteína bruta, 51,88% de fibra insolúvel em detergente neutro, 31,66% de fibra insolúvel em detergente ácido, 22,20% de amido e 2,29% de extrato etéreo.

5.3.3 Propriedades físicas dos filmes plásticos

As propriedades físicas dos filmes plásticos utilizados na vedação dos silos em função do tipo de lona e do momento da amostragem estão apresentadas na Tabela 20.

Houve diferença ($P<0,05$) para todas as variáveis com relação ao tipo de filme plástico utilizado na vedação dos silos. O maior valor de espessura foi verificado para a lona preta de material virgem, seguida pelas lonas dupla face e preta de material reciclado e, o menor valor observado para a lona de poliamida.

A resistência a propagação do rasgo foi maior ($P<0,05$) para a lona preta de material reciclado, seguida da lona dupla face, lona preta e o menor valor para lona de poliamida.

O filme de poliamida apresentou maior ($P<0,05$) resistência a perfuração, seguido do filme preto de material reciclado. O filme preto de material virgem não apresentou diferença entre o filme de mesma cor reciclado e o filme de dupla face. A lona dupla face apresentou o menor valor ($P<0,05$) comparado aos demais filmes plásticos.

A taxa de alongamento na ruptura foi maior ($P<0,05$) para o filme preto de material reciclado e menor para o filme preto de material reciclado. Os filmes de poliamida e dupla face apresentaram valores intermediários aos demais filmes plásticos.

Tabela 20 - Propriedades físicas dos filmes plásticos utilizados na vedação das silagens de milho

Variável ¹	Lonas ²					Momento de amostragem			
	PA	DF	P	PR	EPM ³	Início	Meio	Fim	EPM ³
ESP, µm	53,1 ^c	136,4 ^b	144,0 ^a	137,1 ^b	1,12	122,1	120,5	122,8	0,87
RPR, g	57,6 ^d	635,6 ^b	314,3 ^c	894,5 ^a	11,81	498,9	516,1	416,5	9,11
RP, J/cm ³	1,64 ^a	0,69 ^c	1,09 ^{bc}	1,40 ^b	0,11	1,91 ^a	0,70 ^b	0,74 ^b	0,09
AR, %	368,0 ^b	340,7 ^b	144,0 ^c	836,5 ^a	13,2	552,8 ^a	423,5 ^b	389,3 ^c	10,3

¹ESP: espessura; RPR: resistência a propagação do rasgo; RP: resistência a perfuração; AR: alongamento na ruptura; ²PA: lona transparente de poliamida (45 µm); DF: lona de polietileno dupla face (200 µm); P: lona de polietileno preta (200 µm); PR: lona de polietileno reciclada preta (200 µm); ³EPM: erro padrão da média.

Ao longo dos momentos de amostragem dos filmes plásticos não foram verificadas diferenças ($P>0,05$) para a espessura e resistência a propagação do rasgo, apresentando valores médios de 121,8 e 477,17, respectivamente.

A resistência a perfuração, tensão na ruptura transversal e alongamento na ruptura apresentaram diferença ($P<0,05$) entre os momentos de amostragem, sendo que para as três variáveis os maiores valores foram observados no momento da vedação dos silos (início), com redução nos valores na medida em que se passaram as semanas de experimentação.

Na Figura 23 está apresentada a taxa de permeabilidade ao oxigênio dos filmes plásticos sob diferentes temperaturas de determinação.

As maiores taxas de permeabilidade da lona ao oxigênio ($P<0,05$) foram observadas para os filmes dupla face e preto de material virgem. O filme plástico de poliamida apresentou o menor ($P<0,05$) valor entre os demais filmes plásticos. O filme preto de material reciclado apresentou taxa de permeabilidade ao oxigênio superior ao filme de poliamida e inferior aos filmes dupla face e preta de material virgem.

Entre as temperaturas de determinação da taxa de permeabilidade ao oxigênio foi verificado aumento ($P<0,05$) para todos os filmes plásticos, exceto para o filme de poliamida que não apresentou diferença ($P>0,05$) entre as temperaturas. Os demais filmes apresentaram elevação em suas taxas com a elevação da temperatura.

Figura 23 - Taxa de permeabilidade ao oxigênio dos filmes plásticos utilizados na vedação dos silos sob diferentes temperaturas. Letras minúsculas comparam médias entre os tipos de lonas dentro de cada temperatura de avaliação e maiúsculas entre as temperaturas

5.3.4 Desempenho animal

O peso e o escore de condição corporal dos animais estão apresentados na Tabela 21.

Não houve diferença ($P>0,05$) para o peso corporal inicial e final dos animais entre os tratamentos, apresentado valores médios de 619,3 e 652,8 kg, respectivamente. Com o passar das 14 semanas de experimentação, os animais apresentaram ganho médio de 33,5 kg.

O escore de condição corporal dos animais não diferiu ($P>0,05$) entre os tratamentos, tanto no início como no final do período experimental, apresentando valores médios de 3,03 e 3,25, respectivamente.

Tabela 21 - Peso corporal e escore de condição corporal de vacas em lactação no início e final do experimento

Variável	Tratamentos ¹				EPM ²	Efeito ³
	PA+DF	DF	P	PR+BC		
Peso corporal, kg						
Inicial	610,6	659,6	604,1	602,9	17,24	NS
Final	653,2	687,1	638,8	632,1	15,70	NS
Escore de condição corporal						
Inicial	2,99	3,14	2,97	3,01	0,08	NS
Final	3,26	3,27	3,23	3,25	0,10	NS

¹PA+DF: lona transparente de poliamida (45 µm) recoberta por lona de polietileno dupla face (200 µm); DF: lona de polietileno dupla face (200 µm); P: lona de polietileno preta (200 µm); PR+BC: lona de polietileno reciclada preta (200 µm) recoberta por 10 cm de bagaço de cana; ²EPM: erro padrão da média; ³***P<0,001; *P<0,05; NS: não significativo.

Os consumos dos nutrientes provenientes das dietas oferecidas aos animais estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 - Consumo dos nutrientes das dietas oferecidas para vacas em lactação alimentadas com as diferentes silagens

Variável ¹	Tratamentos ²				EPM ³	Efeitos ⁴		
	PA+DF	DF	P	PR+BC		Tratamento	Semana	Interação
MS, % PC	3,47	3,38	3,41	3,53	0,09	NS	-	-
MS, kg/dia	21,70	22,68	21,30	21,88	0,70	NS	**	**
MO, kg/dia	20,33	21,26	19,94	20,50	0,66	NS	**	**
PB, kg/dia	3,57	3,74	3,53	3,60	0,12	NS	**	**
FDN, kg/dia	8,51	9,00	8,49	8,60	0,28	NS	**	**

¹PC: peso corporal; MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro; ²PA+DF: lona transparente de poliamida (45 µm) recoberta por lona de polietileno dupla face (200 µm); DF: lona de polietileno dupla face (200 µm); P: lona de polietileno preta (200 µm); PR+BC: lona de polietileno reciclada preta (200 µm) recoberta por 10 cm de bagaço de cana; ³EPM: erro padrão da média; ⁴***P<0,001; *P<0,05; NS: não significativo.

O consumo de matéria seca como porcentagem do peso corporal dos animais não apresentou diferença (P>0,05) entre os tratamentos, verificando valor médio de 3,45%.

Não houve diferença (P>0,05) para os consumos de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta e fibra insolúvel em detergente neutro, os quais apresentaram

valores médios de 21,89; 20,51; 3,61; 8,56 kg/dia, respectivamente. Entretanto, para os mesmos nutrientes foram verificadas diferença ($P < 0,001$) no consumo ao longo das semanas de experimentação (Figura 24).

O consumo de matéria seca e matéria orgânica mantiveram o mesmo padrão de comportamento, com quedas e elevações ao longo das semanas experimentais. O consumo de matéria seca apresentou variação de 20,8 a 22,8 kg/dia durante o período de 14 semanas. A variação para o consumo de matéria orgânica variou de 19,5 a 21,2 kg/dia.

Figura 24 - Consumo dos nutrientes das dietas oferecidas para vacas em lactação alimentadas com as diferentes silagens ao longo das semanas experimentais

Para os consumos de fibra insolúvel em detergente neutro e proteína bruta foi verificado o mesmo comportamento, com variações aleatórias ao longo das semanas experimentais. A variação no consumo de FDN foi de 7,8 a 10,1 kg/dia e, o consumo de proteína bruta apresentou consumos entre 3,4 a 4,0 kg/dia (Figura 24).

As participações dos nutrientes na dieta oferecida e consumida pelos animais estão apresentadas na Tabela 23.

Não houve diferença ($P > 0,05$) entre tratamentos na proporção dos nutrientes (MM, PB e FDN) da dieta oferecida, apresentando as dietas valores médios de 6,5%,

15,93% e 40,59%, respectivamente de matéria mineral, proteína bruta e fibra insolúvel em detergente neutro.

Com relação à dieta consumida, não foi verificada diferença ($P>0,05$) para o teor de matéria mineral. Entretanto, os valores proteína bruta e fibra insolúvel em detergente neutro apresentaram diferenças ($P<0,001$) entre os tratamentos.

Tabela 23 - Participação dos nutrientes (%) na dieta oferecida e consumida por vacas em lactação alimentadas com rações contendo as diferentes silagens

Variável ¹	Tratamentos ²				EPM ³	Efeitos ⁴		
	PA+DF	DF	P	PR+BC		Tratamento	Semana	Interação
MM								
Oferecida (a)	6,54	6,46	6,52	6,48	-	-	-	-
Consumida (b)	6,35	6,25	6,36	6,30	0,05	NS	**	**
Diferença (a-b)	-0,19	-0,21	-0,16	-0,18	0,04	NS	**	NS
PB								
Oferecida (c)	15,92	15,92	15,97	15,91	-	-	-	-
Consumida (d)	16,47 ^b	16,48 ^b	16,58 ^a	16,48 ^b	0,03	*	**	**
Diferença (c-d)	0,55	0,56	0,61	0,57	0,03	NS	**	NS
FDN								
Oferecida (e)	40,33	40,72	40,90	40,40	-	-	-	-
Consumida (f)	39,19 ^b	39,71 ^a	39,82 ^a	39,25 ^b	0,08	**	**	**
Diferença (e-f)	-1,14	-1,01	-1,08	-1,15	0,08	NS	**	**

¹MM: matéria mineral; PB: proteína bruta; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro; ²PA+DF: lona transparente de poliamida (45 µm) recoberta por lona de polietileno dupla face (200 µm); DF: lona de polietileno dupla face (200 µm); P: lona de polietileno preta (200 µm); PR+BC: lona de polietileno reciclada preta (200 µm) recoberta por 10 cm de bagaço de cana; ³EPM: erro padrão da média; ⁴** $P<0,001$; * $P<0,05$; NS: não significativo.

O maior teor de proteína bruta foi verificado na dieta que continha silagem vedada com lona preta de material virgem, sendo que os demais tratamentos mostraram teores inferiores desse nutriente. O teor de fibra insolúvel em detergente neutro apresentou maiores valores nas dietas dos tratamentos com lona dupla face e lona preta de material virgem, sendo os menores valores observados para os demais tratamentos.

O valor gerado entre a diferença do teor do nutriente na dieta oferecida e na dieta consumida não apresentou diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos para nenhum dos nutrientes apresentados na Tabela 23.

As médias dos teores dos nutrientes das dietas consumidas estão apresentadas na Figura 25.

Como ocorrido com o consumo dos nutrientes ao longo das semanas de experimentação (Figura 24), os teores dos nutrientes na dieta consumida apresentaram variações ao longo do período de experimentação.

Figura 25 - Porcentagem dos nutrientes nas dietas consumidas por vacas em lactação alimentadas com as diferentes silagens ao longo das semanas experimentais

Houve diferença ($P<0,001$) para os três nutrientes mencionados na Figura 25. O teor de fibra insolúvel em detergente neutro variou de 35,6% a 44,1%. A proteína bruta apresentou variação de 15,8% a 18,4%, por final, o teor de matéria mineral variou de 3,0% a 7,6%.

Os valores de produção de leite, produção de leite corrigida para gordura e eficiência alimentar estão apresentados na Tabela 24.

Houve diferença ($P<0,05$) entre os tratamentos para a produção de leite e produção de leite corrigida para 4% de gordura. A dieta que continha silagem

proveniente do silo vedado com lona preta de material reciclado com proteção de bagaço apresentou o maior valor, sendo a menor média verificada para o tratamento que continha filme plástico preto de material virgem. Os tratamentos com as lonas de poliamida sobreposta por lona dupla face e o tratamento com lona dupla face apresentaram valores intermediários de produção de leite.

Tabela 24 - Produção de leite e eficiência alimentar de vacas em lactação alimentadas com as diferentes silagens

Variável ¹	Tratamentos ²				EPM ³	Efeitos ⁴		
	PA+DF	DF	P	PR+BC		T	S	I
Produção de leite, kg/d	32,31 ^{ab}	32,91 ^{ab}	30,43 ^b	34,42 ^a	1,58	*	**	NS
PLC, kg/d	30,28 ^{ab}	30,44 ^{ab}	29,53 ^b	32,47 ^a	1,11	*	**	NS
EA, kg de leite/kg MS	1,49 ^{ab}	1,44 ^b	1,44 ^b	1,59 ^a	0,05	*	**	**

¹PCL: Produção de leite corrigida para 4% de gordura (GAINES, 1928 apud NRC, 2001); EA: eficiência alimentar; ²PA+DF: lona transparente de poliamida (45 µm) recoberta por lona de polietileno dupla face (200 µm); DF: lona de polietileno dupla face (200 µm); P: lona de polietileno preta (200 µm); PR+BC: lona de polietileno reciclada preta (200 µm) recoberta por 10 cm de bagaço de cana; ³EPM: erro padrão da média; ⁴T: tratamento; S: semanas; I: interação TxS; **P<0,001; *P<0,05; NS: não significativo.

A eficiência alimentar apresentou diferença (P<0,05) entre os tratamentos, verificando o maior para o tratamento com vedação do silo com lona preta de material reciclado e com proteção de bagaço. Os menores valores foram observados para os tratamentos que tiveram sua vedação com a lona dupla face e lona preta de material virgem. A lona de poliamida sobreposta por lona dupla face apresentou valor intermediário entre os demais tratamentos.

Na Figura 26 estão apresentados os valores de produção leiteira ao longo do período experimental.

A produção de leite dos animais alimentados com a silagem vedada com lona preta de material reciclado com proteção de bagaço apresentou superioridade (P<0,05) ao longo de todo o período experimental, sendo o tratamento com lona preta o qual apresentou as menores produções em todos os momentos. Não foi verificada diferença entre os tratamentos PA+DF e DF, os quais apresentaram valores intermediários entre os demais tratamentos.

Figura 26 - Produção leiteira de vacas alimentadas com as diferentes silagens ao longo das semanas experimentais

Com o avançar das semanas de lactação dos animais, verificou-se queda na produção leiteira para todos os tratamentos. A máxima média de produção foi verificada para o tratamento com lona preta de material reciclado com proteção de bagaço, o qual na segunda semana de experimentação apresentou média de 37,5 kg de leite/dia. O menor valor foi de 28,1 kg de leite/dia observado na 13ª semana de experimentação para o tratamento que continha lona preta de material virgem.

Os valores de produção leiteira corrigida para gordura ao longo do período experimental estão apresentados na Figura 27.

A produção de leite corrigida para gordura teve comportamento semelhante a produção de leite dos animais com o decorrer das semanas de experimentação, apresentando redução com o avançar das semanas.

O maior valor foi de 34,6 kg/dia na 4ª semana de experimentação dentro do tratamento com lona preta de material reciclado com proteção de bagaço e o menor valor de 27,4 kg/dia observado na 13ª semana no tratamento com lona preta de material virgem.

Figura 27 - Produção leiteira corrigida para 4% de gordura de vacas alimentadas com as diferentes silagens ao longo das semanas experimentais

A produção dos constituintes do leite dos animais em kg/dia está apresentada na Tabela 25. Não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos para a produção diária de gordura, proteína, sólidos totais e extrato seco desengordurado, apresentando valores médios de 1,18; 1,07; 4,06 e 2,88, respectivamente.

Tabela 25 - Produção dos constituintes do leite (kg/dia) de vacas em lactação alimentadas com as diferentes silagens

Variável	Tratamentos ¹				EPM ²	Efeitos ³		
	PA+DF	DF	P	PR+BC		T	S	I
Gordura	1,16	1,15	1,16	1,25	0,04	NS	**	NS
Proteína	1,05	1,09	1,05	1,09	0,04	NS	**	NS
Lactose	1,51 ^{ab}	1,54 ^a	1,41 ^b	1,61 ^a	0,08	*	**	NS
Sólidos totais	4,00	4,08	3,89	4,25	0,16	NS	**	NS
Extrato seco desengordurado	2,85	2,93	2,73	3,01	0,13	NS	**	NS

¹PA+DF: lona transparente de poliamida (45 μ m) recoberta por lona de polietileno dupla face (200 μ m); DF: lona de polietileno dupla face (200 μ m); P: lona de polietileno preta (200 μ m); PR+BC: lona de polietileno reciclada preta (200 μ m) recoberta por 10 cm de bagaço de cana; ²EPM: erro padrão da média; ³T: tratamento; S: semanas; I: interação TxS; ** $P<0,001$; * $P<0,05$; NS: não significativo.

A produção de lactose foi maior ($P<0,05$) para os tratamentos PR+BC e DF, sendo o menor valor verificado no tratamento no qual se utilizou a vedação com lona

preta de material virgem. O tratamento PA+DF apresentou valores intermediários, não diferindo entre os demais tratamentos.

Na Tabela 26 está apresentada a porcentagem dos constituintes do leite dos animais em função dos tratamentos.

Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) para os teores de gordura, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordura, apresentando os mesmos valores médios de 3,67%, 4,65%, 12,55% e 8,88%, respectivamente.

Tabela 26 - Porcentagem dos constituintes do leite (%) de vacas em lactação alimentadas com as diferentes silagens

Variável	Tratamentos ¹				EPM ²	Efeitos ³		
	PA+DF	DF	P	PR+BC		T	S	I
Gordura	3,65	3,57	3,83	3,61	0,14	NS	**	NS
Proteína	3,29 ^{ab}	3,34 ^{ab}	3,44 ^a	3,18 ^b	0,07	*	**	NS
Lactose	4,65	4,67	4,64	4,65	0,06	NS	**	NS
Sólidos totais	12,51	12,50	12,82	12,35	0,21	NS	**	NS
Extrato seco desengordurado	8,86	8,93	8,99	8,74	0,09	NS	**	NS

¹PA+DF: lona transparente de poliamida (45 µm) recoberta por lona de polietileno dupla face (200 µm); DF: lona de polietileno dupla face (200 µm); P: lona de polietileno preta (200 µm); PR+BC: lona de polietileno reciclada preta (200 µm) recoberta por 10 cm de bagaço de cana; ²EPM: erro padrão da média; ³T: tratamento; S: semanas; I: interação TxS; ** $P<0,001$; * $P<0,05$; NS: não significativo.

Houve diferença ($P<0,05$) para o teor de proteína no leite, onde o maior valor foi observado para o tratamento com vedação do silo com lona preta de material virgem e o menor teor verificado para o tratamento PR+BC. Os tratamentos PA+DF e DF apresentaram valores intermediários entre os demais tratamentos.

Com relação às semanas de lactação, foi verificada diferença ($P<0,001$) para os teores dos constituintes do leite, sendo apresentados na Figura 28 os teores de gordura, proteína e lactose no leite.

O teor de lactose, apesar de apresentar diferença ($P<0,001$) ao longo das semanas de experimentação, apresentou teor de 4,69% no início do experimento, finalizando na 14^a semana com teor de 4,67. O pico em seu teor foi verificado na terceira semana de experimentação, o qual apresentou valor de 4,71%.

Figura 28 - Porcentagem dos constituintes do leite de vacas alimentadas com as diferentes silagens ao longo das semanas experimentais

Os teores de gordura e proteína apresentaram aumento nos valores (Figura 28), sendo que o teor gordura no leite no início do experimento apresentou valor de 3,44 e em seu término, na 14ª semana de experimentação, o teor foi de 3,82%. Os teores de proteína no leite apresentaram comportamento semelhante ao teor de gordura, porém foi verificada queda no teor na 14ª semana (3,27%). Os teores no início e na 13ª semana do experimento foram de 3,16% e 3,43%, respectivamente.

Na Tabela 27 estão apresentados os valores de contagem de células somáticas e a concentração de nitrogênio ureico no leite dos animais.

Tabela 27 - Contagem de células somáticas e teor de nitrogênio ureico no leite de vacas alimentadas com as diferentes silagens

Variável ¹	Tratamentos ²				EPM ³	Efeitos ⁴		
	PA+DF	DF	P	PR+BC		T	S	I
CCS, x1000/ mL	104,70	152,64	107,23	85,11	38,13	NS	NS	NS
Nitrogênio ureico, %	14,11	15,02	14,56	14,40	0,48	NS	NS	NS

¹CCS: contagem de células somáticas; ²PA+DF: lona transparente de poliamida (45 µm) recoberta por lona de polietileno dupla face (200 µm); DF: lona de polietileno dupla face (200 µm); P: lona de polietileno preta (200 µm); PR+BC: lona de polietileno reciclada preta (200 µm) recoberta por 10 cm de bagaço de cana; ³EPM: erro padrão da média; ⁴T: tratamento; S: semanas; I: interação TxS; **P<0,001; *P<0,05; NS: não significativo.

Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) para as variáveis entre os tratamentos. A contagem de células somáticas apresentou valor médio de 112.420 /mL e o teor de nitrogênio ureico foi de 14,52%.

5.3.5 Ocorrência de aflatoxinas na dieta e no leite

As concentrações médias de aflatoxina B1 em função dos tratamentos e do tipo de silagem (normal ou deteriorada) estão apresentadas na Tabela 28.

Ao longo das semanas de experimentação foi verificada a presença de aflatoxina B1 em todas as silagens. Na silagem normal foram observadas concentrações de 1,35; 1,30; 0,50 e 0,55 ppb, respectivamente para os tratamentos PA+DF, DF, P e PR+BC. A silagem deteriorada apresentou valores de 1,70; 1,20; 3,50 e 0,50 ppb, respectivamente para os mesmos tratamentos mencionados anteriormente.

Quando comparado as concentrações de aflatoxina B1 entre a silagem normal e silagem deteriorada, verificou-se que na silagem normal o valor foi inferior (0,93 ppb) ao da silagem deteriorada (1,72 ppb). O valor máximo encontrado na silagem normal foi de 2,30 ppb, ao passo que na silagem deteriorada foi verificado valor de 7,00 ppb.

Tabela 28 - Concentrações médias de aflatoxina B1 em silagens de milho sob diferentes tipos de vedação

Tratamentos ¹	Aflatoxina B1 (ppb)	
	Silagem normal	Silagem deteriorada
PA+DF	1,35	1,70
DF	1,30	1,20
P	0,50	3,50
PR+BC	0,55	0,50
Média	0,93	1,72
Desvio padrão	0,61	2,00
Mínimo	0,00	0,00
Máximo	2,30	7,00

¹PA+DF: lona transparente de poliamida (45 µm) recoberta por lona de polietileno dupla face (200 µm); DF: lona de polietileno dupla face (200 µm); P: lona de polietileno preta (200 µm); PR+BC: lona de polietileno reciclada preta (200 µm) recoberta por 10 cm de bagaço de cana.

Na Tabela 29 está apresentada a ocorrência de aflatoxina B1 ao longo dos períodos de experimentação.

Nas amostragens realizadas nos meses de julho e agosto (n=16) não foram encontradas presença de aflatoxina B1 nas silagens. No mês de setembro e outubro houve detecção de aflatoxina B1, sendo que em cada mês de amostragem, do total de 8 amostras enviadas para análise, 6 tiveram como resultado a presença de aflatoxina B1, o que gerou ocorrência de 75% da toxina nas amostras.

Tabela 29 - Ocorrência de aflatoxina B1 em silagem de milho ao longo dos períodos de experimentação

Período	Número de amostras		Ocorrência (%)
	Relativa ao período	Positivas	
Julho	8	0	0,00
Agosto	8	0	0,00
Setembro	8	6	75,00
Outubro	8	6	75,00

A partir da detecção da toxina na silagem, verificou-se que a concentração média variou entre os meses de setembro e outubro, considerando-se tanto silagem normal como silagem deteriorada, sendo os valores apresentados na Figura 29.

Figura 29 - Presença de aflatoxina B1 em silagens de milho e precipitação pluviométrica ao longo dos meses de julho a outubro de 2010. (Correlação positiva, $r^2=0,97$ e $P<0,03$)

Houve correlação positiva ($P<0,05$) para o aumento da concentração de aflatoxina B1 com o aumento da precipitação pluviométrica, sendo que no mês de setembro a pluviosidade foi de 162,3 mm e a concentração média de aflatoxina B1 apresentou valor de 1,28 ppb. No mês seguinte a pluviosidade elevou-se para 195,2 mm e a concentração de aflatoxina B1 verificada foi de 2,25 ppb.

A ocorrência de aflatoxina M1 no leite dos animais alimentados com as diferentes silagens está apresentada na Tabela 30.

No mês de julho, das 20 amostras de leite ($n=20$ vacas) não foram observadas amostras positivas para aflatoxina M1. A partir do mês de agosto foi verificada positividade entre as amostras de leite. Nos meses de agosto e setembro foram verificadas ocorrências de 5% das amostras de leite contaminadas com aflatoxina B1, o que representou contaminação de uma ($n=1$) amostra em cada mês. No mês de outubro, 5 amostras apresentaram contaminação, gerando valor de 25% de amostras contaminadas com aflatoxina B1.

Tabela 30 - Ocorrência de aflatoxina M1 no leite de vacas Holandesas ao longo dos períodos de experimentação

Período	Número de amostras		Ocorrência (%)	Concentração média das positivas (ppb)
	Relativa ao período	Positivas		
Julho	20	0	0,0	0,000
Agosto	20	1	5,0	0,0060
Setembro	20	1	5,0	0,0060
Outubro	20	5	25,0	0,0062

A concentração de aflatoxina M1 não apresentou variação ao longo dos meses de amostragem, apresentando valor médio de 0,006 ppb.

Na Tabela 31 está apresentada a ocorrência de aflatoxina M1 no leite dos animais em função do tipo de lona utilizada.

Das 5 amostras positivas observadas no mês de outubro, a contaminação das amostras procedeu-se de todos os tratamentos utilizados.

Tabela 31 - Ocorrência de aflatoxina M1 no leite de vacas Holandesas em relação ao tipo de lona utilizada na vedação dos silos

Tratamentos ¹	Número de amostras	Ocorrência
	positivas	(%)
PA+DF	1	20,0
DF	1	20,0
P	2	40,0
PR+BC	1	20,0

¹PA+DF: lona transparente de poliamida (45 µm) recoberta por lona de polietileno dupla face (200 µm); DF: lona de polietileno dupla face (200 µm); P: lona de polietileno preta (200 µm); PR+BC: lona de polietileno reciclada preta (200 µm) recoberta por 10 cm de bagaço de cana.

A maior ocorrência foi verificada para o tratamento com vedação do silo com lona preta de material virgem. Os demais tratamentos apresentaram contaminação de apenas um amostra, a qual representou em cada tratamento 20% de ocorrência.

5.3.6 Comportamento ingestivo dos animais

O comportamento ingestivo dos animais ao longo de 24 horas de avaliação está apresentado na Figura 30.

O tempo despendido com a atividade de ingestão concentrou-se na parte da manhã das 8 horas até as 10 horas e no período vespertino das 18 horas até as 20 horas. Após esse período observou-se 5 menores picos de consumo ao longo do dia.

Figura 30 - Comportamento ingestivo de vacas em lactação alimentadas com as diferentes silagens

A atividade de ócio ocorreu em maior intensidade entre os períodos de alimentação da manhã e da tarde, ocorrendo os dois maiores picos de intensidade logo após o final da alimentação, momento este representando por 10 horas e 20 horas. A ruminação apresentou maiores picos durante o período noturno. O início da ruminação comparado ao término de cada refeição foi mais prolongado após o término da refeição da manhã, momento em que a temperatura ambiente também se apresentava elevada em relação a temperatura ao longo das 24 horas.

O comportamento ingestivo dos animais em função dos tratamentos experimentais utilizados está apresentado na Tabela 32.

Durante a avaliação (24 horas) não houve diferença ($P>0,05$) na ingestão de matéria seca e fibra insolúvel em detergente neutro, apresentando valores médios de 21,63 e 7,99 kg/dia, respectivamente.

Tabela 32 - Comportamento ingestivo de vacas em lactação alimentadas com as diferentes silagens

Variável ¹	Tratamentos ²				EPM ³	Efeito ⁴
	PA+DF	DF	P	PR+BC		
Consumo						
MS, kg/dia	20,92	22,53	22,05	21,02	0,74	NS
FDN, kg/dia	7,91	8,05	8,10	7,89	0,27	NS
Ingestão						
%/dia	17,85	17,86	18,38	18,00	0,98	NS
min/kg MS	12,56	11,37	12,05	12,46	0,74	NS
min/kg FDN	32,61	31,64	33,64	33,22	1,98	NS
Ruminação						
%/dia	36,75	35,97	38,83	37,50	1,16	NS
min/kg MS	25,68	23,37	25,56	25,92	1,10	NS
min/kg FDN	66,67	64,94	71,44	68,98	2,94	NS
Mastigação						
%/dia	54,59	53,82	57,19	55,50	1,54	NS
min/kg MS	38,24	34,75	37,61	38,40	1,51	NS
min/kg FDN	99,29	96,57	105,08	102,20	3,99	NS
Ócio						
%/dia	45,28	46,19	42,77	44,50	1,54	NS

¹MS: matéria seca; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro; ²PA+DF: lona transparente de poliamida (45 µm) recoberta por lona de polietileno dupla face (200 µm); DF: lona de polietileno dupla face (200 µm); P: lona de polietileno preta (200 µm); PR+BC: lona de polietileno reciclada preta (200 µm) recoberta por 10 cm de bagaço de cana; ³EPM: erro padrão da média; ⁴**P<0,001; *P<0,05; NS: não significativo.

A atividade de ingestão não apresentou diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos, onde se verificou que os animais despenderam 18,02% do seu tempo com essa atividade. A ingestão de matéria seca representou gasto de 12,11 minutos/kg MS consumido ou 32,78 minutos/kg FDN consumido.

O tempo despendido com as atividades de ruminação e mastigação não apresentou diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos, verificando-se participação de 37,26% e 55,28% do período das 24 horas de avaliação, respectivamente.

Não foi verificada diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos para o tempo de ócio dos animais, com valor médio 44,69% do tempo sem haver atividades de ingestão ou ruminação.

A eficiência de ingestão e ruminação dos animais alimentados com as diferentes silagens está apresentada na Tabela 33.

Não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos para a eficiência de ingestão e de ruminação, apresentando valor médio de 5,16 e 2,45 kg MS/hora e, 1,91 e 0,90 kg FDN/hora, respectivamente.

Tabela 33 - Eficiência de ingestão e ruminação de vacas em lactação alimentadas com as diferentes silagens

Variável ¹	Tratamentos ²				EPM ³	Efeito ⁴
	PA+DF	DF	P	PR+BC		
Eficiência de ingestão						
kg MS/hora	5,05	5,58	5,08	4,94	0,33	NS
kg FDN/hora	1,95	2,01	1,82	1,85	0,12	NS
Eficiência de ruminação						
kg MS/hora	2,42	2,62	2,41	2,33	0,10	NS
kg FDN/hora	0,93	0,94	0,86	0,87	0,04	NS

¹MS: matéria seca; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro; ²PA+DF: lona transparente de poliamida (45 µm) recoberta por lona de polietileno dupla face (200 µm); DF: lona de polietileno dupla face (200 µm); P: lona de polietileno preta (200 µm); PR+BC: lona de polietileno reciclada preta (200 µm) recoberta por 10 cm de bagaço de cana; ³EPM: erro padrão da média; ⁴*** $P<0,001$; * $P<0,05$; NS: não significativo.

5.3.7 Digestibilidade *in vivo* das dietas

O consumo dos nutrientes durante o ensaio de digestibilidade das dietas experimentais está apresentado na Tabela 34.

Não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos para o consumo dos nutrientes ao longo dos 3 dias de avaliação das digestibilidade das dietas, apresentando consumo médio de matéria seca de 21,87 kg.

Tabela 34 - Consumo dos nutrientes durante o ensaio de digestibilidade das dietas experimentais

Variável	Tratamentos ¹				EPM ²	Efeito ³
	PA+DF	DF	P	PR+BC		
	Consumo, kg/dia					
Matéria seca	22,25	22,34	21,03	21,84	1,11	NS
Matéria orgânica	20,80	20,89	19,71	20,59	1,05	NS
Proteína bruta	3,74	3,72	3,42	3,64	0,20	NS
Fibra insolúvel em detergente neutro	8,27	8,08	7,40	7,51	0,55	NS
Fibra insolúvel em detergente ácido	3,91	3,68	3,69	3,89	0,26	NS
Extrato etéreo	0,44	0,45	0,50	0,53	0,04	NS
Carboidrato não fibroso	8,43	8,58	8,60	8,71	0,51	NS

¹PA+DF: lona transparente de poliamida (45 µm) recoberta por lona de polietileno dupla face (200 µm); DF: lona de polietileno dupla face (200 µm); P: lona de polietileno preta (200 µm); PR+BC: lona de polietileno reciclada preta (200 µm) recoberta por 10 cm de bagaço de cana; ²EPM: erro padrão da média; ³**P<0,001; *P<0,05; NS: não significativo.

As médias do consumo (kg/dia) de matéria orgânica, proteína bruta, fibra insolúvel em detergente neutro e detergente ácido, extrato etéreo e carboidrato não fibroso foram 20,50; 3,63; 7,82; 3,79; 0,48 e 8,58, respectivamente.

A digestibilidade dos nutrientes no trato digestório total dos animais está apresentada na Tabela 35.

A digestibilidade da matéria seca e da matéria orgânica das dietas apresentou diferença (P<0,05) entre os tratamentos. A dieta que continha silagem proveniente do silo vedado com lona preta de material reciclado e proteção de bagaço apresentou o maior valor de digestibilidade, tanto da matéria seca como da matéria orgânica das dietas. Os menores valores foram observados nos tratamentos que continha silagem dos silos vedados com a lona dupla face e lona preta de material virgem. O tratamento com lona de poliamida sobreposta por lona dupla face apresentou valor intermediário, entre os demais tratamentos.

Tabela 35 - Digestibilidade dos nutrientes no trato digestório total de vacas em lactação consumindo dietas com as diferentes silagens

Variável	Tratamentos ¹				EPM ²	Efeito ³
	PA+DF	DF	P	PR+BC		
	Digestibilidade, %					
Matéria seca	64,98 ^{ab}	58,94 ^b	59,24 ^b	67,48 ^a	1,64	*
Matéria orgânica	72,86 ^{ab}	67,84 ^b	69,31 ^b	74,10 ^a	1,49	*
Proteína bruta	69,51	65,46	66,60	74,14	2,27	NS
Fibra insolúvel em detergente neutro	49,50	40,15	38,22	47,00	3,78	NS
Fibra insolúvel em detergente ácido	40,59	27,40	29,16	41,79	4,52	NS
Extrato etéreo	78,64	73,05	80,91	82,54	2,69	NS
Carboidrato não fibroso	97,26	93,25	96,29	94,59	2,06	NS

¹PA+DF: lona transparente de poliamida (45 µm) recoberta por lona de polietileno dupla face (200 µm); DF: lona de polietileno dupla face (200 µm); P: lona de polietileno preta (200 µm); PR+BC: lona de polietileno reciclada preta (200 µm) recoberta por 10 cm de bagaço de cana; ²EPM: erro padrão da média; ³***P<0,001; *P<0,05; NS: não significativo.

Para as demais variáveis não foram verificadas diferenças (P>0,05) entre os tratamentos, apresentando as dietas valores médios de digestibilidade de 68,93% para a proteína bruta, 43,72% para fibra insolúvel em detergente neutro, 34,74% para fibra insolúvel em detergente ácido, 78,79% para extrato etéreo e 95,35% para carbaidrato não fibroso.

5.4 Discussão

5.4.1 Características da forragem no momento da ensilagem

A recomendação do ponto ideal de colheita das plantas de milho para ensilagem aponta para o estágio compreendido entre 32 e 35% de matéria seca (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991), valor que se enquadra aos obtidos no presente estudo.

O valor de fibra insolúvel em detergente neutro foi de 53,39%, o que condiz com o encontrado por Filya (2004), onde em plantas de milho com 35,8% de matéria seca, este autor observou teor de FDN de 48,4%.

Em estudo de avaliação de cultivares de milho para a produção de silagem, colhidos quando o grão apresentava-se entre o estádio de 1/3 e 2/3 da linha do leite, Antoniali et al. (2003) encontraram teor de amido na planta de 17,4%. No presente experimento, o valor médio para esta variável foi de 21,21%, superior 8,8 unidades percentuais, em relação aos autores mencionados.

Bal, Coors e Shaver (1997) observaram teor médio de 7,1% de proteína bruta quando a planta atingiu 2/3 da linha do leite. O teor de proteína bruta observada no presente experimento esta coerente com os autores, onde verificou-se valor médio de 6,63%.

Russell et al. (1992) observaram variações na DVIVMS da planta em híbridos de milho colhidos entre 34,8 e 51,4% de MS. Para estes materiais, a DVIVMS ficou entre 71,9 e 73,1%. Estes valores estão acima dos encontrados no presente estudo, verificando valor médio de 63,57%.

5.4.1 Avaliações na silagem no armazenamento e descarregamento dos silos

Durante o período de fermentação a evolução das temperaturas das silagens foi semelhante até o sétimo dia após o fechamento dos silos, apresentando os tratamentos com temperaturas bastante elevadas. Após este período, verificou-se queda em seus valores, a qual no 31º dia após o fechamento se estabilizou nos tratamentos. Entretanto, nitidamente foi observada que as temperaturas apresentaram diferenças ao longo do restante do período de armazenamento.

Segundo Sprague (1974), citado por Woolford (1990), no início do processo de fermentação da silagem, o O₂ presente na massa é consumido rapidamente pelo processo de respiração celular e pela microbiota (microrganismos aeróbios facultativos). Dessa forma, a elevada atividade microbiana e enzimática da forragem no início do processo pode explicar as elevadas temperaturas verificadas nos tratamentos, sendo que essas se prolongaram até o sétimo, provavelmente dia em função de o silo ser fechado após três do início das atividades.

Pelo fato do silo não ser ambiente hermético, durante o período de armazenamento o ar penetra no seu interior (MUCK; MOSER; PITT, 2003), principalmente no topo e nas zonas laterais em contato com a parede (BOLSEN et al.,

1993). Assim, passada a primeira fase descrita anteriormente, as diferenças observadas entre as temperaturas ao longo do armazenamento, possivelmente podem estar relacionadas com o tipo de filme plástico utilizado para cada tratamento, em função de sua permeabilidade ao oxigênio, coloração, inter-relação permeabilidade vs coloração e cobertura sobre a lona.

Com relação às características fermentativas das silagens não foram observadas diferenças entre os tratamentos. Alterações nestas características eram esperadas, sendo que as colorações das silagens, visualmente denotavam diferenças na qualidade, a qual influenciou as características de produção animal que serão abordadas nos itens 5.4.3 até o 5.4.6. Provavelmente, o número de repetições utilizadas ($n=4$) e a possível variabilidade entre as amostragens podem ter afetado as comparações estatísticas.

Com relação aos locais de amostragem, foi verificada que nas regiões do centro e topo, as concentrações de carboidratos solúveis foram maiores do que a região do topo lateral. Já para o teor de ácido acético, as regiões do topo e topo lateral apresentaram-se com maiores valores em relação ao centro dos silos. Provavelmente, a região do topo apresentou valores de densidade inferiores a região do centro dos silos, bem como maior atividade de microrganismos aeróbios, o que deteriorou a silagem com maior intensidade.

A maior atividade microbiana na região superior do silo foi observada com diferença estatística apenas para a contagem de leveduras, o que se relaciona estreitamente com a redução da concentração de carboidratos solúveis na região do topo lateral dos silos.

Provavelmente, a não significância das variáveis bactérias ácido lácticas, bactérias aeróbias, leveduras e fungos filamentosos em função dos tratamentos podem estar relacionadas com o manejo adequado do painel dos silos. Borreani; Tabacco e Cavallarin (2007) avaliaram silagens de milho provenientes de duas propriedades com manejos distintos de retirada de silagem, onde observaram que o silo com maior taxa de retirada (33 vs 19 cm), apresentou maior valor nutritivo e menores contagens de fungos, com destaque para as leveduras. Segundo Berger e Bolsen (2006), a presença de oxigênio ativa o crescimento de vários microrganismos aeróbios, os quais resultam

em oxidação da massa, deteriorando o alimento. Com relação aos locais de amostragens, os demais microrganismos que não apresentaram diferenças entre as regiões, provavelmente não tiveram possibilidade de crescimento em função da retirada diária do painel.

Com relação a avaliação da temperatura no painel do silo (Figura 22) pode se observar que entre os tratamentos as diferenças foram observadas nas regiões de topo e topo lateral, tendo a coloração de lona de preta (material virgem ou reciclado) apresentando os maiores valores de temperatura. Este fato pode estar relacionado com a elevada absorção de calor da cor preta, a qual tende elevar a temperatura do filme plástico e consequentemente da silagem. Nos centros dos silos não ocorreu a mesma observação, tendo suas temperaturas inalteradas estatisticamente.

Durante as 14 semanas de retirada de silagem foi verificado maior descarte das silagens (% matéria verde) provenientes dos tratamentos que tiveram sua vedação realizada com o filme de polietileno de coloração preta e do filme de polietileno de dupla face com relação aos demais tratamentos. Quando referenciado em porcentagem de matéria seca, a lona preta de material virgem apresentou maior descarte, seguido da lona dupla e posteriormente dos demais tratamentos. Provavelmente, o filme de poliamida e a cobertura com bagaço de cana auxiliaram para redução das perdas durante o processo de armazenamento das silagens.

Quando se compara a quantidade de matéria mineral da silagem deteriorada em proporção à matéria mineral total da silagem (soma deteriorada e normal), verificou-se que os filmes que apresentaram os menores valores de silagem descartada, foram os que apresentaram menores relações entre a matéria mineral do topo com a total. Provavelmente, as menores relações para o tratamento que utilizou o filme de poliamida sobreposta com lona de polietileno dupla face e o tratamento de lona preta com cobertura de bagaço apresentaram menor deterioração aeróbia, o que traduziu em menores quantidades de matéria orgânica deteriorada para estes tratamentos.

BOLSEN (1997) relatou que a concentração de cinzas pode se elevar quando ocorrem perdas de MS, pois há consumo de matéria orgânica pelos microrganismos. Porém, segundo este mesmo autor este fato só pode ser observado quando a deterioração aeróbia é intensa. Contrariamente ao autor, as perdas de matéria orgânica

do presente experimento não apresentaram diferença entre os tratamentos, apresentando valor médio de 29,98%. A diferença entre os tratamentos para essa variável era esperada, visto que as proporções de matéria mineral entre os tratamentos apresentou significância.

Tanto entre os tratamentos como para os locais de amostragem, as variáveis referentes ao valor nutritivo das silagens não apresentaram diferença, exceto para a digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca em relação aos locais de amostragem. A digestibilidade foi superior para a silagem proveniente do centro dos silos, com valores inferiores para as regiões do topo. Provavelmente, a maior digestibilidade é reflexo da menor deterioração aeróbia nesta região do silo, a qual pode ser verificada pela maior concentração de carboidratos solúveis e menores contagens de leveduras. Entretanto, variações significativas nos teores de fibra também eram esperadas, como redução na proporcionalidade para o centro do silo.

5.4.2 Propriedades físicas dos filmes plásticos

As espessuras dos filmes plásticos apresentaram diferenças estatísticas, mostrando maior espessura para o filme preto de material virgem, seguido dos filmes preto de material reciclado e dupla face e finalmente o filme de poliamida. É interessante destacar que apenas o filme de poliamida apresentou espessura superior ao indicado no rótulo da embalagem, os demais filmes de polietileno de fabricação nacional apresentaram valores abaixo dos indicados em seus rótulos (200 µm).

As propriedades físicas dos filmes plásticos compreendem a resposta destes materiais às influências mecânicas externas, manifestadas pela capacidade de desenvolverem deformações reversíveis e irreversíveis e, resistirem à fratura (ASTM, 2010). Com relação ao filme de polietileno preto de material reciclado pouco pode ser afirmado com relação a estas propriedades, visto que este tipo de material apresenta elevada variabilidade em sua composição, pois sua confecção é realizada a partir de restos de materiais provenientes de outras produções.

No presente experimento, este material pode ser considerado como de qualidade satisfatória, com relação às suas propriedades de resistência a propagação do rasgo, resistência a perfuração e alongamento na ruptura. Com relação ao filme de poliamida

verificou-se baixa resistência a propagação do rasgo, entretanto, o mesmo filme apresentou elevada resistência a perfuração.

As amostragens dos filmes ao longo do experimento mostraram que a resistência a perfuração e o alongamento na ruptura foram reduzidas com o passar do tempo. Provavelmente, esta redução pode estar relacionada com a incidência de raios solares sobre os filmes, os quais são degradados, perdendo parcialmente a proteção contra os raios ultravioletas.

Quando se realiza comparação entre os atributos de qualidade da silagem com propriedades físicas dos plásticos, poucas conclusões podem ser tiradas, entretanto, a comparação com valores de permeabilidade da lona ao oxigênio permite incrementar a discussão dos dados. Verificou-se que para o filme de poliamida, apesar de sua baixa espessura, a permeabilidade ao oxigênio foi a menor verificada entre os filmes. Para o polímero polietileno (demais filmes plásticos) verificou-se que o filme de material reciclado apresentou menor permeabilidade entre os filmes, preto de material virgem e dupla face. Provavelmente, a constituição do filme de material reciclado apresentou constituições diferentes que permitiram o abaixamento da permeabilidade ao oxigênio.

Na comparação entre as diferentes temperaturas de determinação da permeabilidade da lona ao oxigênio, verificou-se que a elevação da temperatura modificou estatisticamente os valores de permeabilidade para os filmes confeccionados com polietileno. O polímero de poliamida se mostrou estável com a elevação da temperatura. Esse dado se torna interessante para condições tropicais, onde as temperaturas verificadas são extremamente elevadas e por essa variável ser fortemente relacionado com deterioração da silagem, como foi demonstrado com os valores de descarte de silagem e proporção de matéria mineral na região deteriorada em relação ao total (Tabela 18).

Snell et al. (2003) reportaram que a espessura de filmes de polietileno não apresentaram influência no valor nutritivo das silagens. Com relação a permeabilidade da lona ao oxigênio, o mesmo autor comenta que na Alemanha, o governo exige que o filme plástico apresente valores inferiores a $250 \text{ cm}^3/\text{m}^2/\text{dia}$. Ashbell et al. (2002) avaliando silagens de milho e trigo vedadas com lonas variando de 42 a $288 \text{ cm}^3/\text{m}^2/\text{dia}$

na permeabilidade ao oxigênio não verificaram diferenças no valor nutritivo e nas características microbiológicas das silagens.

5.4.3 Desempenho animal

O peso, o escore de condição corporal, bem como o consumo dos nutrientes não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos. Os valores de consumo estão de acordo com os preconizados pelo NRC (2001) para o nível de produção dos animais. Ao longo do período de experimentação o consumo de matéria seca apresentou variações de até 2 kg de matéria seca. Provavelmente, essa ocorrência pode ser em função de condições ambientais verificadas ao longo do experimento, como por exemplo, alterações no teor de matéria seca das silagens em dias de chuva, ou dias muito secos. Por outro lado, o estágio da lactação dos animais ao longo do experimento foi avançando, o que tornou a produção de leite inferior ao início do experimento. Entretanto, a redução no consumo não seguiu linearidade negativa, apresentando momentos de alta e baixa no decorrer das semanas experimentais.

Com relação aos valores de dieta fornecida e dieta consumida, a constatação de diferença estatística entre os tratamentos para o teor de proteína bruta e fibra insolúvel em detergente neutro na dieta consumida não influenciou o consumo entre os tratamentos, apenas trouxe a ideia que as sobras dos cochos apresentaram maior proporção de volumoso, o que mostra pelo aumento no teor de proteína bruta consumida e redução nos teores de fibra insolúvel em detergente neutro. Ao longo das semanas, a maior variação nos teores dos nutrientes foi representada pela fibra insolúvel em detergente neutro, a qual apresentou elevada variação na quarta semana de experimentação, as demais variáveis apresentaram valores muito constantes.

A produção de leite dos animais apresentou diferença estatística, tendo o tratamento com o filme preto de material reciclado com cobertura por bagaço apresentado a maior produção dos animais. O tratamento com filme preto de material virgem apresentou a menor média de produção dos animais. Os demais tratamentos apresentaram valores intermediários.

Raramente em experimentos com volumosos, principalmente os relacionados com conservação de forragens é verificada diferença em desempenho animal.

Geralmente, o grande benefício das tecnologias empregadas, como por exemplo, o uso de aditivos auxilia em redução de perdas de matéria seca. Até o presente momento, não se conhece na literatura trabalhos utilizando diferentes lonas de cobertura inferindo diretamente a resposta animal. No presente trabalho, a diferença na resposta de produção de leite dos animais pode estar relacionada com a qualidade nutricional da silagem obtida, mesmo não havendo diferenças no consumo de matéria seca, como no valor nutritivo das silagens. Porém, verificou-se que os valores de digestibilidade das dietas (Tabela 34) apresentaram diferenças estatísticas, o que pode estar relacionado nas diferenças observadas à produção de leite dos animais.

Ao longo das semanas de lactação verificou-se que a produção de leite decresceu, mantendo as proporções entre os tratamentos (valores superiores para filme preto com coberto com bagaço, inferiores para filme preto de material virgem e intermediário para os demais tratamentos. Para a produção de leite corrigida para 4% de gordura foi verificado que o distanciamento apresentado para produção de leite foi modificado, sendo que apenas o tratamento com filme preto de material reciclado com coberta de bagaço se despontou em relação aos outros três tratamentos.

Com relação à produção dos constituintes, a produção de lactose acompanhou a produção de leite entre os tratamentos. Entretanto, o teor dessa variável não foi afetada entre os tratamentos. A similaridade para as concentrações de lactose no leite entre os tratamentos já era esperada, visto que este constituinte apresenta pouca possibilidade de sofrer alterações em relação aos aspectos nutricionais da dieta (FREDEEN, 1996), sendo responsável pela manutenção da osmolaridade nos processos de formação e secreção do leite. Dessa forma, a quantidade de água do leite e, conseqüentemente, o volume de leite produzido, depende da quantidade de lactose secretada na glândula mamária.

O teor de gordura e proteína no leite apresentou elevação com o avançar das semanas experimentais. Segundo Ploumi, Belibasaki e Triantaphyllidis (1998) os teores de gordura tendem a apresentar relação inversa com a produção de leite, com menores concentrações de gordura e sólidos totais encontrados próximos ao pico de produção de leite. No presente experimento foi verificada queda na produção de leite com o passar das semanas experimentais.

Apesar da produção de proteína não ter apresentado diferença entre os tratamentos, foi observada diferença para os percentuais dessa variável, onde o maior teor foi observado para a dieta proveniente do tratamento com lona preta de material virgem. Segundo Huhtanen et al. (2003), vacas recebendo silagens que sofreram intenso processo de proteólise, apresentaram redução no teor de proteína no leite, o que pode ser justificado pela redução da síntese de proteína microbiana. Ainda, Fredeen (1996) sugeriu que o baixo consumo de matéria seca e o desequilíbrio na ingestão de proteína na dieta possam ser as causas das alterações no teor de proteína do leite. Possivelmente, as explicações acima não se enquadram no presente experimento. Possivelmente, a explicação para o acontecimento pode estar relacionado com o volume de leite produzido, visto que a produção dos constituintes permaneceu sem diferença entre os tratamentos.

Não houve diferença para os valores de contagem de células somáticas e para o nitrogênio uréico no leite. O nitrogênio uréico no leite é uma das vias de excreção do nitrogênio em excesso do organismo animal e sua concentração no leite é indicativo de excesso ou inadequado uso da proteína da dieta (GUSTAFSSON; PALMQUIST, 1993). Os valores obtidos no presente estão dentro da amplitude de 8,5 a 16 mg/dL (KOHN et al., 2002).

5.4.4 Ocorrência de aflatoxinas na dieta e no leite

A presença de aflatoxinas foi observada tanto na silagem deteriorada como na silagem normal, entretanto, a concentração foi maior nas silagens deterioradas. Esse comportamento era esperada em função de na região superior do silo o processo de deterioração ter maior atuação, visto a maior proximidade com o ambiente externo. Porém, os valores observados para o presente experimento estão abaixo dos valores permitidos para alimentos destinados a alimentação animal. Segundo MAPA (1988), os alimentos destinados a alimentação animal não devem ultrapassar valor de 50 ppb de aflatoxinas.

A ocorrência de contaminação das amostras de silagens, apenas foi verificada a partir do mês de setembro. Provavelmente, a baixa ocorrência e baixo valor da toxina podem estar relacionados com o tipo de híbrido utilizado, o híbrido Bt, o qual pode ter

preservado a integridade da planta por menor quantidade de ataques de insetos e com conseqüente redução na população de fungos, principalmente do gênero *Fusarium* (HAMMOND et al., 2004), o que posteriormente impediu o aumento da competição entre gêneros de fungos e, conseqüentemente a produção de aflatoxinas por fungos do gênero *Aspegillus*.

O aumento da concentração da micotoxina correlacionada com aumento da precipitação volumétrica pode ser relacionada com o aumento da umidade relativa do ar, a qual possibilitou aumento no desenvolvimento de microrganismos aeróbios e produção da toxina. Segundo Rankin e Grau (2002), a competição por nutrientes na planta se estabelece entre a própria planta e outros microrganismos, e nesta ocasião, os fungos presentes produzem micotoxinas como forma de obter vantagens na competição por alimento.

As aflatoxinas representam as micotoxinas que mais causam preocupação, pois apresentam propriedades carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas, causando grandes danos à saúde humana e elevados prejuízos econômicos no desempenho de animais domésticos, como os ruminantes (LAZZARI, 1997). A aflatoxina B1 (AFB1) é considerada uma das mais tóxicas produzidas por estas espécies. No fígado a AFB1 é biotransformada à aflatoxina M1 (AFM1), a qual é excretada no leite de animais em lactação (BATTACONE et al., 2005).

No presente estudo verificou-se presença desta micotoxina no leite dos animais, entretanto, os valores observados foram abaixo do limite mínimo permitido pela Comunidade Européia, e a quantificação desta toxina foi verificada no mês de agosto, até o final do experimento, tendo sua ocorrência com maior participação para o tratamento que recebeu o filme preto de material virgem na vedação. É importante salientar que como foi verificada presença desta toxina no leite durante o mês de agosto, na quantificação da toxina na silagem ou nos ingredientes concentrados, o limite de detecção não possibilitou a quantificação da mesma, em função desta apresentar valores muito baixos.

5.4.5 Comportamento ingestivo dos animais

O comportamento ingestivo dos animais não apresentou diferença estatística entre os tratamentos. Esse comportamento era esperado em função das dietas apresentarem semelhança nos teores dos nutrientes, principalmente no teor de fibra insolúvel em detergente neutro, e também o tamanho de partícula da forragem, bem como da dieta foram semelhantes, não apresentando discrepância entre os mesmos.

Schwab et al. (2002) alimentaram vacas em lactação com silagem de milho contendo diferentes tamanhos de partículas e observaram redução no consumo de matéria seca com o aumento do tamanho de partículas da forragem. Segundo Grant (1997), o tempo de mastigação decresce com a redução do tamanho de partícula e da concentração de FDN da ração. Dessa forma, o presente experimento não apresentou na avaliação do comportamento ingestivo diferenças no consumo de matéria, e assim, não verificando as ocorrências citadas pelos autores acima.

5.4.6 Digestibilidade *in vivo* das dietas

Os valores referentes a digestibilidade da matéria seca e da matéria orgânica apresentaram diferenças entre os tratamentos, e a partir desses valores é que pode ser explicada o aumento na produção de leite dos animais do tratamento que teve o silo vedado com lona preta de material reciclado coberta com bagaço. Com a menor deterioração da silagem, o que foi verificado pela redução da quantidade de silagem deteriorada descartada.

BOLSEN (1997) relatou que a concentração de cinzas pode se elevar quando ocorrem perdas de MS, pois há consumo de matéria orgânica pelos microrganismos. Porém, segundo este mesmo autor este fato só pode ser observado quando a deterioração aeróbia é intensa. Provavelmente, o consumo de matéria orgânica por parte dos microrganismos aeróbios resultou nas diferenças encontradas para a digestibilidade. Outro fator que está relacionado diretamente com a deterioração da silagem é qualidade da fibra presente no alimento. A digestibilidade da fibra em detergente neutro apesar de não significativo, pode ter auxiliado para obtenção das maiores digestibilidades nos tratamentos que apresentaram as silagens melhores preservadas.

5.5 Conclusões

O polímero de poliamida e a proteção da lona auxiliaram para redução do descarte de silagens.

A proteção sobre a lona com bagaço de cana foi efetiva para o controle de perdas e maximizou o desempenho animal.

O filme de coloração preta não é recomendado para vedação de silos, visto suas chances de contaminação da silagem com micotoxinas e a drástica redução na produção de leite dos animais.

A permeabilidade da lona ao oxigênio pode ser utilizada como parâmetro para relacionar com a deterioração aeróbia na camada superior do silo.

6 CONCLUSÕES GERAIS

O polímero de poliamida, a proteção da lona com terra ou bagaço e o uso de aditivos como *Lactobacillus buchneri* ou benzoato de sódio reduzem a deterioração aeróbia de silagens de milho.

A proteção da silagem contra o aquecimento, pelo uso da poliamida ou da proteção com bagaço, auxilia na obtenção de silagem de melhor qualidade e facilita o manejo pela redução da mão-de-obra no descarte de silagem deteriorada.

O desempenho animal é afetado pela estratégia de vedação utilizada, podendo até mesmo afetar qualidade higiênica do leite produzido.

Referências

- ANTONIALI, M.; REIS, R.A.; MOREIRA, A.L.; SIMILI, F.F.; MARCELINO, H.A.B. Avaliação de cultivares de milho (*Zea mays* L.) para a produção de silagem: produção de matéria seca e análise morfológica. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...**Santa Maria:SBZ, 2003. 1 CD-ROM
- ASHBELL, G.; WEINBERG, Z.G.; HEN, Y. FILYA, I. The effects of temperature on the aerobic stability of wheat and corn silages. **Journal Industrial Microbiology e Biotechnology**, Waukengan, v. 28, p. 261-263, 2002.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington, 1990. v. 1, 1117 p.
- ASTM. American **Society for Testing and Materials, Philadelphia**. 2010. Disponível em: <<http://www.astm.org/>>. Acesso em: 03 jul. 2011.
- BAL, M.A.; COORS, J.G.; SHAVER, R.D. Impact of maturity of corn for use as silage in the diets of dairy cows on intake, digestion and milk production. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.80, n.10, p.2497-2503, 1997.
- BATTACONE, G.; NUDDA, A.; PALOMBA, M.; PASCALE, M.; NICOLUSSI, P.; PULINA, G. Transfer of aflatoxin B1 from feed to Milk and from Milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.88, p. 3063-3069, 2005.
- BERGER, L. L.; BOLSEN, K.K.**Sealing strategies for bunker silos and drive-over piles**. 2006. Disponível em:

http://www.ksre.ksu.edu/pr_silage/publications/NRAES%20Berger%20&%20Bolsen%20Sealing%20Strategies%204-14-06.pdf>. Acesso em: 03 jul. 2011.

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.

BOLSEN, K. K.; DICKERSON, J.T.; BRENT, B.E. Rate and extent of top spoilage in horizontal silos. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 2940-2962, 1993.

BOLSEN, K.K. Issues of top spoilage losses in horizontal silos. In: Silage: Field to the feedbunk, 1., 1997. Hershey, 2003. **Proceedings...** Hershey: NRAES, 1997. p.251-304.

BORREANI, G.; TABACCO, E.; CAVALLARIN L. A new oxygen barrier film reduces aerobic deterioration in farm-scale corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 4701-4706, 2007.

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.

DA SILVA, J.R.M. **Desempenho e eficiência alimentar de vacas leiteiras suplementadas com uma combinação homeopática**. 2009. 102 p. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

DICKERSON, J.T.; ASHBELL, G.; BOLSEN, K.K.; BRENT, B.E.; PFAFF, L.; NIWA, Y. Top spoilage in horizontal silos in western Kansas. **Kansas Agricultural Experimental Station**, Manhattan v.1, p.71-74, 1992.

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

FILYA, I. Nutritive value and aerobic stability of whole crop maize silage harvested at four stages of maturity. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.116, p.141-150, 2004.

FREDEEN, A.H. Considerations in the nutritional modification of Milk composition. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 59, p. 185-197, 1996.

GRANT, R.J. Interactions among forages and nonforage fiber sources. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 80, n. 7, p. 1438-1446, 1997.

GUSTAFSSON, A.H.; PALMQUIST, D.L. Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea and milk urea in dairy cows at high and low yields. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 2, p. 475-484, 1993.

HAMMOND, B.G.; CAMPBELL, K.W.; PILCHER, C.D.; DEGOOVER, T.A.; ROBINSON, A.E.; McMILLEN, B.L.; SPANGLER, S.M.; RIORDAN, S.G.; RICE, L.G.; RICHARD, J.L. Lower fumosin mycotoxin levels in the grain of Bt corn grow in the United States in 2000-2002. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 52, p. 1390-1397, 2004.

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.

HUHTANEN, P.; NOUSIAINEN, J.I.; KHALILI, H.; JAAKKOLA, S.; HEIKKILÄ, T. Relationships between silage fermentation characteristics and milk production parameters: analyses of literature data. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 81, p. 57-73, 2003.

KOHN, R.A.; KALSCHER, K.F.; RUSSEK-COHEN, E. Evaluation of models to estimate urinary and expected milk urea nitrogen. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.85, p. 227-233, 2002.

LAMMERS, B.P.; BUCKMASTER, D.R.; HEINRICHS, E.J. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 5, p. 922-928, 1996.

LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2.ed Curitiba:Paranaset, 1997. 134p.

MARI, L.J.; NSSIO, L.G. **O método Penn State Particle Size Separator para a predição do tamanho de partículas de silagens**. 2002. Disponível em: <<http://www.beefpoit.com.br/bn/radarestecnicos>>. Acesso em: 03 jul. 2011.

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

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Portaria MA/SNAD/SFA No. 07, de 09/11/88 - publicada no Diário Oficial da União de 09 de novembro de 1988 - Seção I, página 21.968, 1988**. Disponível em: < <http://www.micotoxinas.com.br/legisla.html>>. Acesso em: 04 ago. 2011.

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

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7thed. Washington: National Academic Press, 2001. 408 p.

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

PLOUMI, K.; BELIBASAKI, S.; TRIANTAPHYLLIDIS, G. Some factors affecting daily milk yield and composition in a flock of Chios ewes. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 28, n. 1, p. 89-92, 1998.

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

RANKIN, M.; GRAU, C. Agronomic considerations for molds and mycotoxins in corn silage. **Focus on Forage**, Madison, v.4, n.1, p.1-4, 2002.

RUPPEL, K.A.; PITT, R.E.; CHASE, L.E., et al. Bunker silo management and its relationship to forage preservation on dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, p. 141-1453, 1995.

RUSSELL, J.R.; IRLBECK, N.A.; HALLAUER, A.R.; BUXTON, D.R. Nutritive value and ensiling characteristics of maize herbage as influenced by agronomic factors. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.38, p.11-24, 1992.

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

SNELL H.G.J; OBERNDORFER. C.; LUCKE, W.; VAN DEN WEGHE, H.F.A. Effects of polyethylene colour and thickness on grass silage quality. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 58, p. 239-248, 2003.

SOARES, L.M.V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxin, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian food by using multitoxin thin-layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 72, p. 22-36, 1989.

STATISTICAL ANALYSIS SYTEM. **SAS User's guide**: statistics. version 9.1.3. Cary, 2003. 965 p.

TUINSTRA, L.G.M.; ROOS, A.H.; TRIJP, J.M.P. Liquid chromatographic determination of aflatoxin M1 in milk powder using immunoaffinity columns for cleanup: interlaboratory study. **Food Biological Contaminants**, New York, v. 76, n. 6, p. 1248-1254, 1993.

VELDMAN, A.; MEIJS, J.A.C.; BORGGREVE, G.J.; HEERESVAN DER TOL, J.J Carry-over of aflatoxin from cows food to milk. **Animal Production**, Washington, v.55, p.163-168, 1992.

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

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