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

A fermentação de grãos de milho reidratados influenciada pela aplicação de aditivos: aspectos da conservação e do valor nutritivo para vacas leiteiras

Greiciele de Moraes

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

**Piracicaba
2016**

Greiciele de Moraes
Zootecnista

**A fermentação de grãos de milho reidratados influenciada pela aplicação de aditivos:
aspectos da conservação e do valor nutritivo para vacas leiteiras**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

**Piracicaba
2016**

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

Morais, Greiciele de

A fermentação de grãos de milho reidratados influenciada pela aplicação de aditivos: aspectos da conservação e do valor nutritivo para vacas leiteiras / Greiciele de Moraes. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016. 111 p. : il.

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

1. Grãos de milho reconstituídos 2. Grãos fermentados 3. Silagem de grão úmido de milho 4. Aditivos microbianos 5. Aditivos químicos I. Título

CDD 636.234
M827f

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

Maria Cecília,

o maior amor que eu já pude experimentar,

imensurável fonte de força da mamãe.

Cris,

amado companheiro.

Juntos, sempre nos surpreendemos com o que podemos construir.

DEDICO

Aos meus pais, Geraldo e Maria da Conceição, lá na roça...

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos (Processo 2012/15.505-8). À CAPES, pela bolsa de estudos.

Aos professores do curso de pós-graduação em Ciência Animal e Pastagens do Departamento de Zootecnia pelos ensinamentos e exemplo de dedicação ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Gustavo Nussio, meu orientador e amigo. Profissionalmente, por me inspirar para a prática da docência com amor e afinho e, pessoalmente, por mudar meu censo de limitações e possibilidades, modificando meu julgo sobre o que dá ou não para ser feito.

Aos companheiros de QCF. A convivência e o exemplo de cada um que passou pelo Grupo constituíram a maior riqueza desses anos de treinamento. Agradeço especialmente à Letícia, Juliana, Bleine, Daniel e Pedro, pelo acompanhamento e amizade. Ao Prof. e colega João Luiz, pelo exemplo de entrega ao Grupo e de busca constante pela qualidade no trabalho.

Aos contemporâneos de experimento no campo. Sou grata pelo convívio e empenho de cada um.

Agradeço às amigas de infância: Juliana, Joice e Jana. Aos amigos de graduação: Bruna, João Paulo e Fabrício. Às amigas de mestrado: Amandas e Ju. Nós sabemos que vocês fizeram parte de tudo, mesmo que a distância. Obrigada pela ajuda e pelo carinho.

Ao técnico de laboratório e amigo, Carlos César. Agradeço pela ajuda e pelas risadas.

Agradeço à minha família (pai, mãe, irmãos, cunhadas, sobrinhos lindos, tios e primos). O amor e o apoio de vocês me sustentam.

Em especial ao meu amado Cris, por dividir este trabalho comigo. Nossa parceria é de vida. Agradeço com muito amor à nossa vida, Maria Cecília. Filhos são a maior fonte de motivação e alegria que existe.

A Deus, meu amigo mais próximo, obrigada por permitir que eu chegasse até aqui.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 A ensilagem de grãos úmidos de milho	21
2.2 Modos de ação e uso de aditivos para silagens de grãos úmidos	23
2.2.1 Bactérias do gênero <i>Lactobacillus</i>	25
2.2.1.1 <i>Lactobacillus buchneri</i>	26
2.2.1.2 <i>Lactobacillus plantarum</i> e bactérias homoláticas.....	30
2.2.1.3 Combinações de microrganismos	32
2.2.2 Aditivos químicos	34
2.2.2.1 Benzoato de sódio	34
2.2.2.2 Nitrito de sódio	36
2.2.2.3 Respostas a aditivos químicos em silagens de grãos úmidos de milho	39
2.3 Implicações fisiológicas do aumento da disponibilidade do amido para ruminantes.....	41
2.3.1 Desempenho de vacas leiteiras alimentadas com silagens de grãos úmidos	46
REFERÊNCIAS.....	48
3 FERMENTAÇÃO E ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGENS DE GRÃOS DE MILHO REIDRATADOS, TRATADAS COM ADITIVOS	61
Resumo	61
Abstract.....	61
3.1 Introdução	63
3.2 Material e Métodos	63
3.2.1 Confeção das silagens experimentais.....	63

3.2.2 Composição química e atributos fermentativos	65
3.2.3 Estabilidade aeróbia	68
3.2.4 Degradabilidade <i>in situ</i> das silagens	68
3.2.5 Análise estatística	70
3.3 Resultados e Discussão	70
3.3.1 Variações do pH	70
3.3.2 Respostas aos aditivos: da fermentação ao pós-abertura	72
3.4 Conclusões	81
Referências	82
4 ENSILAGEM DE GRÃOS DE MILHO REIDRATADOS ADITIVADAS OU NÃO COM BENZOATO DE SÓDIO PARA VACAS LEITEIRAS	85
Resumo	85
Abstract	85
4.1 Introdução	87
4.2 Material e Métodos	88
4.2.1 Confeção das silagens para alimentação animal	88
4.2.2 Animais, manejo e composição das rações	90
4.2.3 Análise dos alimentos	93
4.2.3.1 Silagens: fermentação e estabilidade aeróbia	93
4.2.3.1 Análises bromatológicas e tamanho de partículas	94
4.2.4 Desempenho: consumo de alimentos, produção e composição do leite	95
4.2.5 Comportamento ingestivo, digestibilidade e outras medidas nos animais	96
4.2.6 Degradabilidade ruminal <i>in situ</i> de grãos secos e silagens de grãos de milho	98
4.2.7 Análise estatística	99
4.3 Resultados e Discussão	99
4.4 Conclusões	107
Referências	108

RESUMO

A fermentação de grãos de milho reidratados influenciada pela aplicação de aditivos: aspectos da conservação e do valor nutritivo para vacas leiteiras

A ensilagem de grãos de milho reidratados é uma estratégia de armazenamento vantajosa, economicamente viável e que melhora a digestibilidade do amido. Este estudo foi dividido em dois experimentos - **Experimento 1:** Utilização de aditivos químicos e microbianos sobre aspectos fermentativos e estabilidade aeróbia de silagens de milho reidratado. Os tratamentos consistiram em silagens de milho tratadas com *Lactobacillus buchneri* (LB - 5×10^5 ufc/g da matéria natural); Bactérias homoláticas (Homo - 5×10^5 ufc/g MN); *Lactobacillus buchneri* + homoláticas (Combo - 1×10^6 ufc/g MN); *Lactobacillus buchneri* + nitrito de sódio (LB - 5×10^5 ufc/g MN + 1,5 g/kg MN de nitrito) e benzoato de sódio (Benz - 2,0 g/kg MN). Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com 6 tratamentos e 4 repetições. **Experimento 2:** Utilização de silagem de grãos de milho reidratados com ou sem a adição de benzoato de sódio sobre a digestibilidade e desempenho de vacas leiteiras. Foram utilizadas 18 vacas Holandês, alocadas em três quadrados latinos para avaliação dos tratamentos: Controle (silagem de milho reidratado); Benz (silagem de milho reidratado + benzoato de sódio - 2,0 g/kg MN) e MiS (milho seco moído). Em todas as dietas o nível de inclusão do milho foi de 17,3%. No primeiro experimento, a composição química das silagens foi adequada e as perdas fermentativas foram baixas (<1,6%) para todos os tratamentos. A presença de aditivos microbianos resultou em silagens bem fermentadas, enquanto silagens Benz preservaram carboidratos solúveis e resultaram em menor concentração de produtos de fermentação. A estabilidade aeróbia foi máxima para LB, Combo e Benz (240h) e intermediária para LBNit (151h). A silagem inoculada com bactérias homoláticas foi menos efetiva em promover estabilidade aeróbia (74,7h), comparada à controle (53,5h). Os melhores parâmetros de degradabilidade ruminal da MS foram obtidos para a silagens LB e Combo. Silagem Benz e Homo foram semelhantes à Controle e o LBNIT piorou a degradabilidade ruminal da MS. No segundo experimento, O CMS foi similar entre os tratamentos, com média de 21,1 kg/dia, ao passo que a digestibilidade do amido e CNF foi maior para os grãos fermentados. O maior aporte energético das silagens gerou tendência de aumento na produção de leite corrigido para 3,5% de gordura. Ao relacionar essa produção com o CMS, os animais alimentados com silagens de grãos reidratados tenderam a uma maior eficiência alimentar. Vacas leiteiras alimentadas com silagens apresentaram menor excreção de nitrogênio ureico no leite (11,9 vs 13 mg/dL), o que sugere um melhor uso de nitrogênio para produção de proteína microbiana. O uso dos aditivos benzoato de sódio, *L. buchneri* e *L. buchneri* combinado com bactérias homoláticas é aconselhável para promover a fermentação, estabilidade aeróbia e valor nutritivo de silagens de grãos de milho reidratados.

Palavras-chave: Grãos de milho reconstituídos; Grãos fermentados; Silagem de grão úmido de milho; Aditivos microbianos; Aditivos químicos

ABSTRACT

The fermentation of rehydrated corn grains influenced by the additives application: aspects of conservation and nutritive value for dairy cows

Rehydrated corn grain silage is an advantageous storage method, economically viable and improves starch digestibility. This study was carried out in two experiments - **Experiment 1:** Use of chemical and microbial additives on fermentation aspects and aerobic stability of rehydrated corn grain silage. The treatments consisted of rehydrated corn silage with different types of additives: control (no additive); *Lactobacillus buchneri* (LB - 5×10^5 cfu/g of fresh matter); homolactic bacteria (Homo - 5×10^5 cfu/g FM); *Lactobacillus buchneri* + homolactic bacteria (Combo LB - 5×10^5 cfu/g + LP - 5×10^5 cfu/g FM); *Lactobacillus buchneri* + sodium nitrite (LB - 5×10^5 cfu/g FM + nitrite - 1.5 g/kg FM) and sodium benzoate (Benz - 2.0 g/kg FM). The experiment was made in a completely randomized design with six treatments and four replications. **Experiment 2:** Use of rehydrated corn silage with or without sodium benzoate on the digestibility and performance of dairy cows. Eighteen Holstein cows were distributed in a replicated 3×3 latin square design with three periods (22-d) to evaluate the effect of control treatment (rehydrated corn silage); Benz (rehydrated corn silage plus sodium benzoate - 2.0 g/kg FM) and DGC (dry ground corn). In all diets the inclusion of corn was 17.3% in dry matter basis. In the first experiment, the chemical composition of silages was adequate and the fermentative DM losses were low (<1.6%) for all treatments. The presence of microbial additives resulted in well fermented silages, while Benz silages preserved WSC and showed lower concentration of fermentation products. The aerobic stability was highest for LB, Combo and Benz (240h) and intermediate for LBNit (151h). The Homo silages was less effective in promoting aerobic stability (74.7h), compared to the control (53.5h). The best parameters of ruminal DM degradability were obtained for LB and Combo silages. Benz and Homo silages were similar to the control, while LBNIT worsened the ruminal degradability of DM. In the second experiment, dry matter intake was similar across treatments with average of 21.1 kg/day, whereas starch and CNF digestibility was higher for fermented grains. The higher energy of silages tended to increase the production of 3.5 % fat-corrected milk. Therefore, animals fed rehydrated grain silages tended to present increased feed efficiency. Dairy cows fed silages had lower excretion of milk urea nitrogen, suggesting a better use of nitrogen for microbial protein synthesis. The use of additives sodium benzoate, *L. buchneri* and *L. buchneri* combined with homolactic bacteria is advisable to improve the fermentation, the aerobic stability and the nutritive value of rehydrated corn grain silages.

Keywords: Reconstituted corn grains; Fermented grains; High moisture corn grain silage; Microbial additives; Chemical additives

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classes de aditivos e número de comparações entre silagens de grãos úmidos controle e tratada, por classe e ano, publicadas na literatura.	24
Figura 2 - Distribuição do tamanho de partículas do milho moído utilizado para confecção de silagens experimentais	64
Figura 3 - Valores de pH de silagens de grãos de milho reidratados sem aplicação de aditivos	71
Figura 4 - Distribuição do tamanho de partículas do milho moído utilizado para confecção de silagens para alimentação de vacas leiteiras	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Base de dados e meta-análise de efeitos da aplicação de inoculantes contendo bactérias heterofermentativas em silagens de grãos úmidos de milho	29
Tabela 2 - Base de dados e meta-análise de efeitos da aplicação de inoculantes contendo bactérias homoláticas em silagens de grãos úmidos de milho	31
Tabela 3 - Base de dados e meta-análise de efeitos da aplicação combinada de bactérias homofermentativas e heterofermentativas (Combo) em silagens de grãos úmidos de milho	33
Tabela 4 - Base de dados e meta-análise de efeitos da aplicação de aditivos químicos em silagens de grãos úmidos de milho	40
Tabela 5 - Caracterização químico-bromatológica e população microbiana epifítica do milho moído empregado na confecção de silagens experimentais	68
Tabela 6 - Composição química de silagens de grãos de milho reidratados, contendo ou não aditivos.....	73
Tabela 7 - Aspectos microbianos e fermentativos de silagens de grãos de milho reidratados, contendo ou não aditivos	75
Tabela 8 - Produtos de fermentação de silagens de grãos de milho reidratados, contendo ou não aditivos	76
Tabela 9 - Estabilidade aeróbia de silagens de grãos de milho reidratados, contendo ou não aditivos.....	78
Tabela 10 – Parâmetros de degradabilidade <i>in situ</i> de grãos de milho ou silagens de grãos de milho reidratados, contendo ou não aditivos	79
Tabela 11 - Caracterização químico-bromatológica e população microbiana epifítica do milho moído empregado na confecção de silagens em larga escala	89
Tabela 12 - Participação de ingredientes e composição nutricional de dietas formuladas com milho moído seco (MiS), milho reidratado e ensilado sem aditivos (Controle) ou milho reidratado e ensilado com benzoato de sódio (Benz)	91
Tabela 13 - Composição química e aspectos microbianos e fermentativos das silagens de grãos reidratados, sem aditivo (SGRControle) ou com benzoato de sódio (SGRBenzoato) e da silagem de milho planta inteira utilizadas no experimento de desempenho animal	92
Tabela 14 - Composição química dos ingredientes não fermentados, utilizadas nas dietas experimentais	93
Tabela 15 – Parâmetros de degradabilidade <i>in situ</i> de grãos de milho ou silagens de grãos de milho reidratados, aditivados ou não com benzoato de sódio	100

Tabela 16 - Consumo de matéria seca e de fibra em detergente neutro, comportamento ingestivo e índice de seleção praticado por vacas em lactação consumindo diferentes fontes de milho na dieta.	102
Tabela 17 - Digestibilidade da matéria seca, da matéria orgânica, da proteína bruta, da fibra em detergente neutro, do extrato etéreo, dos carboidratos não fibrosos e do amido; nutrientes digestíveis totais das dietas e excreção de amido nas fezes	103
Tabela 18 - Desempenho de vacas leiteiras consumindo dietas com diferentes fontes de milho	104
Tabela 19 – Parâmetros metabólicos de vacas leiteiras consumindo dietas com diferentes fontes de milho.....	105
Tabela 20 – Medidas de peso dos animais, energia líquida de manutenção, teor e consumo de energia líquida e balanço de energia de vacas consumindo dietas com diferentes fontes de milho.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAL – bactérias ácido láticas

CEL – celulose

CS – carboidratos solúveis

DVIVMO – digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria orgânica

DVIVMS – digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca

EE – extrato etéreo

ENN – extrativo não nitrogenado

FB – fibra bruta

FDA – fibra em detergente ácido

FDN – fibra em detergente neutro

HEMI – hemicelulose

LEV – leveduras

LIG – lignina

MM – matéria mineral

MS – matéria seca

MV – massa verde

PB – proteína bruta

UFC – unidade formadora de colônia

EPM – erro padrão da média

DP – desvio padrão

P – P-valor ou valor de probabilidade

1 INTRODUÇÃO

O milho moído é o principal ingrediente concentrado utilizado na alimentação animal no Brasil, constituindo a base energética das rações formuladas para ruminantes. Sendo o seu uso concorrente com a alimentação humana, é imprescindível a busca por alternativas que melhorem o aproveitamento dos grãos, de modo a maximizar nutricionalmente e economicamente seu uso. A utilização de silagens de grãos de milho reidratados é crescente, sobretudo em sistemas de produção de leite. A motivação de produtores rurais para a adoção dessa técnica pauta-se no baixo custo de produção e na obtenção de um produto final melhor aproveitado pelos animais.

A hidratação e ensilagem dos grãos de milho em estágio maduro é uma opção à ensilagem de grão úmido, pois permite a compra estratégica em momentos de baixa nos preços do milho, além de contornar o problema da estreita janela de colheita dos grãos. Jasper et al. (2009) obtiveram custos de produção do milho grão úmido 8,8% menores que os custos de produção do grão seco. No caso da ensilagem de grãos reidratados, deve-se considerar que os custos de secagem, transporte e armazenamento dos grãos estão embutidos no milho seco. No entanto, limitações de maquinário em época de safra e o risco de chuvas durante o período de colheita do grão úmido fazem da ensilagem do grão reidratado uma opção atraente.

Dentre as limitações da técnica, tem-se o uso restrito ao local de produção e possíveis assincronias entre as velocidades de moagem e de abastecimento do moinho com grãos inteiros. Atualmente estão disponíveis no mercado brasileiro equipamentos acoplados a reservatórios de água ou dotados de dispositivos para conexão a fontes de água encanada. Isso permite a hidratação e/ou aplicação de aditivos por aspersão imediata sobre o material que acabou de ser moído. Entretanto, para empreendimentos maiores, a demanda por grãos justificará a necessidade de mais de um moedor acoplado ao silo.

A técnica de reconstituição ou reidratação dos grãos implica em adição de água suficiente para elevar a umidade do grão seco para valores em torno de 28 a 35% (BENTON; KLOPFENSTEIN e ERICKSON, 2005; COSTA et al., 1999). A fermentação de grãos úmidos resulta em alterações na matriz proteica que circunda os grânulos de amido, levando à redução no teor da prolamina zeína (HOFFMAN et al., 2011). As zeínas são proteínas hidrofóbicas que envolvem os grânulos de amido, limitando a digestão dos grãos pelos ruminantes (OWENS et al., 1986; GIUBERT et al., 2012). Desse modo, a ensilagem de grãos

reidratados constitui uma ferramenta para aumento de digestibilidade, em decorrência da proteólise desencadeada por diversas fontes no silo, sobretudo por proteases bacterianas (JUNGES et al., 2015).

Fernandes (2014) obteve perfis fermentativos distintos entre silagens de grãos reidratados e silagens de grãos úmidos, aos 120 dias de fermentação. Além de menor teor de ácido lático e maior valor de pH, as silagens de grãos reidratados apresentaram maiores perdas fermentativas comparado ao grão colhido com umidade ideal. Ferrareto, Fredin e Shaver (2015) observaram uma extensão de fermentação modesta em grãos de milho reidratados, com ácidos totais compondo 1,65% da MS. A inoculação com bactérias homoláticas resultou em ácidos totais de 1,85%, com incremento do ácido lático de 0,95 para 1,52% da MS.

A ensilagem de grãos reidratados constitui uma ferramenta importante para aumento do valor nutritivo do milho, porém é necessário o entendimento das peculiaridades dessa fermentação. Nesse contexto, o uso de aditivos se apresenta como uma forma de manipulação importante, justificada pela necessidade de sincronização entre melhorias nutricionais e fermentativas em grãos de milho ensilados. Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da aplicação de aditivos em silagens de grãos de milho reidratado sobre aspectos fermentativos e valor nutritivo para vacas leiteiras.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A ensilagem de grãos úmidos de milho

Ensilar grãos de milho com alta umidade é uma estratégia eficiente de processamento e conservação dos grãos. Esse método de armazenamento está associado a baixas perdas de matéria seca, sendo encontrado nos trabalhos de Dawson et al. (1998), Kung Jr. et al. (2007), Da Silva et al. (2015), dentre outros, relatos de perdas fermentativas inferiores a 4%. Alternativamente, o armazenamento de grãos secos pode resultar em perdas de até 15% do milho estocado, dependendo do nível de tecnificação empregado (SANTOS, 2006).

O valor nutricional da silagem de grãos úmidos de milho é maior que o de grãos secos moídos e o principal fator determinante dessa resposta é a maior digestibilidade do amido, tanto no rúmen quanto nos intestinos e trato digestivo total (OWENS; SODERLUND, 2006). Segundo Owens e Basalan (2012), a digestibilidade ruminal do amido, medida em vacas leiteiras, foi aumentada de 48,8% para 76,3%, em comparação ao milho laminado seco, o que comprova o aumento em carboidratos fermentáveis disponíveis para fermentação ruminal.

O teor de proteína solúvel é um bom indicador da digestibilidade dos grãos de milho ensilados, por guardarem altas correlações entre si (FERNANDES, 2014; KUNG Jr.; WINDLE; WALKER, 2014). Hicks e Lake (2012) observaram teores de proteína solúvel no milho seco entre 10 e 15% da PB; em silagens de grãos úmidos laminados, de 50 a 60% e em silagens de grãos úmidos sob moagem fina, entre 60 e 85% da PB. Os teores máximos de proteína solúvel observados por Fernandes (2014) para grãos de milho reidratados foram da ordem de 40% da PB.

As zeínas são as proteínas hidrofóbicas componentes da matriz proteica que envolvem os grânulos de amido. Tais proteínas podem ser degradadas com a ensilagem, seja por ação de proteases bacterianas ou por solubilização ácida (HOFFMAN et al., 2011). As transformações nas subunidades α , γ , β e δ -zeínas desencadeadas em dois híbridos de milho ensilados por 240 dias foram relatadas por Hoffman et al. (2011). Para o primeiro híbrido, houve diminuição de todas as α -zeínas e de ambas as γ -zeínas avaliadas, enquanto a β -zeína e as δ -zeínas sofreram decréscimos menos pronunciados. A fermentação do segundo híbrido, resultou em diminuição de cinco das oito α -zeínas e de todas as demais subunidades avaliadas. O decréscimo consistente das γ -zeínas traz implicações importantes quanto à digestão do amido, tendo sido

obtidas reduções de 42,2 e de 73,2% para o primeiro e segundo híbrido, respectivamente. Como estas subunidades se localizam mais superficialmente na matriz proteica, sua degradação contribuiu para a individualização dos grânulos de amido, tornando-os acessíveis, diferente do grau de organização que apresentavam no tempo zero da fermentação. Com vistas a isolar as diferentes fontes proteolíticas atuantes na ensilagem de grãos úmidos, Junges et al. (2015) constataram maior contribuição de bactérias (60,4%), seguida das enzimas dos grãos (29,5%), fungos (5,3%) e produtos de fermentação (4,8%), sobre a proteólise em silagens de grãos de milho reidratados e armazenados por 90 dias.

Alguns fatores de manejo são determinantes sobre a qualidade de silagens de grãos úmidos. O grau de moagem dos grãos alterou a disponibilidade do amido de silagens avaliadas *in vivo* (SAN EMETERIO et al., 2000) e *in vitro* (HOFFMAN et al., 2012). No estudo de San Emeterio et al. (2000) o aumento da digestibilidade do amido de silagens de grãos úmidos moídos grosseiramente em relação ao seu par seco foi numericamente superior (86,7 vs 84,4%), enquanto para o milho moído fino e ensilado, o incremento em digestibilidade foi significativo (91,2 vs 86,5%). Quanto à influência dos tempos de armazenamento, Benton; Klopfenstein e Erickson (2005) trabalharam com grãos de milho reidratados, observando nos primeiros 56 dias de fermentação os maiores incrementos em digestibilidade *in situ* da MS e aumentos na proteína degradável no rúmen. Nesse trabalho também ficou evidente a importância do teor de umidade das silagens, visto que a reidratação de grãos de milho para um teor de umidade de 35% resultou em silagens mais digestíveis e de maior degradabilidade proteica, comparado aos grãos reidratados até 28% de umidade. Na compilação de Hicks e Lake (2012) sobre a qualidade de silagens de grãos úmidos produzidas entre 2006 e 2011 na empresa Hitch Enterprises, os maiores ganhos em solubilidade proteica foram alcançados dentro de 60 dias de ensilagem. Em ambos os estudos os ganhos foram continuados ao longo do tempo de fermentação, porém de forma gradual.

As peculiaridades entre silagens de grãos úmidos e de grãos reidratados envolvem tanto questões nutricionais, como fermentativas. No estudo de Fernandes (2014) silagens de grãos reidratados apresentaram menor teor de ácido láctico (1,19 vs 2,07%, MS), maiores valores de pH (4,7 vs 4,2) e maiores teores de etanol (1,1 vs 0,6%, MS), ácido butírico (2.062 vs 5,8 mg/Kg MS), acetona (84,7 vs 4,7 mg/kg MS) e 2,3-butanodiol (9.347 vs 876 mg/kg MS), quando comparadas às silagens de grãos úmidos com 120 dias de fermentação. No entanto, a degradabilidade ruminal da matéria seca e do amido foram semelhantes a partir dos 60 dias de

armazenamento. Trabalhando com as mesmas amostras, Carvalho (2014), identificou em silagens de grãos úmidos a predominância dos gêneros *Lactobacillus* e *Acetobacter*, com destaque para *Lactobacillus* aos sete dias (49,6%) e *Acetobacter* aos 120 dias (15,4%). Para as amostras de grãos de milho reidratados, os grupos predominantes foram dos gêneros *Clostridium* e *Enterococcus*, com destaque para *Clostridium* aos 120 dias (37,7%) e *Enterococcus* aos 120 dias (20,5%). Tais achados conferiram à silagem de grãos reidratados uma qualidade higiênica inferior à de grãos úmidos, tornando necessário maiores estudos que contrastem reidratação e ensilagem com alta umidade.

2.2 Modos de ação e uso de aditivos para silagens de grãos úmidos

A utilização de aditivos em silagens de grãos úmidos justifica-se pela busca por melhorias no processo fermentativo, como uma acidificação eficiente, a fim de prover adequada conservação e prevenir o crescimento de microrganismos patogênicos. Outra motivação seria o controle de microrganismos deterioradores, com consequente incremento de estabilidade aeróbia ao alimento. Nesse contexto, alguns aditivos microbianos e químicos são potenciais produtos para uso em silagens de grãos úmidos de milho.

A história do uso de aditivos em silagens de grãos úmidos evoluiu desde a década de 1990, no sentido da utilização de estratégias seguras à saúde e menos corrosivas para os equipamentos de aplicação. Anteriormente a este período, o armazenamento de grãos úmidos em galpões ou compartimentos, sem rigor quanto à compactação e exclusão do oxigênio, impulsionou o uso de substâncias eficientes no controle de fungos. O principal aditivo, nesse contexto, foi o ácido propiônico, em doses geralmente próximas a 1,5% da matéria fresca. Outros ácidos puros, formulações contendo compostos nitrogenados, além de misturas de ácidos orgânicos e inorgânicos também foram utilizadas como inibidores de fungos (BOTHAST et al., 1975; BRITT; HUBER, 1976; CLARK; CROOM; HARSHBARGER, 1975; CLARK et al., 1973; GOERING; GORDON, 1973; HORTON; HOLMES, 1975; JONES, 1970, 1972; JONES; DONEFER; ELLIOT, 1970), SAUER; BURROUGHS, 1974).

A partir da década de 1990, observou-se um incremento no uso de microrganismos, como aditivos (Fig.1). De uma base de dados com 129 comparações (controle vs. tratada) sobre efeitos de aditivos em silagens de grãos úmidos, 47 trataram do uso de microrganismos heterofermentativos e 27 consistiam de aditivos combinados, contendo bactérias

heterofermentativas em sua composição. Outra mudança se deu no panorama dos aditivos químicos (40 comparações), com um aumento na utilização de sais, presentes em 72% das formulações. Isso demonstra que o problema da deterioração aeróbia desencadeada por fungos e leveduras continua sendo alvo na manipulação da fermentação de grãos, porém, utilizando-se de produtos mais seguros. A novidade da pesquisa com aditivos em grãos úmidos são os recentes trabalhos avaliando o efeito isolado de enzimas com a finalidade de quebra das ligações glicosídicas da molécula de amido (KUNG Jr et al., 2007) ou ação proteolítica (KUNG Jr.; WINDLE; WALKER, 2014; FERRARETTO; FREDIN; SHAVER, 2015), o que remete à motivação nutricional de aumento na disponibilidade do amido dos grãos.

Figura 1 - Classes de aditivos e número de comparações entre silagens de grãos úmidos controle e tratada, por classe e ano, publicadas na literatura.

Para elucidar o efeito da aplicação dos aditivos em silagens de grãos de milho foi realizado um estudo meta-analítico a partir de 24 artigos publicados na íntegra (BIRO et al., 2006, 2009; CANIBE et al., 2014; Da SILVA, T. et al., 2015; DAWSON; RUST; YOKOYAMA, 1998; DOLEZAL; ZEMAN, 2005; DUTTON; OTTERBY, 1971; FERRARETTO; FREDIN; SHAVER, 2015; FLORES-GALARZA et al., 1985; GÁLIK et al., 2007, 2008; ÍTAVO et al., 2006, 2009; JOBIM et al., 2008; KUNG Jr. et al., 2004, 2007; KUNG Jr.; WINDLE; WALKER, 2014; LOUCKA, 2010; MORAIS et al., 2012; PRIGGE et al., 1976; PYŠ et al., 2009; REIS et al., 2008; TAYLOR; KUNG, 2002; WARDYNSKI;

RUST; YOKOYAMA, 1993) uma nota científica (BASSO et al., 2012) e 10 resumos publicados nos principais simpósios internacionais sobre silagens e não publicados como artigos até o momento (AUERBACH et al., 2015; COUDURE et al., 2012; DA SILVA, N. et al., 2015; DAVIES et al., 2009; DOLEŽAL ET AL., 2014; GALLO; RAJČÁKOVÁ; MLYNAR, 2015; MLYNÁR; RAJČÁKOVÁ; GALLO, 2006; PYŠ; KARPOWICZ; SZALAŁATA, 2010; PYS; KOWALSKI, 2014; REVELLO-CHION; BORREANI; MUCK, 2012). Dentre o universo de trabalhos utilizados, somente no artigo de Ferraretto, Fredin e Shaver (2015) e no resumo de Da Silva, N. et al.(2015), foram estudadas silagens de grãos de milho reidratados.

O banco de dados foi elaborado a partir de informações que permitiram a extração exata de valores-resposta aos tratamentos, utilizando-se silagens fermentadas por tempo igual ou superior a 30 dias, confeccionadas com grãos de milho, processados ou inteiros. Foram compilados 35 trabalhos, que geraram 129 comparações a serem exploradas conforme as classes dos aditivos.

As variáveis nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) e proteína solúvel (PBSol) foram adaptadas em certos trabalhos, para que o $N-NH_3$ fosse expresso como % da MS e a PBSol fosse obtida a partir de correção de valores de nitrogênio solúvel pelo fator 6,25. Adotou-se o critério de, no mínimo de duas comparações ou quatro médias, provenientes de mais de um artigo científico, para inclusão de uma variável dependente na base de dados. A análise foi feita por meio do procedimento Mixed do SAS (LITTELL et al., 1996) e o modelo matemático incluiu efeito fixo de tratamento (controle ou aditivo) e efeito aleatório de experimento (ST-PIERRE, 2001), com os resultados apresentados por classe de aditivo.

2.2.1 Bactérias do gênero *Lactobacillus*

Os *Lactobacillus* são bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos. São estritamente fermentativas, aero-tolerantes ou anaeróbias e apresentam uma complexa exigência nutricional, que inclui carboidratos, aminoácidos, peptídeos, ésteres de ácidos graxos, sais e vitaminas. São bactérias desprovidas de atividade heme-dependente e algumas cepas podem exibir atividade da catalase ou de redução de nitrito (HAMMES; VOGEL, 1995). Os microrganismos deste gênero foram isolados de diversos habitats, geralmente

colonizando substratos ricos em açúcares. Alguns exemplos são as plantas, carnes, leites e os derivados destes, sejam fermentados ou em processo de deterioração (HAMMES; VOGEL, 1995; SALMINEN; WRIGHT; OUWEHAND, 2004).

Uma importante característica utilizada para diferenciação de bactérias ácido lácticas é o modo de uso da glicose sobre condições padrões, em que a concentração deste substrato e de fatores de crescimento, como aminoácidos, vitaminas e precursores de ácidos nucleicos não sejam limitantes, além de baixa disponibilidade de oxigênio. Nessas circunstâncias, BAL são divididas em homofermentativas, que convertem glicose em ácido láctico ou heterofermentativas, que fermentam glicose a ácido láctico, etanol, ácido acético e CO₂, que pode ser medido por um teste de produção de gás (SHARPE, 1979).

Nesse contexto, a espécie *Lactobacillus plantarum* é classificada como homofermentativa e *Lactobacillus buchneri* como heterofermentativa. No entanto, os microrganismos apresentam plasticidade metabólica em função das condições do meio, como nível de oxigênio (CONDON, 1987) ou presença de nutrientes e de fatores de crescimento (KANDLER, 1983). Deste modo, *L. buchneri* é classificado como bactéria heterofermentativa e *L. plantarum* como heterofermentativa facultativa.

2.2.1.1 *Lactobacillus buchneri*

Bactérias heterofermentativas obrigatórias, como *L. buchneri*, não possuem a enzima aldolase, não sendo capazes de quebrar o monossacarídeo frutose-1,6-difosfato em trioses fosfato. Desse modo, elas oxidam glicose-6-fosfato a 6-fosfogluconato, que é descarboxilado a ribulose-5-fosfato, seguindo na Via das Pentoses Fosfato. Se nenhum aceptor de elétrons estiver disponível o acetil-fosfato será reduzido a etanol, enquanto o gliceraldeído-3-fosfato (G-3-P) seguirá a via glicolítica, resultando na formação de ácido láctico. Esse tipo de metabolismo resulta, portanto, em significativas produções de CO₂ e etanol, além do ácido láctico. Quando o substrato sob fermentação heterolática são pentoses, ocorre transporte destas, por permeases, para dentro da célula, onde são fosforiladas e convertidas em ribulose-5-fosfato ou xilulose-5-fosfato. Na fermentação de pentoses, CO₂ não é formado e não são necessárias etapas de desidrogenação para obtenção do intermediário xilulose-5-fosfato. Dessa forma, a redução do acetil-fosfato a etanol é regulada negativamente e, em vez da produção de álcool, o acetil-fosfato é utilizado pela enzima acetato quinase para produção de

acetato e ATP, sob etapa de fosforilação (SALMINEN; WRIGHT; OUWEHAND, 2004).

Foi demonstrado em condições de anoxia, que o crescimento inicial da bactéria heterolática *L. buchneri* é dependente da metabolização de açúcares e que, após o estabelecimento de um ambiente ácido, ela é capaz de degradar ácido láctico, mesmo na ausência de glicose e com mínima produção de etanol, conforme a equação estequiométrica a seguir, proposta por Oude Elferink et al. (2001).

$$1 \text{ ácido láctico} = 0,48 \text{ ácido acético} + 0,48 \text{ 1,2-propanodiol} + 0,04 \text{ etanol} + 0,52 \text{ CO}_2 \quad (\text{Eq.1})$$

Apesar da elucidação dessa via metabólica, a constatação de Driehuis, Oude Elferink e Spoelstra (1999) sobre a predominância do álcool 1-propanol e não do 1,2-propanodiol em silagens de milho planta inteira, inoculadas com *L. buchneri*, sugeriu a possibilidade que outro microrganismo estaria envolvido na degradação anaeróbica do 1,2-propanodiol. Krooneman et al. (2002) isolaram duas cepas de *Lactobacillus diolivorans* em silagens de milho, capazes de degradar o 1,2-propanodiol, conforme a equação estequiométrica 2:

$$1,2\text{-propanodiol} = 0,53 \text{ 1-propanol} + 0,45 \text{ ácido propiônico} \quad (\text{Eq.2})$$

Desse modo, uma cascata de eventos bioquímicos diretamente desencadeados por *L. buchneri*, como a produção favorecida de ácido acético e a assimilação anaeróbica de ácido láctico a ácido acético é acrescida do possível evento complementar de produção de ácido propiônico por outro microrganismo. Ácidos orgânicos, como o ácido acético e propiônico, exercem efeito antifúngico sobre leveduras e fungos, assegurando um controle da deterioração das silagens após abertura dos silos. Como o pKa do ácido acético é superior ao pH do meio, a molécula se mantém íntegra, podendo transpassar a membrana microbiana. Dentro da célula, onde o pH é próximo da neutralidade, o ácido acético libera H^+ , comprometendo o equilíbrio ácido-base do microrganismo. O mesmo mecanismo acontece para o ácido propiônico, caso seja produzido (MOON, 1983).

A principal bactéria heterofermentativa utilizada nos trabalhos abordados na metanálise foi *Lactobacillus buchneri*. Apenas em três comparações, de um total de 45, foi feita a inoculação com *Propionibacterium spp.* As doses de *L. buchneri* empregadas variaram de 5×10^4 a 1×10^6 ufc/g, enquanto a dose de bactérias ácido propiônicas foi de 1×10^7 ufc/g.

O padrão fermentativo (tabela 1) foi bastante modificado, evidenciando a fermentação heterolática ocorrida. A inoculação resultou em maior consumo de carboidratos solúveis nos

grãos tratados, porém, o saldo de produtos de fermentação não causou variações no pH, o que pode ser explicado pela semelhança nos teores de ácido láctico. A produção de ácido acético e de ácido propiônico foi aumentada em silagens inoculadas, resultando em menores relações láctico:acético nestes grãos.

Além da fermentação heterolática *per si*, os dados sugerem a possibilidade de ocorrência da rota assimilatória de ácido láctico, descrita por Oude Elferink et al. (2001). Essa hipótese advém do incremento em ácido propiônico nas silagens inoculadas, potencialmente produzido a partir do 1,2-propanodiol por *L. diolivorans* (KROONEMAN et al., 2002). Outra forma de contribuição com ácido propiônico para a massa se deu por meio da inoculação direta com *P. acidipropionici*. Segundo Kung Jr et al. (2003), o crescimento de propionibactérias é favorecido em condições de queda lenta de pH ou de pH final entre 4,2 e 4,5, conforme valor obtido para as silagens de grãos da presente metanálise. As bactérias ácido propiônicas podem fermentar glicose, frutose, glicerol, mas também podem utilizar ácido láctico (dois moles), formando ácido propiônico, ácido acético e CO₂ (CUMMINS; JOHNSON, 1992). Como as silagens de grãos alcançam elevadas densidades de compactação, a anaerobiose é favorecida e, como essa característica também é exigida por bactérias ácido propiônicas, pode-se considerar que as silagens constituem ambientes favoráveis para o desenvolvimento desse tipo de microrganismo.

O incremento em ácidos orgânicos de efeito antifúngico durante a fermentação contribuiu para a redução nas contagens de leveduras e fungos em silagens inoculadas, não influenciando, entretanto, a produção de etanol. Após a abertura dos silos, o tratamento com bactérias heterofermentativas resultou em um controle eficiente desses microrganismos, com silagens 2,6 vezes mais estáveis em aerobiose. As perdas fermentativas foram aumentadas em silagens contendo bactérias heterofermentativas, o que é esperado, visto que o metabolismo desses microrganismos inclui perda de carbono, na forma de CO₂ (SALMINEN; WRIGHT; OUWEHAND, 2004). Entretanto, como as perdas fermentativas podem ser consideradas baixas para as silagens tratadas ou não, o principal fator de manipulação de silagens tratadas com cepas heterofermentativas foi a estabilidade aeróbia.

Tabela 1- Base de dados e meta-análise de efeitos da aplicação de inoculantes contendo bactérias heterofermentativas em silagens de grãos úmidos de milho

Item	Banco de dados					Tratamentos		EPM	P
	n ¹	Média	DP	Mínimo	Máximo	Controle	Heterofermentativas		
MS, %	74	69,9	3,74	63,0	73,8	70,1	69,7	0,62	0,01
Cinzas, %MS	10	1,40	0,09	1,27	1,56	1,40	1,39	0,04	0,73
FDN, %MS	26	7,82	1,73	5,53	10,65	7,83	7,81	0,49	0,85
FDA, %MS	26	2,69	1,37	1,04	5,68	2,69	2,69	0,39	0,92
Hemicelulose, %MS	26	5,13	1,07	3,86	7,43	5,15	5,11	0,30	0,78
Amido, %MS	12	74,0	3,80	68,7	79,4	74,0	74,1	1,63	0,85
PB, %MS	32	9,49	1,16	7,23	10,96	9,53	9,45	0,30	0,48
N-NH ₃ , %MS	64	0,02	0,02	0,00	0,08	0,02	0,03	0,00	0,02
CS, %MS	38	0,19	0,25	0,01	1,08	0,24	0,14	0,06	<0,01
pH	66	4,22	0,43	3,73	5,65	4,24	4,20	0,07	0,39
Ácido láctico, %MS	66	1,35	1,06	0,14	3,90	1,38	1,32	0,19	0,17
Ácido acético, %MS	66	0,58	0,42	0,04	2,71	0,41	0,74	0,07	<0,01
Ácido propiônico, %MS	36	0,04	0,07	0,00	0,35	0,01	0,06	0,01	0,01
Ácido butírico, %MS	8	0,02	0,02	0,00	0,06	0,02	0,01	0,01	0,19
Etanol, %MS	46	0,59	0,49	0,12	1,80	0,61	0,57	0,10	0,25
Lático/Acético	66	3,11	2,95	0,48	10,88	3,71	2,51	0,51	<0,01
BAL, log ufc/g	6	7,88	0,54	7,11	8,46	7,63	8,13	0,30	0,34
Leveduras, log ufc/g	46	4,24	1,34	1,34	6,70	4,83	3,65	0,24	<0,01
Fungos, log ufc/g	30	3,65	1,98	1,10	7,29	3,95	3,36	0,51	<0,01
Perdas fermentativas, %	16	3,01	1,04	0,75	4,10	2,72	3,30	0,37	0,07
Estabilidade aeróbia, h	72	129	114	20	450	70	188	16,4	<0,01

¹Número de médias

2.2.1.2 *Lactobacillus plantarum* e bactérias homoláticas

Por se tratar de uma bactéria heterofermentativa facultativa, *L. plantarum* pode fermentar açúcares de seis ou cinco carbonos. A bactéria apresenta atividade induzida da enzima fosfoquetolase, mediada pela presença de pentoses, ao passo que, quando a glicose for o carboidrato abundante essa via será inibida (PHOSTHUMA et al., 2002). Caso a bactéria utilize a via das pentoses, ocorrerão etapas de desidrogenação, com formação do 6-fosfogluconato, que após descarboxilado, resultará em uma pentose-5-fosfato, que será quebrada em G-3-P e acetil fosfato. O gliceraldeído-3-fosfato será metabolizado por via glicolítica, gerando um ácido lático. Se não houver um aceptor de elétrons disponível, o acetil fosfato será reduzido a etanol via acetil-CoA e acetaldeído, conforme mencionado anteriormente para bactérias heteroláticas (SALMINEN; WRIGHT; OUWEHAND, 2004).

Sob condições de baixa disponibilidade de oxigênio e glicose abundante, *L. plantarum* utiliza a via glicolítica, que é caracterizada pela formação da frutose-1,6-difosfato. Esta hexose é então quebrada pela enzima aldolase em dihidroxicetona-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato (G-3-P). O primeiro produto é interconvertido em G-3-P e esses açúcares de três carbonos serão convertidos a piruvato, em uma sequência que inclui etapas de fosforilação. O piruvato é reduzido a ácido lático e, como duas moléculas de G-3-P são empregadas no processo, gera-se um saldo de dois moles de ácido lático, com ganho líquido de 2 ATPs, por mol de glicose consumida (SALMINEN; WRIGHT; OUWEHAND, 2004). Esta é a principal característica explorada em inoculantes para silagens a base de bactérias homoláticas, uma vez que a predominância da forma dissociada do ácido lático contribui para uma efetiva acidificação e conservação da massa.

As doses aplicadas nos estudos com bactérias homofermentativas abordados na meta-análise, variaram entre 5×10^4 e 1×10^7 ufc/g e a análise dos dados revelou modificações na composição química dos grãos (Tab. 2). Silagens tratadas apresentaram maior teor proteico, o que pode estar associado à menor concentração de amônia obtida, um indicativo de proteólise menos intensa para este tratamento. No estudo de Ferraretto, Fredin e Shaver (2015), o teor de PB de silagens aditivadas ou não com bactérias homo ou heterofermentativas permaneceu semelhante, mesmo quando houve inclusão de proteases. Nesta meta-análise o teor de proteína solúvel foi semelhante entre silagens controle ou tratada.

Tabela 2 - Base de dados e meta-análise de efeitos da aplicação de inoculantes contendo bactérias homoláticas em silagens de grãos úmidos de milho

Item	n ¹	Banco de dados				Tratamentos			
		Média	DP	Mínimo	Máximo	Controle	Homoláticas	EPM	P
MS, %	28	66,9	5,50	59,5	76,8	66,6	67,3	1,49	0,13
Extrato etéreo, %MS	6	3,45	0,34	2,93	3,84	3,23	3,67	0,15	0,18
PB, %MS	20	8,57	1,11	6,60	9,76	8,45	8,69	0,36	0,03
N-NH ₃ , %MS	18	0,03	0,02	0,01	0,07	0,02	0,019	0,00	0,06
Proteína solúvel, %PB	4	29,6	11,9	22,5	47,3	22,5	36,8	7,46	0,41
CS, %MS	8	2,65	1,08	1,23	3,74	2,91	2,39	0,56	0,12
pH	24	4,29	0,48	3,88	5,65	4,42	4,16	0,14	0,02
Ácido láctico, %MS	16	2,45	1,74	0,88	6,93	2,14	2,76	0,63	0,10
Ácido acético, %MS	16	0,91	0,91	0,11	2,87	0,99	0,84	0,33	0,40
Ácido propiônico, %MS	10	0,08	0,06	0,00	0,15	0,10	0,05	0,03	0,27
Etanol, %MS	12	0,79	0,97	0,27	2,85	0,82	0,75	0,41	0,22
Lático/Acético	16	3,96	2,42	1,64	9,74	3,02	4,89	0,81	0,12
Leveduras, log ufc/g	6	4,77	0,73	3,92	5,67	4,76	4,78	0,47	0,95
Perdas fermentativas, %	10	1,74	2,42	0,46	6,80	1,83	1,65	1,15	0,42
Estabilidade aeróbia, h	4	118	27	96	156	138	98	13	0,27

¹Número de médias

Houve tendência de maior consumo de carboidratos solúveis em silagens inoculadas ($P=0,12$), o que foi revertido em menor pH para este tratamento. O teor de ácido láctico tendeu a ser maior em silagens tratadas ($P=0,10$), sendo 1,29 vezes superior ao de grãos fermentados sem inoculante. Da mesma forma, houve tendência de aumento na relação láctico:acético nestas silagens ($P=0,12$).

As perdas fermentativas e a estabilidade aeróbia dos grãos não variaram em função da aplicação do aditivo. As perdas ocorridas durante a fermentação foram baixas, porém, como numericamente, as silagens contendo bactérias homofermentativas foram 40 horas menos estáveis após exposição ao ar, a aplicabilidade do aditivo torna-se questionável. Ao equacionar os principais desdobramentos da aplicação de bactérias homoláticas em silagens de grãos, deve-se contrapor o benefício do pH mais baixo com a desvantagem de redução potencial da estabilidade aeróbia, o que torna desaconselhável a aplicação isolada de microrganismos homofermentativos neste tipo de silagem.

2.2.1.3 Combinações de microrganismos

A associação de aditivos microbianos com vias metabólicas diferentes visa assegurar uma adequada fermentação, aliada à preservação do painel do silo após abertura e exposição da silagem ao ar. A base de dados utilizada para metanálise do efeito dessas combinações contou com 27 comparações e, em todas elas, havia pelo menos uma cepa homolática ou heterofermentativas facultativa, como *L. plantarum*, presente em 75% das formulações. Além da representatividade do *L. buchneri*, que compôs 59% dos combos, foi adicionado *Propionibacterium spp.* como um dos microbianos em 44% das formulações.

A composição química e as características fermentativas das silagens estão apresentadas na Tabela 3. O teor de PB foi maior, ao passo que a concentração de amônia tendeu ($P=0,11$) a ser menor nas silagens tratadas, indicando uma proteólise menos intensa nesses grãos. Silagens contendo aditivo apresentaram menor teor de FDN, o que pode ser explicado pela tendência de maior desaparecimento de hemicelulose ($P=0,10$). Uma pesquisa recente sobre a produção de esterase do ácido ferúlico por *L. buchneri* identificou a atividade de esterase somente aos 3 dias de fermentação (Addah et al., 2015). Os autores justificaram essa ação pontual em função da necessidade de pH elevado para atividade enzimática ($>5,6$).

Tabela 3 - Base de dados e meta-análise de efeitos da aplicação combinada de bactérias homofermentativas e heterofermentativas (Combo) em silagens de grãos úmidos de milho

Item	Banco de dados					Tratamentos		EPM	P
	n	Média	DP	Mínimo	Máximo	Controle	Combo		
MS, %	52	68,5	4,78	59,6	73,9	68,6	68,4	0,95	0,17
Cinzas, %MS	28	1,40	0,07	1,27	1,55	1,38	1,41	0,02	0,12
FDN, %MS	8	10,01	0,53	9,11	10,70	10,16	9,85	0,27	0,02
FDA, %MS	8	4,09	1,39	2,73	5,68	4,12	4,06	0,75	0,18
Hemicelulose, %MS	8	5,92	1,48	3,97	7,43	6,04	5,79	0,80	0,10
Amido, %MS	30	71,9	3,17	67,9	79,4	72,0	71,8	0,83	0,50
Extrato etéreo, %MS	8	3,82	0,38	3,39	4,42	3,82	3,82	0,21	1,00
PB, %MS	36	8,24	0,90	7,23	9,72	8,18	8,31	0,21	0,05
N-NH ₃ , %MS	44	0,02	0,02	0,00	0,08	0,023	0,018	0,00	0,11
CS, %MS	10	0,41	0,39	0,01	1,08	0,49	0,32	0,18	0,04
pH	52	4,21	0,41	3,73	5,65	4,29	4,13	0,08	0,03
Ácido láctico, %MS	44	1,53	0,68	0,39	2,51	1,53	1,54	0,15	0,90
Ácido acético, %MS	44	0,58	0,31	0,15	1,42	0,51	0,65	0,07	0,03
Ácido propiônico, %MS	18	0,04	0,05	0,00	0,14	0,02	0,06	0,01	0,04
Ácido butírico, %MS	14	0,02	0,02	0,00	0,06	0,02	0,02	0,01	0,47
Etanol, %MS	42	0,35	0,30	0,09	1,56	0,41	0,30	0,07	<0,01
Lático/Acético	42	3,18	2,10	0,14	8,63	3,11	3,25	0,46	0,78
Leveduras, log ufc/g	10	3,61	1,13	2,00	5,67	4,37	2,84	0,37	0,03
Fungos, log ufc/g	18	1,8255	0,5835	1,09	2,9	1,82	1,83	0,20	0,94
Perdas fermentativas, %	24	2,7816	1,00	0,40	4,22	2,73	2,83	0,29	0,56
Estabilidade aeróbia, h	28	216	117	35,0	427	194	237	31,4	0,22

¹Número de médias

Em relação à presente metanálise, deve-se ressaltar que não foi atribuída atividade de esterase a nenhuma cepa informada nos trabalhos científicos.

O perfil fermentativo das silagens conjugou características provenientes tanto de bactérias homoláticas como de heterofermentativas. Houve maior consumo de carboidratos solúveis nas silagens inoculadas, resultando em menor valor de pH. Ao mesmo tempo, silagens tratadas apresentaram ácido láctico semelhante ao controle e maiores teores de ácido acético e propiônico. A presença desses ácidos com poder antifúngico reduziu a contagem de leveduras e a produção de etanol. O tempo de estocagem das silagens estudadas neste tópico foi geralmente superior a 60 dias (85% das médias avaliadas). Assim, pode-se considerar que tenha ocorrido a assimilação anaeróbica do ácido láctico por cepas de *L. buchneri* (DRIEHUIS, OUDE ELFERINK e SPOELSTRA, 1999) ao longo do processo fermentativo, culminando com a predominância de ácidos orgânicos típicos do metabolismo heterofermentativo. Apesar dessa atuação, não houve aumentos nas perdas fermentativas ou na estabilidade aeróbia das silagens, que seriam desdobramentos esperados.

2.2.2 Aditivos químicos

2.2.2.1 Benzoato de sódio

O benzoato de sódio, fórmula química C_6H_5COONa , é um pó branco, com pH 9, ponto de fusão superior a 410 °C e solubilidade em água de 660 g/L a 20 °C. Quanto à toxicidade, é classificado como um ligeiro contaminante da água. Apresenta DL50 em ratazana de 3140 mg/kg (FISPQ - MERCK®, 2016). Comparativamente, o ácido benzoico, fórmula química (C_6H_5COOH), apresenta solubilidade em água de apenas 2,7 g/L em temperatura de 18 °C, o que justifica a preferência pelo uso do sal. O modo de ação do benzoato de sódio concentra-se na forma não dissociada do ácido benzoico, o qual apresenta atividade antimicrobiana, sendo empregado para diversas finalidades na indústria alimentícia (CHIPLEY, 2005).

Foi demonstrado por Cruess e Richert (1929) que o potencial de ação do benzoato de sódio sobre fungos e bactérias é função da dose e do pH do meio. Valores de pH superiores a 4,5 para fungos e leveduras e maiores que 5,5 para bactérias lácticas e algumas espécies de *Bacillus* determinaram a necessidade de altas doses de benzoato de sódio para controle

microbiano. Como exemplo, o controle da fermentação alcoólica de *Sacharomyces ellipsoideus* (atualmente denominada *S. cerevisiae*) foi testado em meios com pH 3,0, 4,5 e 7,0. Em pH mais alto, a fermentação continuou lentamente, mesmo com a adição de 1,5% de benzoato, que foi a maior concentração testada. Em pH 3,0, a fermentação foi suprimida com a adição de 0,06%. Em pH 4,0, mais de 0,1% de benzoato de sódio foi necessário para prevenir a fermentação, sendo que a dose 0,04% pareceu estimular a atividade da levedura.

O padrão de resposta dependente de pH pode ser entendido pelo fato do pKa do ácido benzóico ser 4,19, de modo que a forma não dissociada será predominante em pHs baixos, (BAIRD-PARKER, 1980), controlando os microrganismos. Segundo Chipley (2005), somente ácidos orgânicos lipofílicos, como o ácido benzóico, apresentam atividade antimicrobiana, tendo sido demonstrado por Lambert e Stratford (1999) que tais ácidos resultam em aumento da fase 'lag', o que inibe o crescimento microbiano.

Ilustrando o efeito dose-dependente do aditivo, Bernardes et al. (2015) obtiveram maior estabilidade aeróbia (257h) para silagem de planta inteira de milho tratada com 0,2% de benzoato de sódio, comparado à silagem tratada com a dose 0,1% (117h). Esta, por sua vez, foi mais efetiva em controlar o aquecimento da massa, em relação ao controle não tratado (61 h). Ao longo do período de exposição das silagens ao ar (máximo de 280 horas), a maior dose do aditivo mostrou eficiência no controle do aumento do pH e das populações de leveduras e fungos.

Além do pH do meio, aspectos ambientais podem determinar a eficácia do ácido benzóico no controle de microrganismos. Macris (1975) observaram que a captação de ácido benzóico por *S. cerevisiae*, em função da temperatura, resultou em uma curva semelhante à observada para atividade enzimática, vindo a reduzir drasticamente após 60 °C. Esse dano irreversível foi associado ao que ocorre em proteínas em função do calor, sinalizando que compostos de natureza proteica estariam envolvidos na captação do ácido benzóico.

Avaliando o desempenho do benzoato de sódio (0,2%) aplicado superficialmente em silagem de milho armazenada em silo trincheira, Da Silva et al. (2014) obtiveram, em relação ao controle, menor perda de MS, maior preservação de carboidratos solúveis e coeficiente de digestibilidade semelhante ao obtido para a silagem do centro da trincheira, sabidamente de melhor qualidade. A estabilidade aeróbia assegurada pelo benzoato de sódio foi significativamente maior (261h) que da silagem controle (92h). Os autores destacam que nos três primeiros dias de armazenamento, os sensores de temperatura alocados nos sacos

traçadores dispostos superficialmente no silo registraram temperaturas elevadas, com máxima de 47°C. Por fim concluem que, frente ao desafio ambiental de regiões quentes, a aplicação de benzoato de sódio na dose 0,2% é adequada para silagens de milho.

2.2.2.2 Nitrito de sódio

O nitrito de sódio, fórmula química NaNO_2 , é um pó branco, com pH 9, ponto de fusão de 280°C e solubilidade em água de 820 g/L a 20 °C. É um produto incombustível, porém, favorece a inflamação de matérias combustíveis. Trata-se de um composto tóxico por ingestão para humanos e muito tóxico para organismos aquáticos, sendo classificado como um contaminante de água. A DL50 em ratazana é de 85 mg/kg (FISPQ - MERCK®, 2016). O nitrito de sódio é empregado na indústria alimentícia de carnes processadas, como agente de cor e conservante (HONIKEL, 2008).

Os compostos formados a partir da redução do nitrito de sódio estão associados ao controle de clostrídios. Woods et al. (1981) observaram que a adição de nitrito a uma suspensão de *Clostridium sporogenes* em meio a base de glicose, levou a um rápido decréscimo na concentração de ATP e ao acúmulo de piruvato, devido à inibição da oxirredutase fosforoclástica. O nitrito não reagiu diretamente com a ferredoxina, mas houve uma redução na atividade da ferredoxina em células pré-incubadas com este aditivo. Dessa forma, os autores concluíram que, apesar do óxido nítrico reagir com a ferredoxina *in vitro*, o principal sítio de inibição no interior da célula microbiana intacta é a reação do óxido nítrico com a enzima piruvato-ferredoxina oxirredutase. Posteriormente, Woods e Wood (1982) reportaram que a adição de nitrito de sódio a uma suspensão de células de *C. botulinum* levou ao acúmulo de ácido pirúvico no meio, sugerindo inibição do sistema fosforoclástico.

O sistema fosforoclástico é responsável pela clivagem oxidativa do piruvato a acetato constituindo a maior via de produção de ATP em nível de substrato para clostrídios. Esse sistema é baseado na atividade das enzimas piruvato-ferredoxina oxirredutase e ferredoxina, que foram testadas *in vitro* e *in vivo* quanto aos efeitos do nitrito de sódio, por Carpenter, Reddy e Conforth (1987). O percentual de inativação *in vitro* da ferredoxina de *C. pasteurianum*, pela aplicação de 0, 500, 1.000 e 1.500 µg/mL foi de 4 a 14%; 36 a 41%; 68 a 79% e 83 a 87%, respectivamente. No estudo *in vivo*, células de *C. pasteurianum* e *C. botulinum* incubadas com 1.000 µg/mL de NaNO_2 apresentaram 94% e 95% de inativação da

ferredoxina, respectivamente. A atividade *in vitro* da piruvato-ferredoxina oxirredutase, em diversas cepas de *C. botulinum* foi reduzida, com inativação de 77 a 84% da oxirredutase em função da incubação com 1.000 µg/mL de NaNO₂. A inativação *in vivo*, observada pela adição da mesma dose em células de *C. botulinum* intactas foi da ordem de 69 a 80%.

Ao extrapolar conhecimentos de qualidade de carne para a conservação de forragens, deve-se considerar que os nitritos e nitratos estão presentes na natureza e, conseqüentemente nas plantas. Os íons amônio (NH₄⁺) e nitrato (NO₃⁻) gerados pela fixação do N atmosférico ou liberados por decomposição da matéria orgânica no solo são capturados rapidamente pelos vegetais. O primeiro passo para assimilação do nitrato é sua redução a nitrito, no citoplasma (Eq. 3), medido pela enzima nitrato redutase. Por ser altamente reativo e tóxico, o nitrito é transportado para o cloroplasto, nas folhas ou para os plastídeos, nas raízes. Nessas organelas, a nitrito redutase reduz o nitrito a amônio (Eq. 4), com participação da enzima Ferredoxina, inicialmente reduzida (Fd_{red}) e depois oxidada (Fd_{ox}). As células vegetais evitarão a toxicidade do amônio convertendo-o em aminoácidos. Todavia, sob concentrações elevadas no solo, que ocorre após a fertilização, a absorção do amônio e do nitrato pode exceder a capacidade de assimilação das plantas, levando ao seu acúmulo nos vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2004).

De forma semelhante aos sistemas cárneos, a revisão de Spoelstra (1995) demonstrou que a fermentação de plantas em silos resulta na degradação parcial ou completa do nitrato, tendo como produtos intermediários nitrito e óxido nítrico e como produtos finais a amônia e óxido nitroso. O autor demonstrou que os intermediários permanecem por pouco tempo na silagem, de uma a duas semanas, sendo que o emurchecimento e a incidência de temperaturas de incubação mais baixas favoreceram a manutenção de nitrito por mais tempo no meio. As enterobactérias são os principais microrganismos redutores de nitrato, com formação de nitrito e depois amônia ou redução do nitrito a óxido nitroso. Algumas bactérias lácticas são capazes de reduzir nitrato, como *L. plantarum* e *L. casei*, com decréscimo de ácido láctico e incremento de ácido acético.

Trabalhando com sistemas cárneos, Scannell et al (2001) observaram que o crescimento de duas cepas de *Lactococcus lactis* e a produção de bacteriocina por elas foram inversamente relacionadas às adições de nitrito de sódio em salames. Obiola et al. (1983) avaliaram o crescimento de *Aspergillus parasiticus* em meio de cultura Sabouraud contendo de 50 a 500 µg de nitrito/ mL. A produção de Aflatoxinas foi média em salsicha de carne suína, contendo 156 ou 200 ppm de nitrito. Os autores observaram que altos níveis de adição de nitrito restringiram o crescimento inicial e a esporulação de *A. parasiticus*, porém, à medida que os níveis de nitrito diminuíram o crescimento do fungo foi estimulado, aumentando a produção de toxinas. Esse resultado foi reforçado pela maior produção de aflatoxina em salsichas contendo 200 ppm de nitrito a 26 °C, comparado àquelas contendo 156 ppm e incubadas à mesma temperatura. No caso das silagens, meios com grande diversidade microbiana, os resultados da aplicação de nitrito de sódio ainda são escassos, podendo ser uma opção para fermentações com risco de proliferação de clostrídios.

Com este intuito, Custodio (2013) avaliou silagens de cana-de-açúcar não tratadas ou aditivadas com 1,5% de cal virgem + 0,07% de nitrito de sódio. A cal, isoladamente, não reduziu perdas nas silagens, em relação ao controle (20,6% vs 19,1%, respectivamente), já o tratamento contendo nitrito gerou menores perdas na fermentação (14,2%). Após exposição aeróbia, as silagens contendo nitrito (223 h) e cal isolada (172 h) foram mais estáveis em comparação à não tratada (51,9 h). Quanto ao efeito sobre o crescimento de clostrídios, as menores contagens foram observadas para silagem controle (3,26 log ufc/g) e o tratamento com nitrito foi intermediário (5,24 log ufc/g) em relação às silagens contendo somente cal (6,74 log ufc/g). Os autores ressaltam que a cal é um aditivo que estimula o crescimento de clostrídios, o que confirma a atuação favorável do nitrito neste trabalho.

Maiores informações sobre a eficácia do nitrito em silagens são necessárias para avaliação desse produto como um potencial aditivo. No entanto, o seu uso deve ser ponderado, com vistas a não comprometer a saúde dos animais, já que pode-se esperar um fornecimento indireto de nitrito via nitrato presente nos alimentos e água. Em uma abordagem extensionista sobre o aumento de nitrato em forragens na Califórnia, Robinson (1998) relata que existe a incorporação natural de nitrato à água, pelo contato com as rochas, mas atribui o seu incremento ao intensivo uso de fertilizantes. Em algumas partes da Califórnia, o principal agravante foram os dejetos animais aplicados continuamente em áreas restritas, o que leva à sua percolação e chegada aos lençóis freáticos. Os ruminantes podem utilizar o nitrato como

um aceptor de elétrons, inclusive com potencial de redução na produção de metano entérico (VAN ZIJDERVELD et al., 2011). Todavia, em níveis elevados a redução do nitrato a nitrito desacoplada de sua conversão a amônia no rúmen, leva ao acúmulo de nitrito. No sistema sanguíneo o nitrito converte a hemoglobina a metemoglobina, incapaz de se ligar ao oxigênio e ineficiente na distribuição do O₂ para os tecidos, inclusive para um possível embrião. Como sintomas em bovinos leiteiros, além do aumento na taxa de abortos, pode-se citar elevação na frequência cardíaca e mucosa azulada, como sinal da oxigenação deficiente (ROBINSON, 1998).

2.2.2.3 Respostas a aditivos químicos em silagens de grãos úmidos de milho

O efeito da aplicação de aditivos químicos em silagens de grãos úmidos de milho foi estudado na meta-análise, por meio de 40 comparações entre silagens controle e tratadas, não tendo sido encontradas na literatura avaliações do efeito isolado de benzoato de sódio e nitrito de sódio. A análise foi feita a partir de um banco de dados único, mas para fins descritivos, os aditivos podem ser categorizados em compostos nitrogenados (n = 7 e doses de 0,12 a 4,58%, MS), ácidos orgânicos e inorgânicos (n=3 e doses de 0,15 a 1,5%, MS), sais não nitrogenados (n=2, na dose 0,12%, MS) e combinações dessas classes de químicos (n=28 e doses de 0,07 a 0,54%, MS), onde o benzoato de sódio apareceu em metade das formulações.

A composição química das silagens tratadas foi modificada em função da aplicação de produtos nitrogenados, com elevação no teor de proteína bruta dos grãos (Tab. 4). Apesar da variação em N-NH₃ não ser significativa, houve um aumento numérico desta variável, acompanhando o incremento em PB. Os teores de cinzas foram maiores em silagens contendo aditivos, provavelmente, em função dos minerais presentes na constituição dos químicos.

O crescimento microbiano foi reduzido nas silagens tratadas, com decréscimos tanto no número de bactérias ácido lácticas, como de leveduras. Como consequência, a menor metabolização de substratos pelos microrganismos poupou açúcares solúveis, cuja concentração final foi superior ao observado para silagens não tratadas. Em função dessa menor extensão da fermentação, o teor de ácido láctico foi inferior, resultando em maior valor de pH para a silagens contendo aditivos. No entanto, o pH de silagens tratadas com químicos deve ser avaliado com cautela por ser reflexo do tipo de aditivo empregado. Por exemplo, a amônia e produtos correlatos, exercem um forte tamponamento da massa ensilada, podendo

Tabela 4 - Base de dados e meta-análise de efeitos da aplicação de aditivos químicos em silagens de grãos úmidos de milho

Item	Banco de dados					Tratamento		EPM	P
	n	Média	DP	Mínimo	Máximo	Controle	Químico		
MS, %	62	66,2	3,82	59,8	74,8	65,8	66,6	0,6876	0,02
Cinzas, %MS	26	1,52	0,15	1,33	1,91	1,46	1,58	0,04	0,01
FDN, %MS	24	9,97	0,68	7,92	10,7	9,95	9,99	0,20	0,59
FDA, %MS	24	3,97	1,23	2,28	5,74	3,98	3,97	0,36	0,85
Hemicelulose, % MS	24	5,99	1,19	4,24	7,62	5,97	6,02	0,35	0,35
Amido, %MS	40	71,3	5,18	59,3	79,7	71,1	71,4	1,17	0,44
Extrato etéreo, %MS	14	4,33	0,83	3,48	6,62	4,55	4,11	0,32	0,36
PB, %MS	36	9,58	2,99	5,73	20,2	8,89	10,3	0,69	0,04
N-NH ₃ , %MS	40	0,05	0,11	0,00	0,50	0,03	0,08	0,02	0,21
Proteína solúvel, %PB	6	52,0	2,17	47,7	53,2	53,2	50,8	1,13	0,28
CS, %MS	20	0,98	0,40	0,10	1,52	0,83	1,13	0,12	<0,01
pH	74	4,41	0,72	3,70	8,30	4,31	4,51	0,12	0,08
Ácido láctico, %MS	78	1,24	0,71	0,02	2,65	1,40	1,08	0,11	<0,01
Ácido acético, %MS	78	0,49	0,28	0,00	1,60	0,52	0,46	0,05	0,15
Ácido propiônico, %MS	64	0,10	0,25	0,00	1,83	0,02	0,19	0,04	<0,01
Ácido butírico, %MS	24	0,02	0,03	0,00	0,07	0,03	0,02	0,01	0,23
Etanol, %MS	58	0,69	0,91	0,00	4,40	0,95	0,43	0,16	<0,01
Lático/Acético	78	3,79	3,33	0,00	11,3	3,82	3,77	0,58	0,88
BAL, log ufc/g	6	2,25	0,23	2,00	2,45	2,45	2,04	0,03	0,01
Leveduras, log ufc/g	20	3,35	1,19	0,57	4,69	4,06	2,65	0,31	<0,01
Perdas fermentativas, %	10	1,42	1,19	0,58	4,10	1,67	1,18	0,55	0,11
Estabilidade aeróbia, h	52	125	112	21	500	59	190	18	<0,01

resultar em elevados valores de pH (KUNG Jr et al., 2003). Esse tipo de resposta foi obtida nos trabalhos de Dutton e Otterby (1971), Prigge (1976) e de Jobim et al. (2008), influenciando as médias obtidas nesta metanálise. De qualquer forma é necessário ponderar sobre os benefícios da aditivação e o risco de obtenção de faixas de pH não restritivos ao crescimento de microrganismos patogênicos, como os clostrídios.

Apesar da redução em ácido lático e da similaridade na produção de ácido acético, a relação lático:acético não variou. As perdas fermentativas foram similares e podem ser consideradas mínimas, por serem menores que 2% da MS, em ambas as silagens. O teor de etanol foi reduzido com a presença de químicos, o que pode ser atribuído à baixa contagem de leveduras. A eliminação indiscriminada de microrganismos pode ocorrer sob uso de químicos, visto que tanto o número de bactérias ácido lácticas como de leveduras foram significativamente reduzidos. O eficiente controle fúngico resultou no maior incremento em estabilidade aeróbia, dentre os aditivos explorados nesta meta-análise.

2.3 Implicações fisiológicas do aumento da disponibilidade do amido para ruminantes

Os grãos são utilizados na alimentação de ruminantes com o principal objetivo de fornecer energia para os animais e essa energia provém, principalmente, do amido. Para maximizar a utilização do amido pelos ruminantes tem-se investido em técnicas de processamento (moagem, floculação, ensilagem de grãos com alta umidade, etc) que buscam aumentar a digestibilidade total do amido e evitar a excreção de grandes quantidades de amido nas fezes (OWENS; SODERLUND, 2006).

As técnicas de processamento dos grãos se diferenciam quanto à quantidade de amido que é disponibilizada no rúmen ou que escapa à fermentação ruminal e atinge o intestino delgado. Owens e Soderlund (2006) reiteram que quando se compara o milho moído seco ou o grão inteiro com o milho floculado ou ensilado com alta umidade, admite-se um maior escape de amido para intestino delgado para os dois primeiros, entretanto, esse amido é digerido com maior dificuldade nesse sítio, o que hipoteticamente, pode contribuir para o aumento das perdas fecais de amido. Fredin et al. (2014) ressaltam que a quantidade de amido presente nas fezes de vacas em lactação além de representar perda econômica é um forte indicador da digestibilidade total do amido no trato digestivo. A digestibilidade intestinal do amido tende a diminuir à medida que aumenta o fluxo de amido para o intestino delgado.

O tipo de processamento dos grãos altera sensivelmente o sítio de digestão do amido. Owens e Soderlund (2006) traçou um comparativo entre o milho grosseiramente moído e o milho grão úmido fermentado, no tocante ao local e a extensão da digestão. Sumarizando os resultados de milho seco em relação ao fermentado, para vacas em lactação, teve-se: amido digerido no rúmen do total ingerido (49,20 *vs* 76,34%); amido digerido no intestino delgado do total que atinge o ID (48,4 *vs* 57,75%); amido digerido no ID do total de amido consumido pelo animal (26,62 *vs* 9,84%); amido digerido no intestino grosso do total de amido ingerido pelo animal (8,55 *vs* 3,03) e do total que chega até o IG (42,0 *vs* 51,58) e digestibilidade total do amido no trato digestório (89,95 *vs* 95,99).

Devido às diferenças entre a taxa de retenção da digesta no trato digestivo, bovinos de corte em terminação podem apresentar valores de digestibilidade intestinal de amido (% do total ingerido) presente nos grãos úmidos de milho na ordem de 94,86% e digestibilidade total de 99,25%. A maior ingestão de alimentos determina maiores taxas de passagem, o que implica em diminuição no tempo para a hidrólise do amido e isso limita a digestibilidade total do mesmo. Dessa maneira, vacas leiteiras tendem a ter menor digestibilidade do amido quando comparadas aos bovinos de corte em todos os seguimentos do trato digestivo (OWENS; ZINN; KIM, 1986; OWENS; SODERLUND, 2006).

Diversos autores têm trabalhado com o impacto de se aumentar a disponibilidade ruminal de amido, por meio de técnicas de processamento dos grãos, sobre o ambiente ruminal. Segundo Alvarez et al. (2001) a mudança da fonte suplementar de amido sob a forma de milho quebrado ou de milho ensilado com alta umidade para vacas leiteiras em pastagens temperadas, não afetou o pH ruminal bem como a produção de ácidos graxos voláteis e a relação acetato:propionato, concordando com Knowlton; Glenn e Erdman (1998). Alvarez et al. (2001) relataram uma mudança na utilização dos compostos nitrogenados presentes no rúmen. Os animais alimentados com o grão úmido de milho apresentaram menor concentração de amônia o que indica uma melhor sincronização entre a fermentação de carboidratos e do nitrogênio, sendo esse um indício de uma maior síntese de proteína microbiana. Abedelhadi e Santini (2006) também relatam menores concentrações de amônia no fluido ruminal de novilhos de corte em pastagem temperada suplementados com grãos úmidos de sorgo ensilados.

No experimento de Alvarez et al. (2001) a cinética de degradação ruminal do amido foi completamente alterada com o processamento dos grãos, fração solúvel *a* (42,53 *vs* 1,29);

fração insolúvel potencialmente degradável *b* (43,59 *vs* 88,4) e total potencialmente digestível (86,32 *vs* 89,69). Quando consideramos a digestibilidade total do amido, o milho ensilado com alta umidade apresentou melhores resultados comparado ao milho quebrado (90,29 *vs* 86,87), entretanto não foram observados ganhos em produção, composição do leite e melhoria na condição corporal das vacas.

Abdelhadi, Santini e Gagliostro (2004) ao trabalhar com novilhas de corte em pastagem de alta qualidade suplementadas com silagem de milho ou grão úmido observaram aumento no consumo total de matéria seca e energia metabolizável para os animais suplementados com grão úmido. A respeito do ambiente ruminal os autores relatam maior pH para os animais suplementados com silagem de milho quando comparados aos animais em pastejo e suplementados com grão úmido. A mudança de pH, entretanto, não refletiu em diferenças na produção total de ácidos graxos voláteis, na proporção de acetato, propionato e butirato e na relação acetato:propionato. Abdelhadi e Santini (2006) também relataram pouca alteração na produção e proporção de AGVs para novilhos de corte a pasto suplementados com grãos úmidos de sorgo ensilados.

A mudança na disponibilidade do amido no rúmen pode alterar o perfil hormonal e metabólico de vacas em lactação bem como a composição lipídica do leite. Nesse contexto, Bradford e Allen (2004) avaliaram dietas de grão úmido e milho moído seco (31,6% de amido e 25,6% de FDN) sobre o perfil metabólico e a composição lipídica do leite. Os autores relatam que a mudança no processamento dos grãos refletiu em alteração no perfil metabólico das vacas. Os animais alimentados com grão úmido apresentaram maiores níveis de plasmáticos de glicose, ácidos graxos não esterificados e triglicerídeos. Não foram observadas diferenças para o β -hidroxibutirato, insulina e glucagon. Por outro lado, Moriel et al. (2008) relataram efeito da suplementação com grão úmido de milho e o aumento no nível de insulina plasmática. A aparente desconexão entre o aumento da glicose e a não alteração no nível de insulina (BRADFORD; ALLEN, 2004) não pode ser facilmente explicada e discorda de Annison; Bickerstaffe e Linzell (1974), que atribuem ao aumento na disponibilidade de glicose a partir do aumento na digestibilidade ruminal ou intestinal do amido um acréscimo na secreção de insulina com possíveis efeitos sobre a lipogênese no tecido adiposo.

Com relação à composição do leite, Bradford e Allen (2004) relatam que o milho grão úmido reduziu o percentual de gordura sem alterar os níveis de proteína e lactose. A composição (g/100g de gordura) lipídica do leite foi alterada pela mudança na dieta: os ácidos

graxos de cadeia curta ($C_4 - C_8$) e longa ($>C_{16}$) não foram alterados, os ácidos graxos de cadeia média ($C_{10} - C_{14}$) diminuíram com a utilização de grão úmido, os ácidos graxos insaturados aumentaram com a dieta de grão úmido, com destaque para o aumento de 18:2, *cis*-9, *trans*-11. Nesse experimento a redução do percentual de gordura no leite não pôde ser explicada pela insulina, uma vez que não houve diferença entre os tratamentos para esse hormônio, apesar de ter sido observado o aumento no nível plasmático de glicose. Por essa teoria o aumento da insulina favoreceria a deposição de gordura no tecido adiposo e diminuiria a disponibilidade de ácidos graxos na glândula mamária. Aparentemente a diminuição da gordura no leite nesse experimento está intimamente relacionada ao aumento na quantidade de ácidos graxos insaturados no leite.

Resultado discordante foi encontrado por Canizares et al. (2011) ao trabalhar com diferentes níveis de substituição do milho moído seco pelo milho ensilado com alta umidade. Os autores não observaram diferenças significativas no tocante à produção e a composição do leite de cabras Alpinas em lactação consumindo dietas com CNF acima de 40%, nesse caso o consumo de matéria seca também não foi influenciado pelos tratamentos.

O consumo de matéria seca sofre regulação de diversos fatores amplamente discutidos na literatura. O NRC (2001) atribui às exigências energéticas o papel de fator primário que limitaria o consumo de alimentos. Bradford e Allen (2007) conduziram um experimento procurando investigar como o consumo de matéria seca responde ao aumento na fermentabilidade do amido e como essa variável pode ser predita a partir de metabólitos sanguíneos. Os autores observaram que a utilização do grão de milho úmido ensilado comparado ao milho moído seco causou a diminuição do consumo de matéria seca (-2,0kg) e aumento da digestibilidade total do amido, da digestibilidade da matéria seca e da matéria orgânica sem efeitos diretos sobre a digestibilidade da fração fibrosa.

No experimento de Bradford e Allen (2007) a variação individual na ingestão de alimentos foi muito grande, vacas consumindo milho de alta umidade chegaram a aumentar 0,9 kg/d e decrescer 6,0 kg/d. Apesar da aparente relação entre o nível de glicose plasmática e da insulina, o estudo mostra que apenas a insulina se correlaciona diretamente com a diminuição do consumo de alimentos, os autores observaram coeficiente de correlação de Pearson de -0,54 para o nível plasmático de insulina e o CMS ($P<0.01$). Para a glicose não foi evidenciada relação entre os dois fatores, com coeficiente de correlação de -0,04 ($P=0,82$). Outros metabólitos também não apresentaram correlação e não servem como preditores

adequados do consumo de matéria seca por vacas em lactação, é o caso do β -hidroxibutirato, leptina e ácidos graxos não esterificados.

Ferrareto; Krump e Shaver (2013) procuraram analisar conjuntamente os dados publicados na literatura entre os anos de 2000 e 2011 no tocante ao aproveitamento do amido por vacas em lactação. Como era de se esperar a digestibilidade ruminal do amido diferiu sensivelmente ($P=0,001$) entre os grãos de cereais: 78,9; 70,6 e 54,1% para trigo, cevada e milho respectivamente. Entretanto para a digestibilidade total do amido não houve alteração para os diferentes tipos de grãos, a média para essa variável foi de 93,1% ($P=0,80$). Os autores ainda relatam mudanças em desempenho com a variação no tipo de grão. A diferença existente na digestibilidade ruminal do amido para os tipos de cereais (trigo, cevada e milho) pode levar à suposição de que as técnicas de processamento do grão de milho alterariam a fermentabilidade do amido rúmen. No trabalho de Ferrareto; Krump e Shaver (2013), não foram encontradas evidências que a técnica de processamento influenciaria na disponibilidade ruminal do amido ($P=0,12$), apesar da discrepância de valores (53,6; 64,1; 58,5%) para a digestibilidade ruminal do amido dos milhos seco, ensilado e floculado. O resultado foi atribuído à grande variabilidade dos dados. Se não houve diferença para a digestibilidade ruminal do amido, a digestibilidade total foi afetada pela técnica de processamento ($P=0,001$) do milho: seco (92,0%), grão úmido (94,2%) e floculado (93,9%), sendo que o grão úmido e o floculado não diferiram entre si.

Do ponto de vista energético é mais interessante que o amido seja digerido no intestino delgado quando comparado ao rúmen ou intestino grosso, devido às perdas de energia na forma de calor e metano, porém se a digestibilidade intestinal do amido estiver abaixo de 70% nenhum benefício energético será obtido com o aumento do escape ruminal de amido (OWENS; ZINN; KIM, 1986; OWENS; SODERLUND, 2006). A eficiência energética é maior quando a glicose é infundida no abomaso ou diretamente no intestino delgado comparado à infusão ruminal (HARMON; MCLEOD, 2001; HUNTINGTON et al., 2006). Por outro lado, a recuperação da glicose infundida no intestino delgado na circulação portal nunca é completa, indicando utilização. Há evidências que a deposição de gordura omental aumenta com a infusão de glicose no abomaso de ovinos (OWENS; SODERLUND, 2006) ou no intestino delgado de bovinos (MCLEOD, HARMON, 2006). Nesse caso, o aumento da glicose no abomaso ou intestino delgado é falho em aumentar massa muscular ou peso de carcaça, porém eficiente em aumentar a gordura visceral.

A lipogênese feita diretamente pelo intestino ou pelo omento pode explicar porque a glicose absorvida pelo epitélio intestinal não é completamente recuperada na circulação portal. Se a infusão de glicose no intestino delgado promove o aumento da deposição de gordura visceral (omento e mesentério), dietas que favoreçam alto escape de amido para o intestino delgado poderão mostrar-se ineficientes para a promoção do aumento de ganho de peso e produção de leite, apesar de evitar as perdas energéticas (calor e metano) associadas à fermentação ruminal (OWENS; SODERLUND, 2006).

2.3.1 Desempenho de vacas leiteiras alimentadas com silagens de grãos úmidos

Trabalhando com grãos de milho reidratados, Bitencourt (2012) avaliou a resposta no desempenho de vacas leiteiras à substituição de milho moído (textura dura) pelo mesmo híbrido reidratado e ensilado. O procedimento de confecção da silagem consistiu em moagem (2mm), seguida de reidratação (43,7% de umidade) e fermentação por 358 dias, com uso de inoculante contendo bactérias homofermentativas. O autor relata que praticamente não houve diferenças nas variáveis de desempenho (CMS, CMO, produção de leite, composição do leite, eficiência alimentar e condição corporal) quando se compara milho moído e milho reidratado. A concentração de nitrogênio ureico no leite foi menor nos animais consumindo milho reidratado, indicando melhor utilização do nitrogênio ruminal e melhor sincronização entre a fermentação de carboidratos e compostos nitrogenados. A oferta de milho para os animais foi de 16,7% MS para o grão reidratado e 17,7% MS para o milho seco.

Oba e Allen (2003) avaliaram duas inclusões de amido (32 vs 21%) em dietas contendo silagem de grãos úmidos ou milho moído. O tamanho médio de partículas dos grãos úmidos e secos foram de 1.863 e 885 μm , respectivamente sendo que o primeiro apresentou umidade de 36,8%. O CMS foi menor para o grão úmido em dietas de alto amido, com redução de 7,6%. Os autores atribuíram essa diferença ao menor tamanho de refeição, uma vez que a rápida fermentação teria gerado saciedade rapidamente, com tamanho de refeição menor para a alta inclusão de amido. Houve similaridade de consumo para a dieta de baixo amido. A produção de leite foi maior quando as vacas foram alimentadas com dietas ricas em amido em comparação a dietas de baixo amido (38,6 vs 33,9 kg / d), independentemente do tratamento dos grãos de milho. As dietas ricas em amido aumentaram a produção de leite corrigida para sólidos em 3,3 kg (35,2 vs 31,9 kg/d) quando as vacas foram alimentadas com milho seco, o que não foi observado em vacas comendo grãos ensilados. Esse fato foi

atribuído à concentração de gordura mais baixa no leite de vacas alimentadas com grão úmido na dieta de alto amido, cuja redução no teor foi da ordem de 15%.

Com relação à influência do tamanho de partículas de grãos úmidos e do número de arraçoados dos animais por dia, San Emeterio et al. (2000) contrastaram dietas contendo milho laminado grosseiramente ou fino, bem como os seus pares ensilados, com umidade de 31,9%. Quando estas dietas foram fornecidas uma vez ao dia, a produção de leite e o consumo de MS não variaram. O teor de gordura do leite tendeu a ser menor, com queda mais pronunciada para moagem fina. Houve decréscimo significativo de nitrogênio ureico no leite de vacas alimentadas com grão úmido. Quando a alimentação foi dividida em dois fornecimentos diários, o consumo não variou, porém, a produção de leite foi aumentada para os tratamentos com milho ensilado. O milho moído grosseiramente e ensilado gerou um aumento de produção significativo, comparado a seu par seco (39,3 vs 37,2 kg/dia). Sob moagem fina, o aumento foi numérico (40,3 vs 38,9 kg/dia). Houve decréscimo no teor de gordura do leite e maior produção diária de proteína, além do decréscimo em NUL para dietas com grãos fermentados. A maior produção leiteira foi atribuída à maior disponibilidade de carboidratos fermentáveis no rúmen.

No estudo de Wu et al. (2001) os suplementos contrastados foram a silagem de grãos úmidos de milho e o milho quebrado, com um consumo diário 10.5 ± 0.4 kg/d e 10.7 ± 0.3 , respectivamente. Vacas consumindo grãos úmidos apresentaram produção leiteira diária 2,4 kg maior que aquelas consumindo milho quebrado ($P=0,05$). Porém, a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura foi semelhante entre os tratamentos (22,1 e 21,4 kg/dia; $P=0,66$), uma vez que o milho úmido resultou em menor percentual de gordura (3,28%) comparado ao milho quebrado (3,67%), $P=0,02$. Tanto a porcentagem quanto a produção de proteína foram maiores para o milho grão úmido (3,26% vs 3,15% e 0,77 kg/dia vs 0,68 kg/dia, respectivamente), $P<0,10$.

A suplementação de vacas em pastejo com 6 kg/dia de grãos úmidos de milho foi testada por Soriano, Polan e Miller (2000) em comparação ao fornecimento do milho moído fino ou grosso. O pastejo era realizado em uma área de gramíneas temperadas mistas, não sendo observadas diferenças no desempenho dos animais ($P>0,05$) cuja produção média de leite corrigido para 3,5% de gordura foi de 27,6 kg/ dia. As produções médias de gordura e proteína obtidas neste ensaio foram de 1,0 e 0,9 kg/dia, respectivamente.

Ferrareto; Krump e Shaver (2013) relataram mudanças nas variáveis de desempenho a partir do estudo metanalítico do efeito de grãos processados. O consumo de matéria seca foi menor nos experimentos utilizando grãos úmidos ensilados (22,4 kg/d) quando comparado ao milho seco (23,6 kg/d) e o milho floculado (23,4 kg/d). Para a produção de leite em kg/d não houve efeito de tratamento (média 35,5kg/d), entretanto quando se corrige a produção de leite para 4% de gordura, menores valores são demonstrados quando se utiliza o milho ensilado (32,1 kg) comparado aos demais tipos de processamento, indicando redução na quantidade de gordura no leite. A medida de eficiência kg de leite/CMS foi maior nos tratamentos com milho ensilado.

Quanto ao uso de aditivos, no estudo de Schaefer et al. (1989) o emprego de aditivo microbiano contendo *Pedococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* e *Streptococcus faecium* em silagens de grão úmido de milho (SGUM) desencadeou alterações fermentativas na massa, mas não refletiu em diferenças na conversão alimentar de bovinos em crescimento e em terminação.

REFERÊNCIAS

- ABDELHADI, L.O.; SANTINI, F.J. Corn silage versus grain sorghum silage as a supplement to growing steers grazing high quality pastures: effects on performance and ruminal fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 127, p. 33-43, 2006.
- ABDELHADI, L.O.; SANTINI, F.J. ;GAGLIOSTRO, G.A. Corn silage or high moisture supplements for beef heifers grazing temperate pastures: effects on performance, ruminal fermentation and in situ pastures digestion. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 118, p. 63-78, 2005.
- ADDAH, W.; BAAH, J.; OKINE, E.K.; McALLISTER, T.A. A third-generation esterase inoculant alters fermentation pattern and improves aerobic stability of barley silage and the efficiency of body weight gain of growing feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, p. 1541–1552, 2012.
- ALVAREZ, H.J.; SANTINI, F.J.; REARTE, D.H.; ELIZALDE, J.C. Milk production and ruminal digestion in lactating dairy cows grazing temperate pastures and supplemented with dry cracked corn or high moisture corn. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 91, p. 183-195, 2001.

ANNISON, E.F.; BICKERSTAFFE, R.; LINZELL, L. Glucose and fatty acid metabolism in cows producing milk of low fat content. **Journal of Agriculture Science**, Cambridge, vol.82, p. 87–95, 1974.

AUERBACH, H.; WEBER, U.; WEBER, G.; WEISS, K.; THEOBALD, P. Effects of different chemical additives on the fermentation and aerobic stability of high-moisture corn ensiled in bags. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 17, 2015, Piracicaba. **Proceedings...** Rio das Pedras, SP: Grafica Riopedrense, 2015. p. 542-543.

BAIRD-PARKER, A.C. Organic acids. In: SILLIKER, J.H., (Ed.). **Microbial Ecology of Foods**, Academic Press, New York, 1980. v.1, 126p.

BASSO, F.C.; BERNARDES, T.F.; ROTH, A.P.T.P.; RABELO, C.H.S.; RUGGIERI, A. C.; REIS, R.A. Fermentation and aerobic stability of high-moisture corn silages inoculated with different levels of *Lactobacillus buchneri*. **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, v. 41, p. 2369-2373, 2012.

BENTON, J.R.; KLOPFENSTEIN, T.J.; ERICKSON, G.R. Effects of corn moisture and length of ensiling on dry matter digestibility and rumen degradable protein. **Nebraska Beef Cattle Reports**, Lincoln, v. 151, p. 31-33, 2005.

BERNARDES, T.F.; De OLIVEIRA, I.L.; LARA, M.A.S.; CASAGRANDE, D.R.; ÁVILA, C.L.S.; PEREIRA, O.G. Effects of potassium sorbate and sodium benzoate at two application rates on fermentation and aerobic stability of maize silage. **Grass and Forage Science**, Malden, v. 70, p. 491–498, 2015.

BÍRO, D.; JURÁČEK, M.; GÁLIK, B.; ŠIMKO, M.; KAČÁNIOVÁ, M. Influence of chemical inhibitors on fermentation process and hygienic quality of high moisture corn. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, p. 108-112, 2006.

BÍRO, D.; GÁLIK, B.; JURÁČEK, M.; ŠIMKO, M.; STRAKOVÁ, E.; MICHÁLKOVÁ, J.; GYÖNGYOVÁ, E. Effect of biological final nutritive, hygienic and fermentation characteristics of ensiled high moisture crimped corn. **Acta Veterinaria Brno**, Palackého, v. 78, p. 691-698, 2009.

BITENCOURT, L.L. **Substituição de milho moído por milho reidratado e ensilado ou melaço de soja em vacas leiteiras / Luciene Lignani Bitencourt**. 2012. 130p. – Tese de Doutorado, Universidade Federal de Lavras, 2012.

BOTHAST, R.J.; ADAMS, G.H.; HATFIELD, E.E.; LANCASTER, E.B. Preservation of high moisture corn: a microbiological evaluation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 58, n. 3, p. 386-391, 1975.

BRADFORD, B.J. ALLEN, M.S. Depression in feed intake by a highly fermentable diet is related to plasma insulin concentration and insulin response to glucose infusion. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 3838–3845, 2007.

BRADFORD, B.J.; ALLEN, M.S. Milk fat responses to a change in diet fermentability vary by production level in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, p. 3800–3807, 2004.

BRITT, D.G.; HUBER, J.T. Preservation of and animal performance on high moisture corn treated with ammonia or propionic acid. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 59, p. 668-674, 1976.

CANIBE, N.; KRISTENSEN, N.B.; JENSEN, B.B.; VILS, E. Impact of silage additives on aerobic stability and characteristics of high-moisture maize during exposure to air, and on fermented liquid feed. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 116, p. 747-760, 2013.

CANIZARES, G.I.L.; GONÇALVES, H.C.; COSTA, C.; RODRIGUES, L. ;MENEZES, J. J.L.; GOMES, H.F.B.; MARQUES, R.O.; BRANCO, R.H. Use of high moisture corn silage replacing dry corn on intake, apparent digestibility, production and composition of milk of dairy goats. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n.4, p. 860-865, 2011.

CARPENTER, C.E.; REDDY, D.S.A; CORNFORTH, D.P. Inactivation of clostridial ferredoxin and pyruvateferredoxin oxidoreductase by sodium nitrite. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, p. 549, 1987.

CARVALHO, P.A.; BIGATON, A.D.; FERNANDES, J.; SANTOS, M.C.; DANIEL, J.L.P.; DUARTE, A.P. Shifts on bacterial population of high moisture corn silages and its correlation with fermentation end-products. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 17, 2015, Piracicaba. **Proceedings...** Rio das Pedras, SP: Grafica Riopedrense, 2015. p. 556-557.

CARVALHO, P.A. **Influência de genótipo e maturidade na diversidade microbológica em milho grão para silagem**. Piracicaba, 2014. 95p: il. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

CHIPLEY, J.R. **Antimicrobials in food**. 3rd ed. Edited by P. Michael Davidson, John N. Sofos, A.L. Branen, p. 11-48, 2005.

CLARK, J.H.; FROBISH, R.A.; HARSHBARGER, K.E.; DERRIG, R.G. Feeding value of dry corn, ensiled high moisture corn, and propionic acid treated high moisture corn fed with hay or haylage for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 56, n. 12, p. 1531-1539, 1973.

CLARK, J.H.; CROOM, W.J.; HARSHBARGER, K.E. Feeding value of dry, ensiled, and acid treated high moisture corn fed whole or rolled to lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 58, n. 3, p. 907-916, 1975.

CONDON, S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. **FEMS Microbiology**, Lausanne, v. 46, p. 269-280, 1987.

COSTA, C.; ARRIGONI, M.B.; SILVEIRA, A.C.; CHARDULO, L.A.L. Silagem de grãos úmidos. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 7., 1999. Local. **Anais...** local: editora, 1999. p.69-87.

COUDURE, R.J.G.; CAZAUX, F. ;SKIBA, E. ;CHEVAUX, V.; DEMEY, J. ;SINDOU. 2012. The effect of *Lactobacillus buchneri* alone or in association with *Lactobacillus plantarum* on the fermentation and aerobic stability of high moist corn ensiled as whole grain or ground grain. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 16., 2012 Hämeenlinna, Finland. **Proceedings...** Hämeenlinna, Finland, 2012. p.434-435.

CRUESS, W.V.; RICHERT, P.H. Effect of hydrogen ion concentration on the toxicity of sodium benzoate to microorganisms. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 17, p. 363, 1929.

CUMMINS, C.S.; JOHNSON, J.L. The genus *Propionibacterium*. In: BALOWS E, TRUPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER. K.H. (Ed.). **The prokaryotes**. London, Springer Verlag, 1992.

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

DANIEL, J.L.P.; MORAIS, G.; FERNANDES, J.; CARVALHO, P.A.; NUSSIO, L.G. Additives in high moisture grain silages: A meta-analysis. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON BEEF CATTLE. 2012, São Pedro, SP. **Proceedings...** 2012, São Pedro, SP. Disponível em CD-ROM. 2012, 21p.

Da SILVA, N.C.; AGUIAR, A.C.R.; RESENDE, F.D.; SIQUEIRA, G.R. Influence of storage time and use of inoculant *L. buchneri* on aerobic stability of highmoisture corn and rehydrated corn silages. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 17, 2015, Piracicaba. **Proceedings...** Rio das Pedras, SP: Grafica Riopedrense, 2015. p. 550-551.

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

Da SILVA, T.C.; SMITH, M.L.; BARNARD, A.M.; KUNG JR, L. The effect of a chemical additive on the fermentation and aerobic stability of high moisture corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, p. 8904-8912, 2015.

DAVIES, D.R.; FYCHAN, R.; THEOBALD, V.J.; BAKEWELL, E.L.; SCOTT, M.B. 2009. Comparison of three additive treatments on crimped grain wheat and maize silage quality. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 15, **Proceedings...** Madison, USA, 225-226.

DAWSON, T. E.; RUST, S. R.; YOKOYAMA, M.T. Improved fermentation and aerobic stability of ensiled, high moisture corn with the use of *Propionibacterium acidipropionici*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, p. 1015-1021, 1998

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

DOLEŽAL, P.; MLEJNKOVÁ, V.; SZWEDZIAK, K.; ZEMAN, L.; TUKIENDORF, M. 2014. The effect of biological inoculant and chemical additives on fermentation characteristics and nutritive value of high moisture mechanically treated corn silage. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF FORAGE CONSERVATION, 16, **Proceedings...** Brno, Czech Republic, 137-138.

DOLEŽAL, P.L. ZEMAN. Effect of different forms of bacterial inoculants on the fermentation process of ensiled crushed maize moisture grains. **Czech Journal of Animal Science**, Kamýcká, v.50, p.201–207. 2005.

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

DUTTON, R.E.; OTTERBY, D.E. Nitrogen additions to high moisture corn and its utilization by ruminants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, p. 1645-1651, 1971.

FERNANDES, J. **Influência de genótipo, maturidade e tempo de armazenamento na qualidade de silagens de grãos de milho com alta umidade**. 2014. 97p: il. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Piracicaba, 2014.

FERRARETTO, L. F.; CRUMP, P. M.; SHAVER, R. D. Effect of cereal grain type and corn grain harvesting and processing methods on intake, digestion, and milk production by dairy cows through a meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 96, p. 533–550, 2013.

FERRARETTO, L.F.; FREDIN, S. M.; SHAVER, R. D. Influence of ensiling, exogenous protease addition, and bacterial inoculation on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated and high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, p. 7318-7327, 2015.

FISPOQ MERCK. Benzoato de sódio. **Disponível em:** <https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Sodio-benzoato,MDA_CHEM-106290>. Acesso em: 10 fev. 2016

FISPOQ MERCK. Nitrito de sódio. **Disponível em:** <http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Nitrito-de-s%C3%B3dio,MDA_CHEM-106549#anchor_Informações_sobre_o_produto>. Acesso em 10 fev. 2016.

FLORES-GALARZA, R. A.; GLATZ, B. A.; BERN, C. J.; VAN F, L. D. Preservation of high-moisture corn by microbial fermentation. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.48, p. 407-411, 1985.

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

GÁLIK, B.; BÍRO, D.; JURÁČEK, M.; ŠIMKO, M. Influence of silage additives on fermentation of high moisture crimped corn. **Journal of Central European Agriculture**, Zagreb, v. 9, p. 439-444, 2008.

GÁLIK, B.; BÍRO, D.; JURÁČEK, M.; ŠIMKO, M.; MICHÁLKOVÁ, J. Effect of combined biochemical additives on nutritive value and fermentation process of ensiled crimped high moisture corn. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 40, p. 30-33, 2007.

GALLO, M.; RAJCAKOVA, L.; MLYNAR, R. The effect of different treatments on fermentation of high moisture corn silage. **In:** International Silage Conference. 17, 2015, Piracicaba. **Proceedings**, Rio das Pedras, SP: Grafica Riopedrense, 2015. p. 544-545.

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

GOERING, H. K.; GORDON, C. H. Chemical aids to preservation of high moisture feeds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 56, p. 1347-1351, 1973.

HAMAKER, B.R.; MOHAMED, A.A.; HABBEN, J.E.; HUANG, C.P.; LARKINS, B.A. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin

contents than the conventional method. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.72, p.583–588, 1995.

HAMMES, W.P.; VOGEL, R.F. The genus *Lactobacillus*. In: WOOD-BRIAN, J.B.; HOLZAPFEL, W.H. **The genera of Lacti Acid Bacteria**. London: Blackie, 1995. p.19-54.

HARMON, D. L.; McLEOD, K, R. Glucose uptake and regulation by intestinal tissues: Implications and whole-body energetics. **Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 79, p. 59-72, 2001.

HARMON, D. L.; McLEOD, K.R. Factors influencing assimilation of dietary starch in beef cattle. In: **Plains nutrition council meeting**, Texas A&M University AREC 05-20, 69-89. 2005.

HICKS, R.B.; LAKE, R.P. High moisture corn: receiving, processing, storage, and inventory control at Hitch. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON BEEF CATTLE. 2012, São Pedro, SP. **Proceedings...** 2012, São Pedro, SP. Disponível em CD-ROM. 2012, 11p.

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

HOFFMAN, P.C.; MERTENS, D.R.; LARSON, J.; COBLENTZ, W.K.; SHAVER, R.D. A query for effective mean particle size in dry and high-moisture corns. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.95, p.3467–3477. 2012.

HONIKEL, K-O. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. **Meat Science**, Cowra, v.78, p. 68 – 76, 2008.

HORTON, G.M.J.; HOLMES, W. Feeding value of whole and rolled propionic acid treated high moisture corn for beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 40, p. 706-713, 1975.

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

ÍTAVO, C.C.B.F.; MORAIS, M.G.; ÍTAVO, L.C.V.; SOUZA, A.R.D.L.; DAVY, F.C.A.; ALBERTINI, T.Z.; COSTA, C.; LEMPP, B.; JOBIM, C.C. Padrão de fermentação e composição química de silagens de grãos úmidos de milho e sorgo submetidas ou não a inoculação microbiana. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, p. 655-664, 2006.

ÍTAVO, C.C.B.F.; MORAIS, M.G.; ÍTAVO, L.C.V.; SOUZA, A.R.D.L.; DAVY, F.C.A.; BIBERG, F.A.; ALVES, W.B.; SANTOS, M.V. Consumo e digestibilidade de nutrientes de dietas com silagens de grãos úmidos de milho ou sorgo, em ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, p. 452-459, 2009.

JOBIM, C.C.; LOMBARDI, L.; MACEDO, F.A.F.; BRANCO, A.F. Silagens de Grãos de Milho Puro e com Adição de Grãos de Soja, de Girassol ou Ureia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, p.649-656, 2008.

JASPER, S.P.; SEKI, A.S.; SILVA, P.R.A.; BIAGGIONI, M.A.M.; BENEZ, S.H.; COSTA, C. Comparação econômica da produção de grãos secos e silagem de grãos úmidos de milho cultivado em sistema de plantio direto. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.33, p.1385-1391, 2009.

JONES G.M. Preservation of high moisture corn with volatile fatty acids. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 50, p. 739-741, 1970.

JONES, G.M. Performance of dairy cows fed propionic acid-treated high-moisture shelled corn rations for complete lactations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 56, p. 207-211, 1972.

JONES, G.M.; DONEFER, E.; ELLIOT, J.I. Feeding value for dairy cattle and pigs of high moisture corn preserved with propionic acid. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 50, p. 483-489, 1970.

JONES, G.M.; MOWAT, D.N.; ELLIOT, J.I.; MORANT E.T. Organic acid preservation of high moisture corn and other grains and the nutritional values: a review. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 54, n. 4, p. 499-517, 1974.

JUNGES, D.; MORAIS, G.; DANIEL, J.L.P. ; SPOTTO, M.H.F. ; NUSSIO, L.G. Contribution of proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 17, 2015, Piracicaba. **Proceedings...** Rio das Pedras, SP: Grafica Riopedrense, 2015. p.566-567.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, London, v. 49, p. 209-224, 1983.

KNOWLTON, K.F.; GLENN, B.P. ERDMAN, R.A. Performance, ruminal fermentation, and site of starch digestion in early lactation cows fed corn grain harvested and processed differently. **Journal of Dairy Science**, Champaign, vol. 81, p.1972-1984, 1998.

KROONEMAN, J.; FABER, F.; ALDERKAMP, A.; ELFERINK, S.; DRIEHUIS, F.; CLEENWERCK, I.; SWINGS, J.; GOTTSCHAL, J.; VANCANNEYT, M. *Lactobacillus*

diolivorans sp nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.52, p.639-646, 2002.

KUNG JR, L.; MYERS, C.L.; NEYLON, J.M.; TAYLOR, C.C.; LAZARTIC, J.; MILLS, J.A.; WHITER, A.G. The effects of buffered propionic acid-based additives alone or combined with microbial inoculation on the fermentation of high moisture corn and whole-crop barley. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, p. 1310-1316, 2004.

KUNG, Jr. L., SCHMIDT, R.J.; EBLING, T.E, HU, W. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation and aerobic stability of ground and whole high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign. v.90, p.2309-2314, 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: Wisconsin, USA: American Society of Agronomy.; Crop Science Society of America.; Soil Science Society of America, 2003. p. 305–360.

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

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

LITTELL, R.C.; G. A. MILLIKEN, W.W. STROUP, R.D. WOLFINGER. **SAS System for Mixed Models**. SAS Inst. Cary, NC, 1996.

LOUČKA, R. Stability of high moisture maize grain ensiled with and without chemical additives. **Research in Pig Breeding**, Savoy, v.4, p. 5-8, 2010.

MACRIS, B.J. Mechanism of benzoic acid uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology**, Malden, v.30, p.503-506, 1975.

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

MORAIS, M.G.; ÍTAVO, C.C.B.F.; ÍTAVO, L.C.V.; BUNGENSTAB, D.J.; RIBEIRO, C.B.; OLIVEIRA, L.B.; SILVA, J.A. Inoculação de silagens de grãos úmidos de milho, em diferentes processamentos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.13, n.4, p.969-981, 2012.

MORIEL, P.; SCATENA, T.S.; SÁ FILHO, O.G.; COOKE, R.F.; VASCONCELOS, J.L.M. Vasconcelos. Concentrations of progesterone and insulin in serum of nonlactating dairy cows in response to carbohydrate source and processing. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, p. 4616–4621, 2008.

OBA, M.; ALLEN, M.S. Effects of corn grain conservation method on feeding behavior and productivity of lactating dairy cows at two dietary starch concentrations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, p.174-183, 2003.

OBIOHA, W.I.; STAHR, H.M.; KRAFT, A.A. Effect of sodium nitrite on aflatoxin production in pork sausage at different temperatures and the effect of nitrite on growth of *Aspergillus parasiticus* in culture. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. Washington, v.31, p.1039-1042. 1983.

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

OWENS, F.N.; BASALAN, M. Limits to ruminal and postruminal starch digestion and energetic efficiency. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON BEEF CATTLE. 2012, São Pedro, SP. **Proceedings...** 2012, São Pedro, SP. Disponível em CD-ROM. 2012, 21p.

OWENS, F.N.; SODERLUND, S. Ruminal and postruminal starch digestion by cattle. In: CATTLE GRAIN PROCESSING SYMPOSIUM. 2006, Stillwater. **Proceeding...** 2006, Stillwater. Disponível em: http://beefextension.com/proceedings/cattle_grains06/06-17.pdf. Acesso: 11 maio. 2014.

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

PERSICHETTI Jr. P; ALMEIDA Jr, G.A, COSTA, C.; MEIRELLES, P.R.L.; SILVEIRA, J.P.F.; PANICHI, A.; SILVA, M.G.B.; FACTORI, A.; CAVASANO. F.A.; MENDONÇA, S.A.Nutritional value of high moisture corn silage in the diet of *Holstein cows*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.66, p.1495-1503, 2014.

POSTHUMA, C.C.; BADER, R.; ENGELMANN, R.; POSTMA, P.W.; HENGSTENBERG, W.; POUWELS, P.H. Expression of the xylulose 5-phosphate phosphoketolase gene, *xpkA*, from *Lactobacillus pentosus* MD363 is induced by sugars that are fermented via the phosphoketolase pathway and is repressed by glucose mediated by CcpA and the mannose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.68, p.831–837. 2002.

PRIGGE, E.C.; JOHNSON, R.R.; OWENS, F.N.; WILLIAMS, D. Soluble nitrogen and acid production of high moisture corn. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 42, n. 2, p. 490-496, 1976.

PYS, J.B.; KARPOWICZ, A.; SZALATA, A. Effect of bacterial or chemical additives on chemical composition and aerobic stability of high-moisture maize grain silages. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM FORAGE CONSERVATION, 14, 2010. **Proceedings...** Brno:Czech Republic, 2010.p.184-185.

PYS, J.B.; KARPOWICZ, A.; BOROWIEC, F.; RATYCH, I.B. Chemical composition and aerobic stability of high moisture maize grain silage made with bacterial or chemical additives. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, p. 1007-1020, 2009.

PYS, J.B.; KOWALSKI, Z.M. 2014. Chemical composition, fermentation quality and aerobic stability of high moisture corn grain ensiled with different additives. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF FORAGE CONSERVATION, 16, Brno, 2014, **Proceedings...** Czech Republic, 2014, p. 85-86.

REIS, R.A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; ALMEIDA, E.O.; JANUSKIEWICZ, E.R.; BERNARDES, T.F.; ROTH, A.P.T.P. Efeito de Doses de *Lactobacillus buchneri* "CEPA NCIMB 40788" Sobre as Perdas nos Períodos de Fermentação e Pós-Abertura da Silagem de Grãos Úmidos de Milho. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, p. 923-934, 2008.

REVELLO-CHION, A.; BORREANI, G.; MUCK, R.E. Effects of various commercial inoculants on the fermentation, aerobic stability and nutritional quality of rolled and ground high-moisture corn. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 16., 2012. Hämeenlinna, Finland. 2012. **Proceedings...** Hämeenlinna, Finland. 2012. p.280-281.

ROBINSON, P.H. Nitrates and Dairy Cattle: Cause for Concern? **Disponível em:** <http://animalscience.ucdavis.edu/faculty/robinson/Articles/FullText/PDF/Web200011.PDF>. Acesso em:10 fev. 2016. 4p.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic acid bacteria:** microbiological and functional aspects.3rd ed., New York: Marcel Dekker, 2004. 633p.

SAN EMETERIO, F.; REIS, R.B; CAMPOS, W.E.; SATTER; L.D. Effect of coarse or fine grinding on utilization of dry or ensiled corn by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, p. 2839–2848, 2000.

SANTOS, J.P. Controle de Pragas Durante o Armazenamento de Milho. **Disponível em:** [file:///C:/Users/Windows%208/Downloads/Circ84%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Windows%208/Downloads/Circ84%20(1).pdf). Acesso: 03 Março, 2016. 20p.

SCANNELL, A.G.M.; ARENDT, E.K.; HILL, C.; ROSS, R.P.; SCHWARZ, G. Effect of nitrite on a bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* transconjugant in fermented sausage. **European Food Research Technology**, London, v.213, p.48-52, 2001.

SCHAEFER, D.M.; BROTZ, P.G.; ARP, S.C.; COOK, D.K. Inoculation of corn silage and high-moisture corn with lactic acid bacteria and its effects on the subsequent fermentations and on feedlot performance of beef steers. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 25, p. 23-38, 1989.

SHARPE, M.E. (1979). Identification of the lactic acid bacteria. In: **Identification Methods for Microbiologists**. 2nd ed. SKINNER, F.A.; LOVELOCK, D.W. (Ed.). London: Academic Press, 1979. p.246-255.

SORIANO, F.D.; POLAN, C.E.; MILLER, C.N. Milk production and composition, rumen fermentation parameters, and grazing behavior of dairy cows supplemented with different forms and amounts of corn grain. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, p. 1520–1529, 2000.

SPOELSTRA, S.F. Nitrate in silage. **Grass and Forage Science**. Malden, v.40, p. 1-11, 1985.

ST-PIERRE N.R. Integrating quantitative findings from multiple studies using mixed model methodology. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.84, p.741-755, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.286-291.

TAYLOR, C.C.; KUNG JR, L. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation and aerobic stability of high moisture corn in laboratory silos. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, p. 1526-1532, 2002.

VAN ZIJDERVELD, S.M.; FONKEN, B.; DIJKSTRA, J.; GERRITS, W.J.J.; PERDOK, H. B.; FOKKINK, W.; NEWBOLD, J.R. Effects of a combination of feed additives on methane production, diet digestibility, and animal performance in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, p. 1445 – 1454, 2011.

WARDYNSKI, F.A.; RUST, S.R.; YOKOYAMA, M.T. Effect of microbial inoculation of high-moisture corn on fermentation characteristics, aerobic stability, and cattle performance. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, p. 2246-2252, 1993.

WOODS, L.F.J.; WOOD, J.M. A note on the effect of nitrite inhibition on the metabolism of *Clostridium botulinum*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.52, p.109, 1982.

WOODS, L.F.J.; WOOD, J.M.; GIBBS, P.A. The involvement of nitric oxide in the inhibition of the phosphotransferase system in *Clostridium sporogenes* by sodium nitrite. **Journal of General Microbiology**, London, v.125, p.399-406, 1981.

WU, Z.; MASSINGILL, L.J.; WALGENBACH, R.P.; SATTER, L.D. Cracked dry or finely ground high moisture shelled corn as a supplement for grazing cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, p. 2227–2230, 2001.

3 FERMENTAÇÃO E ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGENS DE GRÃOS DE MILHO REIDRATADOS, TRATADAS COM ADITIVOS

Resumo

A ensilagem de grãos de milho reidratados pode resultar em silagens com fermentação inadequada e propensas à deterioração, tornando o uso de aditivos aconselhável para esse tipo de grãos. Objetivando-se avaliar o efeito de aditivos químicos e microbianos sobre as características fermentativas e estabilidade aeróbia de silagens de grãos de milho reidratado foi conduzido um experimento utilizando um híbrido de milho desconhecido. Os grãos foram moídos e reidratados para alcançarem um teor de MS de 65%. Os tratamentos utilizados foram: controle (sem aditivos); *L. buchneri*, 5×10^5 ufc/g MN (LB); bactérias homoláticas, 5×10^5 ufc/g MN (Homo); LB + homoláticas (Combo); LB + 1,5 g de nitrito de sódio/kg MN (LBNit) e benzoato de sódio, 2,0 g/kg, MN (Benz). Todos os aditivos foram diluídos na água destilada utilizada para reidratação dos grãos. Baldes plásticos de 6 L foram usados como silos experimentais (4 repetições por tratamento). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o procedimento MIXED do SAS e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). O menor valor de pH foi observado para a silagem controle (3,84), enquanto o pH mais alto foi resultado da inoculação com LB (4,44). Todavia, as silagens foram bem fermentadas e resultaram em perdas de MS inferiores a 1,6%. O teor de proteína solúvel e os parâmetros de degradabilidade ruminal da MS foram melhores para LB e Combo e piores para LBNit. Os tratamentos Homo e Benz apresentaram degradabilidades de MS semelhantes ao Controle. A estabilidade aeróbia foi máxima para LB, Combo e Benz (240h) e intermediária para LBNit (151h). Bactérias homoláticas foram menos efetivas em promover estabilidade aeróbia (74,7h), comparada à silagem controle (53,5h) e aos demais aditivos. A aplicação de benzoato de sódio e de *L. buchneri*, isolado ou combinado a homoláticas são estratégias aconselháveis para silagens de grãos de milho reidratados.

Palavras-chave: Aditivos microbianos; Aditivos químicos; Degradabilidade da matéria seca

Abstract

Ensiling rehydrated corn grains may result in poor fermented and prone to spoil silages. Thus, the use of additives is advisable to improve the fermentation and the aerobic stability. In order to evaluate the effect of chemical and microbial additives on the fermentative characteristics and aerobic stability of rehydrated corn grain silages an experiment was conducted using an unknown corn hybrid. The grains were grounded and rehydrated to reach 650 g DM/kg FM. The treatments were Control (no additives); *L. buchneri*, 5×10^5 cfu/g FM (LB); Homolactic bacteria, 5×10^5 cfu/g FM (Homo); LB + Homo (Combo); LB + 1.5 g of sodium nitrite/kg FM (LBNit) and sodium benzoate, 2.0 g/kg FM (Benz). All additives were diluted in the distilled water used to rehydrate the grains. Polyethylene buckets (6l) were used as experimental silos (4 replications per treatment). Statistical analysis were performed using the Mixed procedure of SAS and means compared with Tukey test ($\alpha = 0.05$). The lowest pH value was observed for the control silage (3.84), while the higher pH was the result of inoculation with LB (4.44). However, the silages were well fermented and resulted in DM losses less than 1.6%. The content of soluble protein and the parameters of ruminal DM degradability were better for LB and Combo and worse for LBNit. The Homo and Benz

treatments showed DM degradability similar to the control. The aerobic stability was highest for LB, Combo and Benz (240h) and intermediate for LBNit (151h). Homolactic bacteria was less effective in promoting aerobic stability (74,7h), compared to the control silage (53,5h) and other additives. The use of sodium benzoate and the inoculation with *L. buchneri*, alone or combined with homolactic bacteria are recommended strategies for rehydrated corn grain silages.

Keywords: Microbial additives; Chemical additives; Dry matter degradability

3.1 Introdução

Silagens de grãos úmidos de milho sem aplicação de aditivos são caracterizadas na literatura pela baixa concentração de produtos de fermentação e pela propensão à deterioração aeróbia. O valor médio de pH desses grãos é 4,22, variando entre 3,73 e 4,95. Os teores médios de ácido lático e ácido acético são 1,47 e 0,52% da MS, respectivamente, porém concentrações mínimas de 0,05% da MS já foram notificadas para ambos. O máximo teor de etanol relatado foi 2,84% da MS, fruto do metabolismo de leveduras. A contagem mínima desses microrganismos nas silagens foi de 3,22 log ufc/g e a máxima, 6,7 log ufc/g, confirmando o risco de deterioração aeróbia das silagens de grãos [Banco de dados descrito no tópico 2.2].

Em se tratando de grãos reidratados, o processo fermentativo pode ser ainda menos eficiente que em grãos ensilados úmidos. Fernandes (2014) observou maiores perdas de MS, maior produção de ácido butírico e valores de pH mais elevados em silagens de grãos reidratados, comparados a grãos úmidos. No trabalho de Ferrareto, Fredin e Shaver (2015), grãos reidratados e ensilados por 30 dias apresentaram baixa concentração de ácidos totais (1,64% da MS), com ácido lático e acético representando 0,95 e 0,53% da MS, respectivamente.

A escassez de dados que caracterizem especificamente a fermentação de grãos reidratados somada à necessidade de posicionamento de aditivos capazes de modificar a fermentação para alcance de maior qualidade higiênica aliada a um menor risco de deterioração constituíram motivações deste trabalho. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da aplicação de aditivos químicos e microbianos sobre a fermentação, estabilidade aeróbia e degradabilidade da MS de silagens de grãos de milho reidratados.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Confeção das silagens experimentais

O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP). As silagens foram confeccionadas a partir de um híbrido desconhecido de milho de endosperma duro, com $79,2 \pm 2,1\%$ de vitreosidade.

Para determinação do grau de dureza do milho partiu-se de uma amostra de 3kg de grãos, que foi segmentada até a obtenção de três amostras, contendo 10 grãos cada. As amostras foram imersas, separadamente, em água destilada por cinco minutos para facilitar a retirada do pericarpo e do gérmen (DOMBRINK-KURTZMAN; BIETZ, 1993). Em seguida, os grãos foram secos em estufa a 55 °C, por 24 horas e pesados. A remoção do endosperma farináceo foi realizada com o auxílio de lâminas de bisturi e os grãos foram submetidos a uma nova secagem a 55 °C, por 24 horas e pesados ao final.

O milho utilizado na confecção das silagens foi moído em moinho de martelo com peneira de 5,0 mm, após esse procedimento foi determinada a distribuição de tamanho de partículas (Fig. 2) por agitação das amostras sobre conjunto de peneiras com malhas de 6,79; 4,76; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,105 mm (ZANOTTO; BELLAYER, 1996). O milho apresentou granulometria de 1,63mm que não caracteriza uma moagem fina, sendo, portanto, tratado como milho moído (LITHERLAND, 2006).

Figura 2 - Distribuição do tamanho de partículas do milho moído utilizado para confecção de silagens experimentais

Após a moagem, o teor de umidade determinado nos grãos foi de 9,5%. Procedeu-se à hidratação da massa, por meio da adição de água deionizada até atingir o teor de umidade de 35%. Os tratamentos avaliados foram:

- LB: *Lactobacillus buchneri*, na dose 5×10^5 ufc/g MN (CNCM I - 4323- Lallemand Animal Nutrition)

- Homo: Bactérias homoláticas, na dose 5×10^5 ufc/g MN (Sill All 4x4® - *L. plantarum*, *P. acidilactii*, *E. faecium* e *B. salivarius*)
- Combo: *L. buchneri* + Homoláticas, ambos na dose 5×10^5 ufc/g MN
- LBNit: *L. buchneri* (5×10^5 ufc/g MN) + nitrato de sódio (pureza de 99%), na dose 1,5 g/kg MN
- Benz: Benzoato de sódio (pureza de 99%), na dose 2,0 g/kg MN.
- Controle: sem uso de aditivos

A aplicação dos aditivos foi feita com auxílio de pulverizadores e a homogeneização dos grãos realizada manualmente. Na confecção das silagens não tratadas foi adicionada somente água, na mesma proporção das silagens que receberam aditivos. As silagens foram produzidas em dois tipos de silos experimentais:

(A) Mini-silos em bag plástico selados a vácuo, com 22 cm de largura, 35 cm de altura e 0,18 mm de espessura. Estes bags receberam 500g de grãos reidratados, sendo destinados à avaliação da dinâmica de queda do pH. Foram adotados nove tempos de estocagem para estas silagens, com ênfase para o estágio inicial de fermentação: 0, 1, 2, 3, 5, 7, 14, 30 e 60 dias. O armazenamento dos mini-silos foi realizado em sala sob temperatura ambiente. Foram confeccionadas 3 repetições por tratamento.

(B) Mini-silos do tipo balde, com 8,0 cm de raio, 18 cm de altura e capacidade para $3,8 \pm 0,06$ kg de grãos, dotados de tampa para vedação, sem dispositivo para escape de gás. O conjunto tampa e balde foi pesado vazio e após o enchimento dos silos, para determinação das perdas fermentativas de MS. Este dado foi obtido por diferença entre a massa seca de grãos ensilados e a massa seca de silagem obtida na abertura dos silos. O tempo de fermentação das silagens foi de 90 dias, sendo este o principal material para estudo do efeito de aditivos em grãos reidratados de milho. Os silos foram armazenados sob as mesmas condições dos bags plásticos. Foram confeccionadas 4 repetições por tratamento.

3.2.2 Composição química e atributos fermentativos

Amostras de grãos secos moídos foram coletadas antes da ensilagem para determinação da composição químico-bromatológica inicial (tabela 5). As amostras foram pesadas e secas em estufa de circulação forçada a 55°C por 72 horas. Após secagem, o material foi processado em moinho de facas tipo Willey com peneira de malha 1,0 mm. Para

evitar contaminações por resíduos desconhecidos, previamente aos procedimentos laboratoriais, os recipientes utilizados para comportar as amostras, tais como: cadinhos de porcelana utilizados para determinação da matéria seca e cinzas; cadinhos porosos, empregados na determinação das frações fibrosas e os balões coletores de extrato etéreo foram submetidos à incineração em mufla a 600 °C, durante 1 hora.

O teor de matéria seca (MS) dos grãos foi determinado por secagem em estufa a 105°C durante 12 h (AOAC, 2000). As cinzas (MM) foram obtidas por combustão das amostras a 600°C durante 4 h (AOAC, 1997), sequencialmente à determinação da MS 105 °C. O nitrogênio das amostras foi determinado por combustão, no aparelho Leco 2000 (Leco Instruments Inc.), em que o N liberado sob altas temperaturas é arrastado por oxigênio puro e quantificado em função da condutividade térmica (AOAC, 1990). O teor de proteína bruta foi obtido pela multiplicação do nitrogênio total pelo fator 6,25. O extrato etéreo (EE) foi determinado pelo método de extração Soxhlet (AOAC (1997). A fibra em detergente neutro (FDN) foi obtida por lavagem das amostras em detergente neutro, adicionado de sulfito de sódio e amilase termoestável (MERTENS, 2002). A fibra em detergente ácido (FDA) foi obtida por lavagem em detergente ácido, sequencialmente à análise de FDN. O conteúdo de cinzas foi descontado de ambos os resíduos fibrosos. O teor de carboidratos solúveis foi medido por colorimetria, conforme Hall (2000).

Com vistas a identificar possíveis modificações desencadeadas pelos aditivos sobre a extensão da proteólise nos grãos fermentados, além da determinação do nitrogênio total, foi realizada a decomposição da fração nitrogenada pelo método de Macro Kjeldhal (AOAC, 1990). A fração Amônia foi obtida a partir do nitrogênio amoniacal determinado na amostra fresca da silagem, por destilação em meio básico de NaOH a 35%, adicionado de 2 g de MgO e sem antiespumante. A proteína solúvel (PBSol) foi estimada a partir da diferença entre o nitrogênio total da amostra e o nitrogênio insolúvel que permaneceu após o banho em tampão borato-fosfato (KRISHNAMOORTHY et al., 1982). A proteína ligada à fibra foi estimada após o procedimento de lavagem das amostras em detergente neutro acrescido de amilase termoestável (PIDN). Este procedimento foi executado em analisador de fibra Marconi® e o nitrogênio determinado no resíduo foi corrigido para o fator 6,25. A extração das proteínas prolaminas foi realizada pelo método rápido de Bradford, segundo Nellis; Hoffman e Shaver (2013)

A análise de perfil microbiano foi realizada a partir de um extrato aquoso, adicionando-se 225 g de água deionizada estéril em 25 g de amostra fresca, que foi homogeneizada durante 4 minutos em homogeneizador de alimentos. Foram realizadas diluições decimais sequenciais (10^{-1} a 10^{-6}) e plaqueamento em triplicata. A contagem de bactérias ácido lácticas (BAL) foi feita em meio de cultura MRS acrescido do antifúngico Natamicina (0,25 g/L), após incubação das placas sob anaerobiose a 32°C por 48 h. A contagem de leveduras e fungos filamentosos foi feita a partir do plaqueamento em ágar Malte acrescido de ácido láctico na concentração de 0,5%, com incubação das placas a 32°C, por 48 h para leitura de leveduras e por 5 a 7 dias para leitura de fungos filamentosos. A quantificação de esporos de clostrídios foi feita com caldo RCM, solidificado com ágar bacteriológico e enriquecido com vermelho neutro (0,005%) e cicloserina (0,2g) (JONSSON, 1990). A caracterização dos atributos químicos e microbianos do milho moído que originou as silagens pode ser observada na tabela 5.

Os teores de etanol, ácidos orgânicos, ésteres e aldeídos das silagens foram determinados no extrato aquoso, após filtração e centrifugação, por meio de cromatógrafo gasoso com detector de massas (GC-MS) (GCMS QP 2010 plus, Shimadzu®, Kyoto, Japan), usando coluna capilar (Stabilwax, Restek®, Bellefonte, USA; 60 m, 0,25 mm ϕ , 0,25 μ m crossbond carbowax polyethylene glycol). O teor de ácido láctico foi determinado por método colorimétrico (Pryce, 1969). As leituras de pH foram realizadas em pHmetro digital marca Digimed DM-22®, calibrado no mesmo dia da leitura.

O teor de matéria seca em estufa à 55°C foi corrigido para produtos voláteis de acordo com equação de Weissbach (2009), onde ácidos graxos voláteis* incluem: ácido acético, propiônico, iso-butírico, butírico, iso-valérico e valérico:

$$\begin{aligned} \text{MS corrigida (\%MV)} = & \text{MS estufa (\%MV)} + 0,08 \times \text{ácido láctico (\%MV)} + 0,77 \\ & \times 1,2\text{-propanodiol (\%MV)} + 0,87 \times 2,3\text{-butanodiol (\%MV)} + 0,95 \times \text{ácidos graxos} \\ & \text{voláteis* (\%MV)} + \text{lactato de etila (\%MV)} + 1\text{-propanol (\%MV)} + 2\text{-butanol} \quad (\text{Eq.5}) \\ & (\%MV) + \text{acetato de propila (\%MV)} + \text{etanol (\%MV)} + \text{álcool iso-propílico} \\ & (\%MV) + \text{acetato de etila (\%MV)} + \text{acetona (\%MV)} \end{aligned}$$

Tabela 5 - Caracterização químico-bromatológica e população microbiana epifítica do milho moído empregado na confecção de silagens experimentais

Item	Média e Desvio Padrão
MS, % MN	90,5 ± 0,19
MM, % MS	1,80 ± 0,06
EE, % MS	5,13 ± 0,14
PB, % MS	9,71 ± 0,09
Prolaminas, %MS	4,73 ± 0,43
PBSol, %PB	19,9 ± 2,03
FDN, % MS	13,3 ± 0,18
FDA, % MS	3,07 ± 0,29
CS, %MS	2,20 ± 0,30
CNF, % MS	70,1 ± 0,43
BAL, log ufc/g	6,49 ± 0,35
Fungos, log ufc/g	4,72 ± 0,27
Leveduras, log ufc/g	4,18 ± 1,08

MS – matéria seca; MM – matéria mineral; EE – extrato etéreo; PB – proteína bruta; PBSol – proteína bruta solúvel; FDN – fibra em detergente neutro; FDA – fibra em detergente ácido; CS – carboidratos solúveis; CNF – carboidratos não fibrosos; BAL – bactérias ácido láticas; ufc – unidades formadoras de colônias.

3.2.3 Estabilidade aeróbia

O teste de estabilidade aeróbia das silagens foi realizado a partir de amostras de 5 kg de silagem, sem compactação, dentro de baldes de plástico. Sensores automáticos de tomada de temperatura foram inseridos na massa, programados para tomada de dados a cada 15 minutos. Outros sensores foram distribuídos pelo ambiente para captação da temperatura na instalação. Considerou-se o rompimento da estabilidade quando a temperatura da massa ultrapassou a temperatura ambiente em 2°C (MORAN et al., 1996).

3.2.4 Degradabilidade *in situ* das silagens

Para o estudo da degradabilidade ruminal, foram testados grãos secos de milho com tamanho de partícula de 1,63mm e as silagens produzidas a partir destes grãos, contendo ou não aditivos. Amostras frescas das silagens e o grão seco foram pesadas em triplicata,

proporcionalmente a 5 g de matéria seca. As amostras foram acondicionadas em sacos de náilon (20cm por 10cm, com porosidade de 30µm) e conservadas sob refrigeração a -20°C até o momento da incubação. Após descongelamento do material, os sacos foram incubados no rúmen de duas vacas mestiças não lactantes. Os animais estavam adaptados a uma dieta composta, com base na MS, por 38% de silagem de milho, 10% de feno de Coast-cross, 20,7% de farelo de soja, 11,5% de polpa cítrica, 2,5% de premix mineral+vitaminas e 17,3% de milho moído.

Os tempos de incubação empregados foram de 0, 12, 24 e 48 horas. Assim, foram alocados no rúmen de cada animal, três sacos, por tratamento, por tempo de incubação. Os sacos foram incubados em ordem reversa aos tempos, retirados conjuntamente do rúmen e imersos em água com gelo, a fim de paralisar a fermentação. No momento da lavagem, os bags referentes ao tempo zero foram adicionados aos demais, que passaram por cinco ciclos de lavagem em máquina de lavar roupas. Foi aplicada uma leve compressão manual aos sacos, que em seguida foram secos em estufa de ventilação forçada a 55°C, por 72 horas. Após esse período foi realizada a pesagem dos sacos, a fim de determinar, por diferença, a degradação percentual de MS das amostras em cada tempo de incubação.

Os parâmetros de degradabilidade foram determinados, segundo o modelo proposto por Orskov e McDonald (1979), descrito na equação 6, onde: $Y(t)$ = degradabilidade potencial estimada; $a + b$ = fração potencialmente degradável; e = número neperiano (2,7182); k_d = taxa de degradação (h^{-1}) e t = tempo de incubação (h).

$$Y(t) = a + b(1 - e^{-k_d * t}) \geq t \quad (\text{Eq.6})$$

A partir dos dados de degradação obtidos para cada tempo, obteve-se as frações: Solúvel (A), obtida por diferença entre a massa de grãos incubada e o resíduo do tempo 0; Indigestível (C) = resíduo do tempo 48h e a fração potencialmente degradável (B) = 100 – (A + C). A Degradabilidade potencial (100 – C) e a degradabilidade efetiva $\{A + B[k_d / (k_d + k_p)]\}$ foram calculadas de acordo com Ogden et al. (2005), considerando-se taxas de passagem de 2% h^{-1} , 5% h^{-1} e 8% h^{-1} .

3.2.5 Análise estatística

Os dados relativos às silagens experimentais, contendo ou não aditivos e fermentadas por 90 dias foram analisados por meio de um delineamento experimental inteiramente casualizado. O modelo incluiu o efeito fixo de tratamento (Controle, LB, Homo, Combo, LBNit ou Benz) e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($\alpha = 0,05$). Foi utilizado o procedimento Mixed, do SAS para análise dos resultados.

Os dados de pH das silagens (Controle, LB, Homo, Combo, LBNit ou Benz) em função dos tempos de abertura de silos bag (0, 1, 2, 3, 5, 7, 14, 30 ou 60 dias) foram analisadas como medidas repetidas no tempo, dentro de um delineamento inteiramente casualizado. As médias foram estimadas em função da interação tratamento $\times$ dia, analisada como efeito fixo do modelo. O termo de erro utilizado como testador foi a repetição (silo) dentro de tratamento. Foram avaliadas quatro estruturas de covariância (VC, CS, AR(1) e UN), tendo sido escolhida a estrutura VC (Variance Components), com base no menor valor do critério de Akaike. O procedimento Mixed, do SAS foi utilizado para análise.

O ensaio de degradação *in situ* das silagens foi avaliado por delineamento em blocos casualizados. O modelo estatístico incluiu o efeito fixo de tratamento (Grão Seco ou silagens Controle, LB, Homo, Combo, LBNit ou Benz) e o efeito aleatório de bloco (Vaca A ou B). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) e as análises realizadas com o procedimento Mixed do SAS.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Variações do pH

A dinâmica de queda do pH ao longo de 60 dias de armazenamento das silagens está apresentada na figura 3. A imposição dos tratamentos aos grãos de milho reidratados fez com que, no tempo 0, houvesse uma segmentação de pH, permitindo dividir os grãos em três grupos: Controle e LBNit, com média de pH de 6,88; Benz e LB, com pH médio de 6,42; seguidos de Combo e Homo, com o menor valor médio de pH (6,07). Apesar de partirem de um valor intermediário de pH, após o primeiro dia de fermentação, silagens tratadas com

benzoato de sódio alcançaram pH de 5,08, mostrando velocidade de acidificação mais lenta que silagens controle (pH = 4,76) ou silagens tratadas com *L. buchneri* (4,74). A partir do segundo dia de abertura, essas diferenças entre benzoato e as demais, exceto LBNit, foram eliminadas. Provavelmente, a presença do benzoato de sódio exerceu controle microbiano nesse início de fermentação. Isso indica que a dose de benzoato de sódio praticada neste trabalho foi adequada, visto que, em condições de pH elevado são necessárias doses mais altas para garantir eficácia no controle de microrganismos (CRUESS e RICHERT, 1929).

Até os sete dias de avaliação, o tratamento LBNit prejudicou o abaixamento do pH, em função do tamponamento realizado pelo aditivo químico. Esse tipo de ocorrência poderia propiciar o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, como os clostrídios (PITT et al., 1990). Silagens de grãos reúnem as condições exigidas por estes microrganismos, uma vez que são alcançadas altas densidades de armazenamento, resultando em uma anaerobiose eficiente. Apesar disso, podia-se esperar um controle eficaz de clostrídios no início da fermentação, visto que este aditivo se mantém estável e, portanto, ativo, em meios com pH superior a 5,0 (USHER; TELLING, 1975), como registrado nos primeiros dias de estocagem.

Figura 3 - Valores de pH de silagens de grãos de milho reidratados sem aplicação de aditivos (Controle) ou tratadas com *L. buchneri* (LB); bactérias homoláticas (Homo); *L. buchneri* + homoláticas (Combo), *L. buchneri* + nitrito de sódio (LBNit) ou benzoato de sódio (Benz). EPM = 0,03, $P < 0,01$ para interação tratamento $\times$ tempo.

Aos 14 dias de armazenamento as silagens alcançaram valores de pH semelhantes. O efeito da fermentação heterolática foi expressivo a partir deste ponto da fermentação,

resultando em elevação de pH, com valores finais de 4,66 e 4,42, para *L. buchneri* e para o combo. Esse tipo de resposta sinaliza o risco de desenvolvimento de microrganismos indesejáveis nas silagens de grãos. Segundo Pitt et al. (1990) se a silagem não alcançar pH baixo e estável (<4,6), a atividade dos clostrídios será encorajada. Além da fermentação de açúcares, Driehuis et al. (1999) demonstraram que *L. buchneri* realiza degradação anaeróbica do ácido láctico, aumentando a concentração de ácido acético e reduzindo a concentração de ácido láctico, com consequente aumento nos valores de pH. Como a forma de açúcar predominante em silagens de grãos reidratados é o polissacarídeo amido, é possível que a restrição de açúcares solúveis somada às condições ácidas do meio, tenha propiciado a assimilação anaeróbica do ácido láctico a partir dos 14 dias de fermentação.

3.3.2 Respostas aos aditivos: da fermentação ao pós-abertura

A fração fibrosa e o CNF das silagens não foram modificados pela aplicação dos aditivos. Mudanças na composição das silagens quanto ao teor de EE não parecem apresentar sentido biológico, já o aumento de cinzas e de PB em silagens tratadas com LBNit pode ser atribuído à presença do aditivo químico, cuja composição contribuiu para a tendência de aumento do N total e para o incremento da fração mineral desta amostra (Tab. 6).

Silagens contendo bactérias homoláticas ou benzoato de sódio permaneceram com níveis elevados de prolaminas após a fermentação, comparado à silagem controle. Junges et al. (2015) isolaram e quantificaram a contribuição das diferentes fontes proteolíticas em silagens de grãos reidratados de milho, observando maior atuação de proteases bacterianas. Como o aditivo benzoato de sódio realiza controle microbiano irrestrito, a fermentação menos intensa explicaria a menor extensão da proteólise. No estudo de Ferrareto, Fredin e Shaver (2015), silagens de grãos de milho reidratados, fermentadas por 30 dias e contendo ou não inoculante microbiano a base de bactérias homoláticas foram semelhantes quanto aos teores de proteína solúvel e N-NH₃. No presente estudo, apesar das maiores concentrações de prolaminas, as silagens Homo e Benz apresentaram níveis de proteína solúvel, PB-FDN e N-NH₃, semelhantes à silagem controle.

O tratamento das silagens com *L. buchneri*, isolado (LB) ou associado a homoláticas (Combo), resultou em concentrações de prolaminas semelhantes à da silagem não tratada, maiores teores de proteína solúvel e menor PB-FDN. Corroborando a ausência de

modificações no teor de prolaminas do presente experimento, Hoffman et al. (2011), não observaram alterações nas subunidade de zeínas avaliadas em grãos úmidos de milho inoculados com *L. buchneri*. Silagens LBNit apresentaram conteúdo de prolaminas semelhante às silagens controle, porém níveis inferiores de proteína solúvel. Além disso, a proteína ligada à FDN, que seria aquela associada ao pericarpo dos grãos, foi, numericamente, a mais alta entre as silagens, resultando em efeitos inconsistentes desse aditivo sobre a modificação da fração nitrogenada das silagens.

Tabela 6 - Composição química de silagens de grãos de milho reidratados, contendo ou não aditivos

Item	Tratamento						EPM	P
	Controle	LB	Homo	Combo	Benz	LBNit		
MS, % MN	67,3c	66,3e	68,4a	66,8d	67,6bc	67,8b	0,08	<0,01
MM, % MS	1,36c	1,37c	1,41bc	1,52ab	1,46abc	1,53a	0,02	<0,01
EE, % MS	4,29ab	4,22ab	4,15b	4,56a	4,17ab	4,13b	0,09	0,03
PB, % MS	9,70ab	9,61b	9,80ab	9,83ab	9,80ab	9,98a	0,08	0,06
Prolaminas, %MS	2,53b	2,20b	3,81a	2,10b	4,15a	2,41b	0,10	<0,01
PIDN, % MS	1,00ab	0,84b	1,01ab	0,79b	1,07ab	1,43a	0,11	0,03
PBSol, % PB	48,5b	55,4a	48,5b	55,5a	45,8bc	44,6c	0,77	<0,01
N-NH ₃ , % N total	10,9b	12,6a	12,0ab	12,0ab	11,4ab	12,5a	0,33	0,02
FDN, % MS	8,71	7,91	8,53	8,88	8,43	9,35	0,39	0,21
FDA, % MS	2,40	2,13	2,07	2,30	2,14	2,35	0,17	0,74
CS, %MS	0,76c	0,15e	0,49d	0,32de	1,21b	1,59a	0,05	<0,01
CNF, % MS	75,9	76,9	76,0	75,2	76,1	75,0	0,48	0,13

MS – matéria seca; MM – matéria mineral; EE – extrato etéreo; PB – proteína bruta; PIDN – proteína insolúvel em detergente neutro; PBSol – proteína bruta solúvel; N-NH₃ – nitrogênio amoniacal; FDN – fibra em detergente neutro; FDA – fibra em detergente ácido; CS – carboidratos solúveis; CNF – carboidratos não fibrosos; LB – *L. buchneri*; Homo – bactérias homoláticas; Combo – LB+Homo; BENZ – benzoato de sódio; LBNit – *L. buchneri* + nitrito de sódio. Médias seguidas de mesma letra na linha, são semelhantes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os teores de proteína solúvel e N-NH₃ apresentam elevada correlação com a digestibilidade do amido de grãos de milho ensilados (FERNANDES, 2014; KUNG Jr.; WINDLE; WALKER, 2014). Neste trabalho, a degradabilidade da matéria seca das silagens, a ser apresentada no final deste capítulo, contribuirá para a compreensão dos efeitos dos aditivos sobre a matriz proteica dos grãos, permitindo inferências sobre a disponibilização do

amido em função dos tratamentos.

A ensilagem de grãos de milho reidratados revelou-se uma estratégia eficaz de armazenamento de milho, em virtude das baixas perdas de MS durante a fermentação (Tab. 7). Deve-se ponderar o fato da unidade experimental garantir uma eficiente exclusão do oxigênio, culminando com perdas máximas de 1,22% MS no tratamento LB. A explicação para este fato concentra-se no metabolismo heterolático do *L. buchneri*, com liberação de CO₂ para o ambiente a partir da metabolização de açúcares (SALMINEN; WRIGHT; OUWEHAND, 2004) ou da assimilação do ácido lático (OUDE ELFERINK et al. 2001). O padrão de perdas obtido pode ser associado aos teores finais de MS das silagens. Os tratamentos LB e Combo, cujas silagens apresentaram, nesta ordem, os menores valores de MS, estão associados às maiores perdas fermentativas. Do contrário, silagens com teor de MS superior ao do controle, como LBNit e Benz, responderam, nesta ordem, pelas menores perdas fermentativas.

O crescimento de bactérias ácido lácticas foi estimulado em silagens inoculadas com *L. buchneri*. Os tratamentos com o inoculante isolado ou combinado com homoláticas resultaram nas maiores contagens, seguidos da mistura de *L. buchneri* com nitrito de sódio. O metabolismo heterolático do microrganismo foi evidenciado pelos valores decrescentes de pH das silagens LB (4,44), Combo (4,04) e LBNit (3,96) e superiores ao pH da silagem controle (3,84). A inoculação com bactérias homoláticas, por sua vez, resultou em contagens de BAL e valores de pH semelhantes à silagem controle. Os trabalhos revisados na metanálise sobre o uso de bactérias homofermentativas revelaram tendência de aumento de ácido lático e queda significativa do pH. Neste trabalho, a inoculação não foi eficiente em modificar as características da silagem, o que pode ser considerado uma resposta pontual desse tipo de inoculante.

A presença do nitrito de sódio impôs modificações no metabolismo do *L. buchneri*. O tratamento LBNit foi igualmente eficaz no controle de leveduras, porém, além da menor contagem microbiana e pH da silagem, a baixa perda fermentativa não coincidiu com o padrão de perdas obtidas para LB. Além do tratamento LBNit, o crescimento de leveduras foi controlado nas silagens LB, Combo e Benz. As contagens de fungos foram semelhantes entre os tratamentos.

Tabela 7 - Aspectos microbianos e fermentativos de silagens de grãos de milho reidratados, contendo ou não aditivos

Item	Tratamento						EPM	P
	Controle	LB	Homo	Combo	Benz	LBNit		
MS, % MN	67,3c	66,3e	68,4a	66,8d	67,6bc	67,8b	0,08	<0,01
MS _C , %	67,9c	68,4b	68,9a	68,6ab	67,9c	68,2bc	0,10	<0,01
pH	3,84e	4,44a	3,86de	4,04b	3,88d	3,96c	0,01	<0,01
BAL, log ufc/g	4,48c	8,06a	4,74c	7,88a	4,51c	6,36b	0,12	<0,01
Fungos, log ufc/g	4,18	3,48	3,62	3,48	2,78	3,19	0,51	0,53
Leveduras, log ufc/g	4,42b	<2,0c	4,62a	<2,0c	<2,0c	<2,0c	0,04	<0,01
Clostrídios, log ufc/g	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	-	-
Perda fermentativas, %	0,60d	1,22a	0,67c	0,96b	0,26e	0,17f	0,01	<0,01

MS – matéria seca; MN – matéria natural; MS_C – matéria seca corrigida para compostos voláteis; BAL – bactérias ácido lácticas; ufc – unidades formadoras de colônias; LB – *L. buchneri*; Homo – bactérias homoláticas; Combo – LB+Homo; BENZ – benzoato de sódio; LBNit – *L. buchneri* + nitrito de sódio. Médias seguidas de mesma letra na linha, são semelhantes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A obtenção de contagens de clostrídios inferiores a 3 log ufc/g para todas as silagens, revela que o crescimento desse microrganismo não foi encorajado nos grãos reidratados deste experimento. Associando as contagens às concentrações dos produtos de fermentação (Tab. 8), pode-se concluir que os níveis de ácido butírico foram extremamente baixos, uma vez que na concentração mais alta (silagem controle), a contribuição com ácido butírico foi de apenas 0,0015% da MS. O banco de dados utilizado na metanálise do tópico 2.2 revelou teores médios ácido butírico de 0,04% da MS para silagens de grãos úmidos de milho sem aditivos.

A análise dos produtos de fermentação comprovou o padrão heterofermentativo das silagens LB e Combo, com maior produção de ácido acético em relação ao ácido láctico. A maior concentração de ácido láctico no Combo explica o menor pH dessas silagens em relação ao *L. buchneri* isolado, revelando-se uma alternativa interessante sob o aspecto da conservação do alimento e redução do risco de crescimento de microrganismos patogênicos sensíveis ao pH. A menor extensão da fermentação em grãos tratados com benzoato de sódio foi evidenciada pela mínima produção de ácidos totais em relação às demais silagens. A proporção dos produtos de fermentação de silagens LBNit comprovou o perfil de fermentação diferenciado das silagens LB e Combo. A relação láctico:acético foi alta no tratamento LBNit e semelhante à silagem controle, confirmando que o químico impactou a atividade de *L. buchneri*.

Tabela 8 - Produtos de fermentação de silagens de grãos de milho reidratados, contendo ou não aditivos

Item	Tratamentos						EPM	P
	Controle	LB	Homo	Combo	Benz	LBNit		
Ácido láctico, % MS _C	1,76a	0,40d	1,72a	1,23bc	0,99c	1,45ab	0,07	<0,01
Ácido acético, % MS _C	0,32c	1,54a	0,30c	1,36b	0,29c	0,31c	0,02	<0,01
Ácido propiônico, mg/kg MS _C	39,0b	132a	36,7b	56,5b	51,2b	47,7b	6,02	<0,01
Ácido butírico, mg/kg MS _C	15,0a	7,75bc	7,75bc	4,5c	11,7ab	6,75c	0,91	<0,01
LAT_AC	5,07b	0,26e	5,75a	0,92d	3,41c	4,60b	0,10	<0,01
AT, % MS _C	2,09b	1,96b	2,03b	2,57a	1,29c	1,77b	0,08	<0,01
Etanol, % MS _C	0,36b	0,43ab	0,44a	0,29c	0,10d	0,10d	0,01	<0,01
1,2-Propanodiol, % MS _C	0,02c	1,61a	0,02c	1,39b	0,00c	0,01c	0,04	<0,01
1-Propanol, mg/kg MS _C	3,25c	113a	3,25c	36,0b	0,00c	0,00c	5,49	<0,01
Ácido isobutírico, mg/kg MS _C	12,7b	27,2a	3,00d	15,5b	6,75c	2,25d	0,73	<0,01
Ácido iso-valérico, mg/kg MS _C	4,75bc	3,25c	5,00bc	3,25c	8,25a	5,66b	0,45	<0,01
Ácido valérico, mg/kg MS _C	2,00	2,50	2,25	1,75	3,00	1,75	0,37	0,18
Ácido fórmico, mg/kg MS _C	68,5bc	94,0ab	73,2bc	40,0c	99,2ab	132,2a	11,7	<0,01
Acetona, mg/kg MS _C	28,0	19,7	32,2	22,7	30,0	29,0	3,48	0,14
Acetato de etila, mg/kg MS _C	21,0c	70,0a	24,2c	47,2b	7,50d	3,00d	2,15	<0,01
Lactato de etila, mg/kg MS _C	79,5b	16,0de	93,0a	41,7c	25,2d	9,50e	2,48	<0,01
Acetato de propila, mg/kg MS _C	0,25bc	4,25a	0,00c	1,00b	0,00c	0,00c	0,22	<0,01
2,3-Butanodiol, mg/kg MSC	228b	349a	220b	185c	85,0d	64,2d	7,74	<0,01
Metanol, mg/kg MS _C	27,2b	38,5a	33,5ab	33,0ab	33,2ab	24,0b	2,15	<0,01
2-Butanol, mg/kg MS _C	0,50	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,23	0,34
Álcool iso-propílico, mg/kg MS _C	1,25ab	1,50a	1,25ab	1,00ab	0,25b	1,25ab	0,23	0,02

MS_C – matéria seca corrigida para compostos voláteis; LAT_AC – ácido láctico/ácido acético; AT – ácidos totais; LB – *L. buchneri*; Homo – bactérias homoláticas; Combo – LB+Homo; BENZ – benzoato de sódio; LBNit – *L. buchneri* + nitrito de sódio. Médias seguidas de mesma letra na linha, são semelhantes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Além da efetividade no controle de leveduras (Tab. 7), as menores concentrações de etanol foram obtidas para as silagens tratadas com aditivos químicos. Ao contrário do esperado, a produção de etanol foi semelhante nas silagens LB e Homo. No tratamento à base de bactérias homoláticas, a alta contagem de leveduras corroborou a maior produção de etanol. No entanto, como a contagem de levedura foi mínima no tratamento LB, uma possibilidade seria a permanência de leveduras altamente eficientes na produção de álcool, compensando a menor população microbiana. Além disso é possível a coexistência de outras

bactérias heteroláticas, produtoras de etanol na massa, uma vez que o metabolismo de *L. buchneri* é marcado pela produção preferencial de ácido acético e somente traços de etanol (Oude-Elferink et al., 2001). Outra constatação sobre a produção de etanol nas silagens LB é o aumento de acetato de etila, dentre os produtos de fermentação. A formação dos ésteres ocorre espontaneamente, em função da presença dos precursores ácido acético e etanol, em meio ácido. Apesar da pequena concentração, esse éster pode ser considerado um drenagem natural de etanol no sistema.

Outro éster associado ao metabolismo de *L. buchneri* é o acetato de propila, condicionado aos precursores ácido acético e 1-propanol. A maior produção de ácido láctico, por sua vez, foi acompanhada de incremento de lactato de etila em silagens tratadas com homoláticas. Uma peculiaridade dos processos fermentativos foi a maior produção de ácido fórmico em silagens tratadas com LBNit. É possível que o crescimento de enterobactérias nestas silagens, tenha ocorrido no início da fermentação, enquanto a silagem se mantinha com pH elevado. Segundo Pahlow et al. (2003), esses microrganismos estão envolvidos na redução do nitrato e algumas enterobactérias fermentam glicose a uma mistura de ácidos, que incluem ácido acético e fórmico.

Quanto à velocidade de deterioração das silagens após exposição ao ar (Tab. 9), a inoculação com bactérias homoláticas resultou em 21 horas de incremento em estabilidade, comparado à silagem controle. Frente aos demais aditivos, comprovou-se o quanto a inoculação com homoláticas é pouco eficiente em controlar o aquecimento da massa. A adição de *L. buchneri* garantiu estabilidade aeróbia máxima às silagens LB e Combo, avaliada ao longo de 10 dias e estabilidade intermediária (151 h) para o tratamento LBNit. O tratamento com benzoato de sódio também assegurou 240 horas de estabilidade aos grãos, comprovando o efeito antifúngico do aditivo. Da Silva et al. (2014) avaliaram silagens de planta inteira de milho tratadas com benzoato de sódio ou *L. buchneri*. Os autores obtiveram maior estabilidade aeróbia para o tratamento químico e, semelhante ao presente trabalho, benzoato de sódio conservou carboidratos solúveis, gerou baixa perda de MS, exerceu controle microbiano sobre BAL e redução numérica de leveduras.

A temperatura das silagens LB, Combo e Benz igualou-se à temperatura ambiente após 205 horas de exposição, revelando um ritmo lento de aquecimento. As perdas de matéria seca em aerobiose corroboraram o efeito protetor dos três aditivos no controle de microrganismos espoliadores. Conjugando tais perdas às perdas fermentativas (Tab. 7),

justifica-se a tomada de decisão sobre a aplicação de aditivos em grãos úmidos com base na proteção do painel do silo. O manejo adequado de retirada de silagem, com avanços rápidos, propiciados pela escolha certa do tipo de silo constitui a principal ação para reduzir perdas em aerobiose. No entanto, é notável o alto potencial de perdas de silagens não tratadas, bem como silagens contendo aditivos sem efeito antifúngico, como bactérias homoláticas.

Tabela 9 - Estabilidade aeróbia de silagens de grãos de milho reidratados, contendo ou não aditivos

Item	Tratamentos						EPM	P
	Controle	LB	Homo	Combo	Benz	LBNit		
EA, h	53,5d	240a	74,7c	240a	240a	151b	1,39	<0,01
Tmax, °C	46,7a	26,0d	41,9c	26,1d	26,2d	45,2b	0,14	<0,01
TempoTAmb, h	39,3c	206a	48,2c	205a	206a	136,b	2,22	<0,01
TempoTMax, h	109c	240a	153b	240a	240a	229a	3,28	<0,01
PerdaMSEA, %	31,4a	1,85c	31,6a	3,50c	3,20c	23,9b	0,98	<0,01

EA – estabilidade aeróbia; Tmax – temperatura máxima; TAmb – temperatura ambiente; TempoTAmb – tempo para alcance da temperatura ambiente; TempoTMax – tempo para alcance da temperatura máxima; MSEA – matéria seca na estabilidade aeróbia; LB – *L. buchneri*; Homo – bactérias homoláticas; Combo – LB+Homo; BENZ – benzoato de sódio; LBNit – *L. buchneri* + nitrito de sódio. Médias seguidas de mesma letra na linha, são semelhantes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O padrão de degradação ruminal das silagens está apresentado na Tabela 10. De modo geral, os grãos apresentaram elevada fração solúvel (A), inclusive para o milho seco, afetando, por conseguinte, os demais parâmetros de degradação. No estudo de Alvarez et al. (2001) a digestão ruminal da MS de grãos úmidos de milho, comparado a grãos laminados resultou em fração solúvel (A) de 32,0% $\pm$ 11,52% vs 1,0% $\pm$ 1,09%; fração insolúvel, potencialmente digestível (B) de 48,24% vs 82,02%; taxa fracional de digestão (kd) de 8,72% h⁻¹ vs 5,73% h⁻¹ e degradação potencial, às 26 horas, de 80,20% vs 83,02%. Os autores utilizaram grãos semi-dentados e não foi informada a granulometria milho. No presente trabalho, onde foi usado milho de endosperma duro e, em função dos grãos terem sido moídos e não laminados, é possível que a dispersão no tamanho de partículas (Fig. 2) tenha gerado considerável montante de partículas na forma de pó, perdido durante a lavagem dos sacos. No trabalho de Alvarez et al. (2001), não foram apresentados detalhes do manejo do silo, como o tempo de armazenamento. Neste estudo, ao longo dos 90 dias de fermentação das silagens é

possível a ocorrência de mudanças na estrutura física e granulometria dos grãos, em função do processo fermentativo, contribuindo para elevação da fração solúvel das silagens.

O incremento em solubilização de MS das silagens, comparado ao milho seco, resultou em acréscimos de 22 a 51 pontos percentuais, demonstrando a efetividade desse método de processamento em promover ganhos nutricionais e aproveitamento imediato do milho no rúmen. A fração solúvel foi maior nas silagens tratadas com LB, seguidas do Combo. Isso é consistente com o fato destas silagens terem apresentado concentrações de prolaminas semelhantes à silagem controle, porém, maiores teores de proteína solúvel e menor PB-FDN. Assim, as modificações na matriz proteica dos grãos permitiram a liberação de grânulos de amido e este arranjo frouxo propiciou maior solubilização, bem como maior lavagem de material, aferido como fração A.

Tabela 10 – Parâmetros de degradabilidade *in situ* de grãos de milho ou silagens de grãos de milho reidratados, contendo ou não aditivos

Item	Tratamentos							EPM	P
	Controle	LB	Homo	Combo	Benz	LBNit	MiS		
A (%)	48,7d	69,0a	51,9c	61,5b	48,3d	40,0e	18,0f	0,64	<0,01
B (%)	46,9cd	27,2f	44,3d	35,1e	47,9c	57,3b	75,4a	0,79	<0,01
C (%)	4,37ab	3,82b	3,84b	3,33b	3,69b	5,70 ^a	6,64a	0,64	<0,01
Kd (% h ⁻¹)	5,63a	6,19a	5,32ab	5,68a	5,63a	4,30c	4,25c	0,35	<0,01
DEG _{pot} (%)	95,6ab	96,2a	96,2a	96,7a	96,3a	94,3bc	93,4c	0,64	<0,01
DEG _{Ef} 2% h ⁻¹	83,3c	89,5a	84,1bc	87,5ab	83,6c	76,1d	68,6e	0,90	<0,01
DEG _{Ef} 5% h ⁻¹	73,5b	84,0a	74,7b	80,1a	73,6b	63,5c	52,1d	1,13	<0,01
DEG _{Ef} 8% h ⁻¹	68,0c	80,9a	69,6c	76,0b	68,1c	57,0d	43,8e	1,10	<0,01

A – fração solúvel; B – fração potencialmente digestível; C – fração indigestível; Kd – taxa fracional de digestão; DEG_{pot} – Degradabilidade potencial (100 – C). DEG_{Ef} – Degradabilidade efetiva, estimada de acordo com taxas de passagem de 2%, 5% ou 8%. LB – *L. buchneri*; Homo – bactérias homoláticas; Combo – LB+Homo; BENZ – benzoato de sódio; LBNit – *L. buchneri* + nitrito de sódio; MiS – milho seco. Médias seguidas de mesma letra na linha, são semelhantes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A solubilização da MS foi intermediária para silagens tratadas com homoláticas. Contraditoriamente, estas silagens resultaram em níveis elevados de prolaminas e teores de proteína solúvel, PB-FDN e N-NH₃, semelhantes à silagem controle. Esse mesmo conjunto de alterações na fração proteica foi observado para silagens tratadas com benzoato de sódio. Porém, a presença do aditivo químico, por restringir o processo fermentativo das silagens,

resultou em ausência de ganhos quanto à solubilidade da MS. Desse modo, dentre esses dois aditivos, a fração A foi maior para silagens contendo homoláticas e semelhante à controle, para silagens contendo benzoato de sódio. O tratamento de silagens com nitrito de sódio não prejudicou o processo fermentativo, resultando em uma concentração de ácidos orgânicos totais semelhante à silagem controle (Tab. 8). Todavia, a fração proteica dessas silagens revelou um teor de prolaminas semelhante à controle, porém menor proteína solúvel e proteína ligada à fibra numericamente maior que da silagem controle. Como resultado, este foi o tratamento com menor fração A.

A fração indigestível (C) das silagens e do grão seco não variou em relação à silagem controle, apesar de ser numericamente maior para o milho seco, seguido da silagem LBNit. Acompanhando este fato e, aliado ao padrão de solubilidade descrito previamente, a fração insolúvel potencialmente digestível (B) foi maior para o milho seco, seguido do tratamento com nitrito de sódio. Por fim, estes tratamentos responderam por taxas fracionais de degradação (Kd) e degradabilidade potencial da MS inferiores ao observado para a silagem controle. Como esperado, as piores estimativas de degradabilidade efetiva foram obtidas para o milho seco, comprovando o benefício da ensilagem de grãos com alta umidade. Uma exceção seria a confecção de silagens contendo nitrito de sódio, visto que a presença desse aditivo determinou as piores degradabilidades dentre os fermentados, em relação à silagem controle.

A degradabilidade potencial de silagens tratadas com *L. buchneri* foi semelhante à de silagens controle. Porém, os valores estimados de degradabilidade efetiva, confirmaram que, mesmo sob elevadas taxas de passagem, a digestibilidade ruminal de grãos tratados com *L. buchneri*, isolado ou combinado a homoláticas, é superior à de silagem sem aditivos. Benzoato de sódio e o inoculante a base de homoláticas se posicionaram de forma semelhante à silagem não tratada, quanto às degradabilidades potencial e efetivas dos grãos. Esse resultado é importante para análise do efeito geral da adição de benzoato de sódio, uma vez que o impacto gerado por este aditivo na fermentação beneficiou o pós-abertura das silagens, sem comprometer o aproveitamento dos grãos de milho no rúmen.

3.4 Conclusões

As perdas ocorridas durante a fermentação de silagens de grãos reidratados são tipicamente baixas e os aditivos não promoveram alterações nesse cenário.

A estabilidade aeróbia dessas silagens foi, em geral, aumentada com a presença dos aditivos testados.

A presença de *L. buchneri* exclusivo ou em associação com bactérias homoláticas também auxiliou no aumento da degradabilidade ruminal das silagens.

Referências

ALVAREZ, H.J.; SANTINI, F.J.; REARTE, D.H.; ELIZALDE, J.C. Milk production and ruminal digestion in lactating dairy cows grazing temperate pastures and supplemented with dry cracked corn or high moisture corn. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 91, p. 183-195, 2001.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International** 17th ed. Gaithersburg, USA. 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International** 16th ed. Washington, USA. 1997.

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

CRUESS, W.V.; RICHERT, P.H. Effect of hydrogen ion concentration on the toxicity of sodium benzoate to microorganisms. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 17, p. 363, 1929.

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

DOMBRINK-KURTZMAN, M.A.; BIETZ, J.A. Zein composition in hard and soft endosperm of maize. **Cereal Chemical**, Washington, v.70, p.105-108, 1993.

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

FERNANDES, J. **Influência de genótipo, maturidade e tempo de armazenamento na qualidade de silagens de grãos de milho com alta umidade**. 2014. 97p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

FERRARETTO, L.F.; FREDIN, S.M.; SHAVER, R.D. Influence of ensiling, exogenous protease addition, and bacterial inoculation on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated and high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, p. 7318-7327, 2015.

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

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

JONSSON, A. Enumeration and confirmation of *Clostridium tyrobutyricum* in silages using neutral red, D-Cycloserine, and Lactate dehydrogenase activity. **Journal of Dairy Science**, Champaign, vol. 73, P. 719–725, 1990.

JUNGES, D.; MORAIS, G.; DANIEL, J.L.P. ; SPOTTO, M.H.F. ; NUSSIO, L.G. Contribution of proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 17, 2015, Piracicaba. **Proceedings...** Rio das Pedras, SP: Grafica Riopedrense, 2015. p.566-567.

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

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

LITHERLAND, N.B. Adequacy of processing adjustment factors (PAF's) and intake discounts for dairy cows. Invited Presentation. In: Oklahoma cattle grain processing symposium, 2006. Oklahoma, **Proceedings**. Oklahoma, 2006. p. 110-116.

MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *Journal of AOAC International*, Maryland, v. 85, p. 1217-1240, 2002.

MORAN, J.P.; WEINBERG, Z.G.; ASHBELL, G.; HEN, Y.; OWEN, T.R.. A comparison of two methods for the evaluation of the aerobic stability of whole crop wheat silage. In: **Proceedings** of XI International Silage Conference. Aberystwyth, UK, 162-163. 1996.

NELLIS, S.E., HOFFMAN, P.C., SHAVER, R.D. *Technical note*: A modified method to quantify prolamin proteins in dry and high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.96, p.4647–4652, 2013.

OGDEN, R.K.; COBLENTZ, W.K.; COFFEY, K.P.; TURNER, J.E.; SCARBROUGH, D.A.; JENNINGS, J.A.; RICHARDSON, M.D. Ruminant in situ disappearance kinetics of dry matter

and fiber in growing steers for common crabgrass forages sampled on seven dates in northern Arkansas. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 83, p. 1142-1152, 2005.

ORSKOV, E.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, v. 92, n. 2, p. 499-503, 1979.

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. et al. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Eds.) **Silage Science and Technology**. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p.31-94.

PITT, R.E. **Silage and hay preservation**. Ithaca: Northeast Regional Agricultural Engineering Service. 1990. 53p.

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

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 3rd ed., New York: Marcel Dekker, 2004. 633p.

USHER, C.D.; TELLING, G.M. Analysis of nitrate and nitrite in foodstuffs: a critical review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.26, p.1793-1805, 1975.

WEISSBACH, F. Correction of dry matter content of silages used as substrate for biogas production. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 15., 2009. Madison. **Proceedings...** Madison, 2009. p.483-484.

ZANOTTO, D.L.; BELLAVER, C. **Método de determinação da granulometria de ingredientes para uso em rações de suínos e aves**. Concórdia : EMBRAPA Suínos e Aves, 1996. 5p.

4 ENSILAGEM DE GRÃOS DE MILHO REIDRATADOS ADITIVADAS OU NÃO COM BENZOATO DE SÓDIO PARA VACAS LEITEIRAS

Resumo

A disponibilidade do amido de silagens de grãos úmidos de milho pode ser afetada pelo uso de aditivos. Para testar esta hipótese, foi conduzido um experimento utilizando-se 18 vacas Holandês, com média de produção de 30 L. Foram avaliadas as respostas em desempenho e digestibilidade de nutrientes das dietas. Para tanto, os animais foram distribuídos em seis quadrados latinos, definidos de acordo com a produção de leite individual. Os tratamentos utilizados foram: silagem de grãos de milho reidratados sem aditivo (Controle); silagem de grãos de milho reidratados tratados com benzoato de sódio (2,0 g/kg, MN) e milho seco moído (MiS). Outro estudo foi realizado para avaliar a degradabilidade ruminal dos grãos, utilizando-se três vacas canuladas no rúmen. A taxa fracional de digestão da MS no rúmen foi maior para silagens tratadas com benzoato de sódio. No estudo de desempenho, não foram observadas diferenças no CMS (média 21,1 kg/dia), porém houve tendência de maior produção de leite corrigido para 3,5% de gordura e de maior eficiência alimentar para animais recebendo silagens. Com exceção da concentração de nitrogênio ureico, a composição média do leite não foi alterada. O tratamento com milho seco aumentou a concentração de N-ureico no leite ($13,0 \times 11,9$ mg/dL), o que sugere um melhor uso de nitrogênio para produção de proteína microbiana em vacas alimentadas com silagens. Os coeficientes de digestibilidade da MS, MO, PB, EE, CNF e amido foram superiores para as silagens, comparado ao milho seco. A digestibilidade da fração fibrosa não diferiu entre os tratamentos. O NDT estimado para as diferentes dietas foi maior para as silagens em comparação ao milho seco. A avaliação do comportamento ingestivo não mostrou variação no tempo despendido com a ingestão de alimentos. Os tempos de ruminação e mastigação foram menores para as silagens, comparadas ao milho seco. O mesmo comportamento pôde ser observado para a relação entre mastigação e CMS. As relações entre derivados de purina foram melhoradas na presença de benzoato de sódio, sendo indicativas de eficiência na síntese de proteína microbiana. Desse modo, o aditivo benzoato de sódio mostrou-se adequado para utilização em silagens de grãos de milho reidratados destinados para vacas leiteiras.

Palavras-chave: Milho reconstituído; Silagem de grãos; Ácido benzoico; Aditivo químico, Desempenho animal; Rúmen

Abstract

The availability of starch from high moisture corn grain silages can be affected by the use of additives. In order to test this hypothesis, was conducted an experiment using 18 Holstein cows with 30 L of milk production, in average. The responses in performance and nutrients digestibility were evaluated. Thus, the animals were divided into six Latin squares, defined according to milk production. The treatments used were: rehydrated corn grain silage without additive (control); rehydrated corn grain silage treated with sodium benzoate (2.0 g/kg, FM) and dry ground corn (MiS). Separately, three non-lactating cows fitted with rumen cannula were used during the ruminal degradability assay. The fractional rate of DM digestion in the

rumen was higher for sodium benzoate treated silages. In the performance trial, no differences were observed in DMI (average of 21.1 kg/day), however there was a trend of increased production of 3.5% fat corrected milk and higher feed efficiency for animals fed silages. Excepting for milk ureic nitrogen concentration (MUN), milk composition was similar between treatments. Dry ground corn increases the concentration of MUN (13.01×11.92 mg/dL), suggesting a better use of nitrogen for microbial protein synthesis in animals fed silages. The digestibility coefficients of DM, OM, CP, EE, NFC and starch were higher in silage treatments compared to dry corn. The NDF digestibility did not differ between treatments. The TDN estimative was higher for silages in comparison to dry ground corn. The ingestive behavior evaluation showed no variation in time spent with food intake. Rumination and chewing times were lower for silages, compared to dry ground corn. The same behavior can be observed for chewing/DMI ratio. The relationship between derivatives of purine have been improved in the presence of sodium benzoate, suggesting efficiency in microbial protein synthesis. Thus, we concluded that sodium benzoate is a suitable additive for use in rehydrated corn grain silages for dairy cows.

Keywords: Reconstituted corn; Grain silages; Benzoic acid; chemical additive; Animal performance; Rumen

4.1 Introdução

A ensilagem de grãos de milho com alta umidade promove ganhos em digestibilidade do amido (HOFFMAN et al. 2011), porém torna os grãos propensos à deterioração aeróbia (TAYLOR e KUNG, 2002), justificando o emprego de aditivos para este fim. O benzoato de sódio é um composto antimicrobiano (Woolford, 1975) capaz de promover estabilidade aeróbia em silagens. Entretanto, esse aditivo restringe o metabolismo dos microrganismos fermentadores, fato constatado pela conservação de carboidratos solúveis e diminuição nas contagens de leveduras, bem como de bactérias ácido lácticas (BERNARDES et al, 2015; Da SILVA et al., 2014).

A proteólise ocorrida dentro do silo advém de fontes como proteases bacterianas e ácidos orgânicos da fermentação, estes com ação solubilizadora (HOFFMAN et al. 2011). Junges et al. (2015) isolaram possíveis fontes de proteólise no silo, como bactérias, fungos, ácidos orgânicos e enzimas do grão, sendo constatado que a ação de bactérias respondeu por 60,4% da proteólise ocorrida em silagens de grãos de milho reidratados.

Desse modo, foi hipotetizado no presente trabalho que o benzoato de sódio poderia incidir negativamente sobre a proteólise no silo, devido ao controle irrestrito do crescimento microbiano. A degradabilidade ruminal *in situ* de silagens tratadas com benzoato de sódio não foi modificada em relação ao controle (capítulo anterior). No entanto, para uma avaliação abrangente é desejável que os grãos tratados sejam submetidos aos eventos de digestão e passagem ao longo do trato digestivo, para mensuração do real impacto da aditivação sobre o aproveitamento dos grãos pelos ruminantes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de vacas leiteiras alimentadas com silagens de grãos reidratados sem aditivos ou tratadas com benzoato de sódio, comparadas ao fornecimento do milho seco moído.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Confeção das silagens para alimentação animal

O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP). Grãos de milho de um híbrido comercial, de genética desconhecida foram utilizados para a produção das silagens. Os grãos foram adquiridos moídos no varejo local e após amostragens aleatórias, foram tomadas três porções de aproximadamente 200g, que foram agitadas mecanicamente sobre um conjunto de peneiras com malhas de 6,79; 4,76; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,105 mm (ZANOTTO; BELLAYER, 1996). O material apresentou granulometria de 1,43 mm (Fig. 4), que de acordo com LITHERLAND (2006) não caracteriza moagem fina. Para efeito de processamento, o milho foi classificado apenas como milho moído.

Figura 4 - Distribuição do tamanho de partículas do milho moído utilizado para confecção de silagens para alimentação de vacas leiteiras

Os grãos apresentaram umidade inicial de 9% e como o material estava moído, não foi possível analisá-lo quanto à vitreosidade. Para assegurar que se tratava de um milho duro, o teor de prolaminas foi previamente determinado, conforme Nellis; Hoffman e Shaver (2013). Optou-se pelo uso de um milho de endosperma duro para representar as condições brasileiras, onde a maioria dos materiais são caracterizados por elevada vitreosidade, impactando negativamente sobre a digestibilidade ruminal do amido (Correa et al., 2002). O teor de

prolaminas aferido nos grãos do presente experimento foi condizente ao relatado por Fernandes (2014) para milho duro. A composição química e a população microbiana epífita dos grãos estão apresentadas na tabela a seguir.

Tabela 11 - Caracterização químico-bromatológica e população microbiana epifítica do milho moído empregado na confecção de silagens em larga escala

Item	Mensuração e Desvio Padrão	
MS, %	91,0	± 0,03
MM, % MS	1,33	± 0,01
EE, % MS	3,80	± 0,29
PB, % MS	9,20	± 0,05
Prolaminas, %MS	4,63	± 0,15
PBSol, %PB	20,6	± 2,65
FDN, % MS	9,04	± 0,03
FDA, % MS	1,75	± 0,13
CS, %MS	1,89	± 0,57
CNF, % MS	76,7	± 0,28
BAL, log ufc/g	3,62	± 0,88
Fungos, log ufc/g	2,88	± 0,57
Leveduras, log ufc/g	2,54	± 0,34

MS – matéria seca; MM – matéria mineral; EE – extrato etéreo; PB – proteína bruta; PBSol – proteína bruta solúvel; FDN – fibra em detergente neutro; FDA – fibra em detergente ácido; CS – carboidratos solúveis; CNF – carboidratos não fibrosos; BAL – bactérias ácido láticas; ufc – unidades formadoras de colônias.

As silagens de grãos de milho reidratados foram produzidas para atender ao experimento de desempenho com 18 vacas leiteiras, programado para uma duração de 66 dias, divididos em três períodos experimentais. Para garantir tempos de fermentação semelhantes ao início de cada período, a confecção das silagens foi escalonada em três datas, espaçadas entre si por 22 dias, que foi o tempo de duração dos períodos. Foram utilizados como silos tambores plásticos com capacidade de 200 L, revestidos com sacos de polietileno e providos de tampas para vedação. A acomodação dos grãos nos silos resultou em densidades próximas a 1200kg/m³.

A reidratação dos grãos de milho visou elevar a umidade da massa para 35%. Foi utilizado apenas água para confecção do tratamento sem aditivo (**Controle**). A

homogeneização da mistura foi realizada durante 20 minutos em um vagão misturador vertical, modelo VM4, DeLaval®. Para confecção das silagens tratadas com benzoato de sódio (**Benz**), o aditivo foi diluído previamente na água destinada à reidratação, de modo que a concentração final do aditivo na massa fosse 2,0 g/kg MN. A compactação dos grãos de milho nos tambores foi realizada por meio de pisoteio humano. Paralelamente, grãos do milho seco acondicionados em sacos, foram armazenados em galpão para serem utilizados como a terceira fonte de milho do ensaio de desempenho animal (Tratamento Milho seco – **MiS**).

Após 180 dias de fermentação, foi iniciado o fornecimento das silagens destinadas ao primeiro período experimental. Os silos foram abertos gradualmente, conforme a demanda de alimentos dos animais. O manejo dos silos incluiu retiradas mínimas de 10 cm de silagem por dia. Após desabastecimento, o saco plástico usado no revestimento interno do silo era amarrado rente à superfície da silagem, a fim de reduzir a exposição ao ar. A caracterização químico-fermentativa das silagens foi realizada a partir de amostras coletadas dentro da semana de coletas de cada período experimental.

4.2.2 Animais, manejo e composição das rações

Foram utilizadas 18 vacas Holandês, com peso vivo de 730 ± 57 kg. Os animais estavam em estágio avançado de lactação (DEL médio de 259 d) e produção leiteira diária de 30 kg, em média. As vacas foram ranqueadas por produção leiteira, alocadas em seis Quadrados Latinos 3×3 e mantidas em sistema de confinamento tipo tie-stall, dotados de cochos que permitiram o controle do consumo individual, além de bebedouros e sistema de arrefecimento. As dietas experimentais utilizadas foram: **Controle** – Dieta a base de silagem de grãos de milho reidratado, sem aditivo; **Benz** – Dieta a base de silagem de milho reidratado, tratada com o aditivo benzoato de sódio na dose 2,0 g/kg MN e **MiS** – Dieta a base de milho seco moído

A proporção de ingredientes e a composição nutricional das rações experimentais está apresentada na tabela 12, configurando uma dieta facilmente aplicável em condições práticas de fazendas. Cada período experimental teve duração de 22 dias, sendo 16 dias de adaptação às dietas experimentais e os outros seis dias para coletas de dados. Os animais foram pesados em dois dias consecutivos, no início do experimento e ao final de cada período de avaliação.

Tabela 12 - Participação de ingredientes e composição nutricional de dietas formuladas com milho moído seco (MiS), milho reidratado e ensilado sem aditivos (Controle) ou milho reidratado e ensilado com benzoato de sódio (Benz)

Ingredientes	MiS		Controle		Benz	
Silagem de milho, % MS	37,1	± 0,5	37,0	± 0,5	37,2	± 0,5
Feno de Coast-cross, % MS	10,0	± 0,1	10,0	± 0,1	10,1	± 0,2
Farelo de soja, % MS	21,2	± 0,2	21,1	± 0,2	21,2	± 0,2
Polpa cítrica, % MS	11,8	± 0,1	11,8	± 0,1	11,8	± 0,2
Milho Seco, % MS	17,2	± 0,2	—	—	—	—
Milho reidratado controle, % MS	—	—	17,4	± 0,1	—	—
Milho reidratado benzoato, % MS	—	—	—	—	16,9	± 0,2
Premix mineral, % MS	2,72	± 0,0	2,70	± 0,0	2,72	± 0,0
Bromatologia						
MS, % MN	46,4	± 0,4	44,5	± 0,3	44,6	± 0,3
PB, % MS	17,6	± 0,2	17,5	± 0,2	17,5	± 0,3
FDN, % MS	33,8	± 1,4	31,4	± 1,0	31,2	± 1,2
FDA, % MS	19,1	± 0,9	18,4	± 0,8	18,2	± 0,9
EE, % MS	2,41	± 0,2	2,43	± 0,2	2,41	± 0,2
Cinzas, % MS	7,21	± 0,0	7,44	± 0,0	7,38	± 0,0
CNF, % MS	39,0	± 1,0	41,3	± 0,6	41,6	± 0,8
Amido, % MS	21,6	± 0,0	21,2	± 0,0	20,8	± 0,0
Tamanho de partículas						
Partículas > 38 mm, % MN	5,0	± 3,0	7,0	± 3,0	5,0	± 3,0
Partículas <38 e >19 mm, % MN	9,0	± 3,0	9,0	± 2,0	10,0	± 1,0
Partículas > 8 e < 19 mm, % MN	26,0	± 2,0	27,0	± 3,0	29,0	± 4,0
Partículas < 8 mm, % MN	60,0	± 2,0	57,0	± 3,0	56,0	± 2,0

MS – matéria seca; MN – matéria natural; PB – proteína bruta; FDN – fibra em detergente neutro; FDA – fibra em detergente ácido; EE – extrato etéreo; CNF – carboidratos não fibrosos.

Durante o período de avaliação, amostras das silagens de grãos e da silagem de milho planta inteira, amostras de ração total, sobras e dos ingredientes concentrados oferecidos em cada tratamento foram coletadas diariamente, sendo compostas por semana de experimentação. Subamostras de aproximadamente 500 g foram destinadas à secagem e posteriores análises químico bromatológicas (Tabelas 13 e 14).

Tabela 13 - Composição química e aspectos microbianos e fermentativos das silagens de grãos reidratados, sem aditivo (SGRControle) ou com benzoato de sódio (SGRBenzoato) e da silagem de milho planta inteira utilizadas no experimento de desempenho animal

Items	SGRControle	SGRBenzoato	Silagem Milho PI
MS, % MV	62,7 ± 0,40	62,9 ± 0,98	28,8 ± 1,94
Mscorr, % MS	63,6 ± 0,20	63,4 ± 0,90	30,2 ± 1,64
PB, %MS	8,99 ± 0,07	8,78 ± 0,58	7,46 ± 0,45
Prolaminas, %MS	2,57 ± 0,49	2,57 ± 0,39	-
PBSol, %PB	61,0 ± 2,08	54,0 ± 3,92	-
N - NH ₃ , % Ntotal	10,3 ± 0,38	10,7 ± 1,32	-
FDN, % MS	5,85 ± 0,12	6,44 ± 0,44	50,5 ± 1,69
FDNi, % MS	0,91 ± 0,06	0,96 ± 0,02	15,1 ± 1,52
FDA, % MS	1,38 ± 0,24	1,57 ± 0,53	29,8 ± 2,35
EE, %MS	4,16 ± 0,23	4,30 ± 0,02	2,77 ± 0,27
Cinzas, % MS	1,22 ± 0,06	1,30 ± 0,02	3,91 ± 0,51
CNF, % MS	79,8 ± 0,14	79,2 ± 0,32	33,8 ± 3,44
Amido, % MS	68,7 ± 0,0	67,9 ± 0,0	21,8 ± 0,0
CS, % MS	0,70 ± 0,33	0,76 ± 0,36	1,19 ± 0,26
pH	3,81 ± 0,00	3,77 ± 0,00	3,82 ± 0,24
Ác. láctico, % MSCor	2,23 ± 0,60	1,80 ± 0,20	1,78 ± 0,42
Ác. acético, % MSCor	0,61 ± 0,00	0,46 ± 0,00	2,96 ± 1,00
Ác. propiônico, mg/kg MSCor	167 ± 58,0	122 ± 14,0	590 ± 32,0
Ác. butírico, mg/kg MSCor	57,5 ± 25,0	46,3 ± 19,0	351 ± 213
Etanol, % MSCor	0,48 ± 0,20	0,11 ± 0,00	0,40 ± 0,09
BAL, log ufc/g MN	3,54 ± 0,64	2,41 ± 0,10	7,24 ± 0,09
Leveduras, log ufc/g MN	<2,0	<2,0	6,69 ± 0,10
Clostrídeos, log ufc/g MN	<3,0	<3,0	-
Estabilidade aeróbia, H	120 ± 27,9	240 ± 0,00	6,75 ± 8,76

MS – matéria seca; MSCor- matéria seca corrigida para compostos voláteis; PB – proteína bruta; PBSol – proteína solúvel; N-NH₃ – nitrogênio amoniacal; FDN – fibra em detergente neutro; FDNi – FDN indigestível; FDA – fibra em detergente ácido; EE – extrato etéreo; CNF – carboidratos não fibrosos; CS – carboidratos solúveis; MSCor – matéria corrigida para voláteis; ; BAL – bactérias ácido lácticas; ufc – unidade formadora de colônia.

Tabela 14 - Composição química dos ingredientes não fermentados, utilizadas nas dietas experimentais

Item	Milho seco	F. Soja	Polpa Cítrica	Feno
MS, % MN	91,0 ± 1,37	93,9 ± 0,79	92,9 ± 0,67	92,2 ± 0,46
PB, %MS	9,09 ± 0,25	54,6 ± 0,88	6,80 ± 0,36	8,76 ± 0,67
FDN, % MS	9,04 ± 0,34	13,3 ± 1,40	20,1 ± 0,48	78,0 ± 0,90
FDNi, % MS	1,04 ± 0,02	0,77 ± 0,03	2,55 ± 0,06	26,6 ± 1,18
FDA, % MS	1,75 ± 0,11	8,19 ± 1,04	16,7 ± 0,72	40,9 ± 0,81
EE, %MS	3,80 ± 0,13	2,10 ± 0,60	1,63 ± 0,06	0,95 ± 0,31
Cinzas, % MS	1,33 ± 0,02	6,56 ± 0,07	7,51 ± 0,16	5,26 ± 0,46
CNF, % MS	76,7 ± 0,55	23,5 ± 0,82	33,8 ± 0,37	7,04 ± 1,09
Amido, % MS	71,7 ± 0,0	5,80 ± 0,0	-	-

MS – matéria seca; MN – matéria natural; PB – proteína bruta; FDN – fibra em detergente neutro; FDNi – FDN indigestível; FDA – fibra em detergente ácido; EE – extrato etéreo; CNF – carboidratos não fibrosos.

4.2.3 Análise dos alimentos

4.2.3.1 Silagens: fermentação e estabilidade aeróbia

Para quantificação dos microrganismos presentes nas silagens foi preparado um extrato aquoso adicionando-se 225 g de água deionizada estéril em 25 g de amostra fresca. A mistura foi agitada por 4 minutos em homogeneizador de alimentos, filtrada e diluída sequencialmente (10^{-1} a 10^{-6}), para então proceder-se aos plaqueamentos em triplicata, pela técnica *pour plate*. Foram utilizados os meios: MRS, para contagem de BAL (acrescido do antifúngico Natamicina, 0,25 g/L), com placas incubadas a 32°C por 48 hs; Ágar Malte, para contagem de leveduras e fungos filamentosos (acrescido de ácido láctico na concentração de 0,5%), com incubação das placas a 32°C, por 48 h para leitura de leveduras e por 5 a 7 dias para leitura de fungos filamentosos, além do caldo RCM, solidificado com ágar bacteriológico e enriquecido com vermelho neutro (0,005%) e cicloserina (0,2g) foi utilizado para quantificação de esporos de clostrídios.

Os teores de etanol, ácidos orgânicos, ésteres e aldeídos foram determinados no extrato aquoso, após filtragem e centrifugação, por meio de cromatógrafo gasoso com detector de massas (GC-MS) (GCMS QP 2010 plus, Shimadzu®, Kyoto, Japan), usando

coluna capilar (Stabilwax, Restek®, Bellefonte, USA; 60 m, 0,25 mm ø, 0,25 µm crossbond carbowax polyethylene glycol). O teor de ácido láctico foi determinado por método colorimétrico (Pryce, 1969). O pH foi determinado no extrato aquoso em pHmetro digital marca Digimed DM-22®, previamente calibrado. Foi avaliada a estabilidade aeróbia das silagens de grãos e da silagem de milho planta inteira utilizadas nas dietas, segundo Moran et al. (1996).

O teor de matéria seca em estufa à 55°C foi corrigido para produtos voláteis de acordo com equação de Weissbach (2009), onde ácidos graxos voláteis* incluem: ácido acético, propiônico, iso-butírico, butírico, iso-valérico e valérico:

$$\begin{aligned} \text{MS corrigida (\%MV)} = & \text{MS estufa (\%MV)} + 0,08 \times \text{ácido láctico (\%MV)} + 0,77 \times \\ & 1,2\text{-propanodiol (\%MV)} + 0,87 \times 2,3\text{-butanodiol (\%MV)} + 0,95 \times \text{ácidos graxos} \\ & \text{voláteis* (\%MV)} + \text{lactato de etila (\%MV)} + 1\text{-propanol (\%MV)} + 2\text{-butanol} \quad (\text{Eq.5}) \\ & (\%MV) + \text{acetato de propila (\%MV)} + \text{etanol (\%MV)} + \text{álcool iso-propílico} \\ & (\%MV) + \text{acetato de etila (\%MV)} + \text{acetona (\%MV)} \end{aligned}$$

4.2.3.1 Análises bromatológicas e tamanho de partículas

As amostras de alimentos coletadas foram analisadas quanto ao teor de matéria seca (AOAC, 2000) e cinzas (AOAC, 1997), determinada sequencialmente à MS 105 °C. A proteína bruta foi obtida a partir do nitrogênio determinado por combustão, pelo método de Dumas, no aparelho Leco 2000 (Leco Instruments Inc.), (AOAC, 1990). O extrato etéreo foi estimado pelo método de extração Soxhlet (AOAC (1997). A fibra em detergente neutro foi obtida por lavagem das amostras em detergente neutro, adicionado de sulfito de sódio e amilase termoestável (MERTENS, 2002) e a fibra em detergente ácido foi realizada sequencialmente, por lavagem em detergente ácido. Os teores de FDN e FDA foram corrigidos para conteúdo de cinzas. Utilizou-se colorimetria para determinação de carboidratos solúveis (HALL, 2000). O teor de amido foi avaliado por hidrólise enzimática e a determinação da glicose resultante, analisada por espectrometria (HALL, 2000). Essa metodologia foi aplicada às amostras de alimentos, enquanto o amido das fezes foi determinado por espectroscopia de reflectância do infravermelho próximo, no aparelho NIRSystem 500 (Foss®).

A fração nitrogenada das silagens de grãos foi decomposta pelo método Macro

Kjeldhal (AOAC, 1990). O teor de nitrogênio amoniacal foi determinado na amostra fresca, por destilação em meio básico (NaOH a 35%), adicionado de óxido de magnésio. A proteína solúvel foi estimada a partir da diferença entre o nitrogênio total da amostra e o nitrogênio insolúvel, obtido após banho em tampão borato-fosfato (KRISHNAMOORTHY et al., 1982). A proteína ligada à fibra foi determinada no resíduo obtido a partir da lavagem em detergente neutro, acrescido de amilase termooestável. Este procedimento foi executado em um analisador de fibra Marconi®. A extração das proteínas prolaminas foi realizada pelo método rápido de Bradford, segundo Nellis; Hoffman e Shaver (2013).

Amostras de silagem de milho planta inteira, das dietas ofertadas e das sobras dos animais foram mantidas frescas e refrigeradas para posterior determinação do tamanho médio de partículas. Foi adotado um sistema de estratificação em peneiras, com peneira adicional contendo orifícios de 38 mm de diâmetro (JOBIM et al., 2007), o que constitui uma adaptação ao método “Penn State Particle Size Separator” (LAMMERS et al., 1996).

4.2.4 Desempenho: consumo de alimentos, produção e composição do leite

As rações completas foram fornecidas aos animais duas vezes ao dia, após as ordenhas realizadas às 08:00 h e às 18:00 h. O consumo diário de MS foi obtido pela diferença entre a quantidade de alimentos fornecida e as sobras.

A produção de leite foi registrada diariamente e amostras de leite referentes a dois dias de coleta, por período experimental, foram encaminhadas ao Laboratório de Análise de Leite, da Clínica do Leite do Departamento de Zootecnia da USP/ESALQ em Piracicaba – SP, para determinação da composição do leite. As leituras dos teores de proteína, gordura, lactose e caseína foram realizadas por absorção de infravermelho próximo, utilizando-se equipamento Bentley 2000®. A contagem de células somáticas (CCS) foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se equipamento Somacount 300®. O nitrogênio ureico do leite (NUL) foi determinado por absorção de infravermelho, utilizando-se equipamento de marca FOSS®. A produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (LC 3,5% G) foi calculada a partir da equação proposta por Tyrrell e Reid (1965):

$$LC\ 3,5\% \ G = (0,4324 \times \text{kg de leite}) + (16,216 \times \text{kg de gordura}) \quad (\text{Eq.7})$$

A eficiência alimentar foi determinada pelas relações entre a produção de leite e o

CMS e entre a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura e o CMS. O teor e a excreção de energia no leite, em Mcal/kg, foram calculados segundo as equações do NRC (2001) onde:

$$\text{ELL (Mcal/kg)} = (0,0929 \times \% \text{ gordura}) + (0,0547 \times \% \text{ proteína}) + (0,0395 \times \% \text{ lactose}) \quad (\text{Eq.8})$$

$$\text{Excreção de ELL (Mcal/d)} = \text{Prod. Leite (kg/d)} \times \text{ELL (Mcal/kg)} \quad (\text{Eq.9})$$

4.2.5 Comportamento ingestivo, digestibilidade e outras medidas nos animais

Foi realizada a avaliação do comportamento ingestivo dos animais com observações a cada 10 minutos durante 24 horas, computando-se atividades de ingestão, ruminação, ócio e ingestão de água (MAEKAWA et al., 2002). O índice de seleção de partículas foi calculado como o consumo observado de cada fração retida por peneira, expresso como porcentagem do consumo predito, base na MN. Valores indicaram recusa (<100%), ingestão preferencial (>100%) ou ausência seleção (=100%) (LEONARDI; ARMENTANO, 2003).

Amostras de fezes e urina foram coletadas às 6, 11, 16 e 20 horas de dias diferentes, de modo que a coleta desses materiais não coincidissem nos horários e que uma amostra de cada tipo fosse obtida por dia. Tais alíquotas foram imediatamente congeladas após as coletas. Ao final do período experimental as amostras foram descongeladas e compostas, a partir de alíquotas idênticas provenientes de cada horário de amostragem.

A digestibilidade aparente no trato total das rações contendo os diferentes tipos de grãos de milho, foi avaliada por meio do marcador interno (FDNi), segundo metodologia descrita por Huhtanen; Kaustell e Jaakkola, (1994). Para confecção dos mini-bags utilizados para incubação ruminal, foram pesados 0,7 g de amostras secas de fezes e de silagens, em duplicata e 3,0 g de amostras de ingredientes concentrados, em triplicata. Foram utilizados sacos ANKOM® Fiber Analyser (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY), fechados com seladora e incubados no rumem de um animal fistulado, durante 288 horas. A dieta do animal continha as mesmas proporções de ingredientes da dieta experimental empregada no experimento de lactação. Após o tempo total de incubação, os sacos foram removidos do rúmen e imediatamente submersos em água com gelo (0°C). A seguir, os sacos foram lavados em máquina de lavar roupas, por quatro ciclos, até que a água se tornasse transparente. O excesso de água foi retirado manualmente por meio de compressão leve dos sacos, que posteriormente foram secos em estufa a 55° C por 72 horas para posterior pesagem e

determinação do FDN, sendo o resíduo obtido chamado de FDNi. A produção fecal foi calculada seguindo metodologia sugerida por Merchen (1993) e representada pela equação 10, onde Pf = produção fecal de matéria seca (kg/dia); Im = Ingestão do marcador (kg/dia); Cfm = concentração fecal do marcador (g/kg de fezes).

$$Pf = Im \div Cfm \quad \text{Eq.10}$$

O coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca (DigMS) foi calculado segundo Merchen (1993), onde: IMS = Ingestão de MS (kg/dia); PF = Produção fecal de MS (kg/dia):

$$\text{DigMS (\%)} = \frac{(IMS - PF)}{(IMS)} \times 100 \quad \text{(Eq.11)}$$

O coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes (DigN) foi calculado segundo Merchen (1993) – Eq. 12, onde: DigN = coeficiente de digestibilidade aparente do nutriente; CMS = consumo de matéria seca em kg/dia; PF = produção fecal de matéria seca em kg/dia; %NR = concentração do nutriente na ração; %NF = concentração fecal do nutriente.

$$\text{DigN} = 100 \times \frac{[(CMS \times \%NR) - (PF \times \%NF)]}{(CMS \times \%NR)} \quad \text{(Eq.12)}$$

A partir das digestibilidades aparentes dos nutrientes foi calculado o NDT e estimadas as concentrações de energia das rações conforme (NRC, 2001):

$$\bullet \quad \text{NDT (\%)} = \% \text{ PB Digestível} + \% \text{ CNF Digestível} + \% \text{ FDN Digestível} + (\% \text{ EE Digestível} \times 2,25) \quad \text{(Eq.13)}$$

$$\text{Energia digestível (Mcal/kg)} = (\% \text{ CNF digestível}/100) \times 4,2 + (\% \text{ FDN digestível}/100) \times 4,2 + (\% \text{ PB digestível}/100) \times 5,6 + (\% \text{ EE digestível}/100) \times 9,4 - 0,3 \quad \text{(Eq.14)}$$

$$\text{Energia metabolizável (Mcal/kg)} = 1,01 \times \text{ED (Mcal/kg)} - 0,45 \quad \text{(Eq.15)}$$

$$\text{Energia líquida de lactação (Mcal/kg)} = 0,703 \times \text{EM (Mcal/kg)} - 0,19 \quad \text{(Eq.16)}$$

Amostras de sangue dos animais foram coletadas 10 horas após o trato da manhã, por meio de punção dos vasos coccígeos medianos. Foram utilizados tubos a vácuo contendo anticoagulante e estabilizador para separação do plasma mediante centrifugação. As análises de glicose (glicose oxidase) e de ácidos graxos não esterificados (espectrofotometria enzimática) foram determinadas por métodos enzimáticos.

As amostras de urina compostas por período experimental foram acidificadas com ácido sulfúrico concentrado (2 a 3 gotas de ácido / 40 mL de amostra), para obtenção de valores de pH inferiores a 3,0. Alíquotas de 20 mL da urina acidificada foram alocadas em recipiente plástico e imediatamente congeladas a -20°C para posterior determinação das concentrações de alantoína, ácido úrico e creatinina por cromatografia líquida (CZAUDERNA; KIWALCZYK, 2000) no Laboratório de Nutrição Animal (CENA/USP, Piracicaba/SP).

4.2.6 Degradabilidade ruminal *in situ* de grãos secos e silagens de grãos de milho

A degradabilidade da matéria seca das silagens de grãos e do milho seco foi avaliada por meio da incubação de amostras frescas, pesadas para conterem, proporcionalmente, 5 g de matéria seca. As pesagens foram feitas em triplicata e as amostras foram acondicionadas em sacos de náilon (20cm por 10cm, com porosidade de 30µm e incubados no rúmen de três vacas mestiças não lactantes, recebendo dieta com formulação idêntica à do experimento de desempenho. A fonte de milho utilizada neste experimento continha (base na MS): 1/3 de milho moído seco, 1/3 da silagem de grãos reidratados sem aditivo e 1/3 da silagem de grãos com benzoato de sódio. A incubação de amostras no rúmen dos animais foi repetida três vezes e a cada incubação, os três tratamentos eram incubados no rúmen de todas as vacas.

Os tempos de incubação utilizados foram de 0, 12, 24 e 48 horas. Os sacos foram incubados em ordem reversa aos tempos e retirados conjuntamente do rúmen. Foi aplicada uma lavagem manual dos sacos sendo adicionados aqueles referentes ao tempo 0 no momento da lavagem. A seguir, os sacos foram secos em estufa de ventilação forçada a 55°C, por 72 horas e pesados para determinação do desaparecimento gravimétrico de matéria seca.

Os parâmetros de degradabilidade ruminal foram determinados, segundo o modelo de Orskov e McDonald (1979), Eq. 6. A partir dos dados de degradação obtidos para cada tempo, obteve-se as frações: Solúvel (A) = obtida por diferença entre a massa de grãos incubada o

resíduo do tempo 0; Indigestível (C) = resíduo do tempo 48h e a fração potencialmente degradável (B) = $100 - (A + C)$. A Degradabilidade potencial ($100 - C$) e a degradabilidade efetiva $\{A + B [kd / (kd + kp)]\}$ foram calculadas de acordo com Ogden et al. (2005), considerando-se taxas de passagem de $2\% h^{-1}$, $5\% h^{-1}$ e $8\% h^{-1}$.

4.2.7 Análise estatística

O experimento com vacas em produção foi desenvolvido sob um delineamento em quadrado latino. O modelo que descreveu as variáveis de desempenho, composição do leite e digestibilidade de nutrientes incluiu o efeito geral da média, efeito fixo de quadrado, efeito fixo de vaca dentro de quadrado, efeito fixo de período, efeito fixo de tratamento (milho seco, silagem de grão reidratado sem aditivo ou contendo benzoato de sódio) e o erro. A análise estatística foi realizada utilizando-se o PROC MIXED do SAS. Os graus de liberdade dos tratamentos foram divididos em dois contrastes ortogonais para avaliar o efeito de milho seco versus milho ensilado [$MiS \times (C+B)$] e o efeito de aditivo, por meio da comparação entre silagem do milho reidratado sem aditivo e silagem com adição de benzoato de sódio ($C \times B$).

A degradabilidade ruminal *in situ* das silagens foi realizada sob um delineamento em blocos casualizados. O modelo estatístico incluiu o efeito fixo de tratamento (milho seco, silagem de grão reidratado sem aditivo ou contendo benzoato de sódio), o efeito aleatório de bloco (Vacas A, B ou C) e o efeito aleatório de período de incubação, realizada três vezes. As médias foram comparadas pelos contrastes ortogonais previamente descritos: $MiS \times (C+B)$ e $C \times B$.

4.3 Resultados e Discussão

A degradabilidade ruminal da MS das silagens e dos grãos de milho seco está apresentada na tabela 15. Como esperado, as diferenças entre os parâmetros de degradabilidade das silagens e do milho moído comprovaram a eficiência da fermentação em aumentar o aproveitamento dos grãos no rúmen. É possível relacionar os valores de solubilidade obtidos à ocorrência de perdas na lavagem dos sacos. Isso explicaria, em parte, os valores demasiadamente altos da fração A dos grãos. No entanto, ressalta-se que o tecido utilizado (náilon) na confecção dos sacos era adequado, e que estes foram bem selados na

véspera da incubação. Após a desincubação do rúmen, os sacos foram lavados simultaneamente, em máquina de lavar. Esses cuidados garantiram as mesmas condições experimentais aos tratamentos, nos permitindo explorar a amplitude das diferenças entre os parâmetros de degradabilidade ruminal dos grãos.

Silagens tratadas com benzoato de sódio apresentaram menor fração solúvel que silagens controle. Isso condiz com o menor teor de proteína solúvel obtido para a silagem tratada com o aditivo (Tab. 13), visto que alterações menos severas na matriz proteica poderiam resultar em menor desagregação dos grânulos de amido, dificultando sua quebra e sua solubilização, ou lavagem. Como a fração indigestível (C) foi semelhante entre as silagens, a fração insolúvel, potencialmente digestível (B) foi maior para o benzoato de sódio. Apesar da menor solubilidade, as silagens tratadas com o aditivo químico apresentaram a maior taxa fracional de digestão (kd). A degradabilidade potencial foi semelhante entre as silagens, porém a inclusão de benzoato de sódio favoreceu a degradação efetiva da MS, estimada para elevadas taxas de passagem ($> 5\% \text{ h}^{-1}$).

Tabela 15 – Parâmetros de degradabilidade in situ de grãos de milho ou silagens de grãos de milho reidratados, aditivados ou não com benzoato de sódio

Item	Tratamentos			EPM	P	
	Controle	Benz	MiS		MiS $\times$ (C+B)	C $\times$ B
A (%)	67,4	63,1	13,2	3,89	<0,01	<0,01
B (%)	28,8	33,2	78,7	3,01	<0,01	<0,01
C (%)	3,74	3,70	8,11	1,24	<0,01	0,92
Kd ($\% \text{ h}^{-1}$)	5,57	5,87	3,96	0,28	<0,01	0,04
DEG _{pot} (%)	96,3	96,3	91,9	1,22	<0,01	0,92
DEG _{Ef} , 2% h^{-1}	88,7	87,8	65,2	1,86	<0,01	0,26
DEG _{Ef} , 5% h^{-1}	82,7	81,0	47,8	2,28	<0,01	0,06
DEG _{Ef} , 8% h^{-1}	79,4	77,1	39,1	2,54	<0,01	0,02

A – fração solúvel; B – fração potencialmente digestível; C – fração indigestível; Kd – taxa fracional de digestão; DEG_{pot} – Degradabilidade potencial ($100 - C$); DEG_{Ef} – Degradabilidade efetiva, estimada de acordo com taxas de passagem de 2%, 5% ou 8%; BENZ – benzoato de sódio; MiS – milho seco. Médias seguidas de mesma letra na linha, são semelhantes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Hoffman et al. (2001) demonstraram, por microscopia, os efeitos da ensilagem de grãos de milho sobre o desaparecimento das subunidades de zeína. Tais subunidades diferem

entre si, por exemplo, quanto ao posicionamento na matriz proteica e em torno dos grânulos de amido. A fermentação dos grãos por 240 dias promoveu reduções de até 73% das γ -zeínas, subunidades situadas mais superficialmente na matriz proteica, o que contribuiu para a individualização dos grânulos de amido. Os resultados de degradabilidade ruminal obtidos no presente estudo sugerem que, apesar de não resultar em solubilização da PB e, conseqüentemente, da MS, a inclusão do benzoato de sódio modificou a organização entre grânulos de amido e matriz proteica. Isso se deu de forma diferente da silagem controle, favorecendo a digestão das silagens contendo benzoato de sódio. Futuras abordagens em nível microscópio ajudarão a esclarecer as modificações provocadas pelo aditivo químico sobre a matriz proteica.

Quanto aos resultados de desempenho das vacas leiteiras, não houve variação no consumo de matéria seca em função dos tratamentos, com média de 21,1 kg/d (Tab. 16). Allen (2000) demonstrou que o aumento na proporção de amido sendo fermentado no rúmen, resultou em queda na ingestão de alimentos. No contexto do presente experimento, a ausência de diferença em consumo pode ser explicada pelo teor de amido das dietas (próximo de 21% da MS). Assim, o teor de amido, aliado ao potencial de consumo dos animais utilizados no experimento, não foi suficiente para impor regulação energética do consumo. Oba e Allen (2003) registraram queda significativa no consumo de alimentos quando as dietas com grão úmido continham 31% de amido (-7,6%). Os autores atribuíram essa diferença ao menor tamanho de refeição, uma vez que a rápida fermentação teria gerado saciedade rapidamente, com tamanho de refeição menor para a alta inclusão de amido. Para a dieta com 21% de amido o consumo foi semelhante entre os tratamentos seco e ensilado.

Os animais apresentaram ingestão preferencial de partículas pequenas (menores que 8 mm). O tempo gasto com a ingestão de alimentos não foi diferente entre os tratamentos, mas o tempo despendido com a atividade de ruminação foi superior nas dietas com milho seco. A atividade mastigatória (ingestão + ruminação) acompanhou a resposta em ruminação. Uma explicação para esse comportamento seria o tênue aumento no teor e no consumo de FDN de rações contendo milho seco, o que gerou estímulo à ruminação e mastigação neste tratamento. Na prática, os valores de FDN das silagens (média 6,1% MS) e dos grãos (média 9,0 % MS) deveriam ser próximos, por se tratar da mesma partida de milho. No entanto, as diferenças entre os grãos, provavelmente de ordem física, determinaram modificações no teor da fibra aferida em laboratório, mesmo com inclusão de α -amilase, além de impor a necessidade de maior tempo de ruminação para as dietas com milho seco.

Tabela 16 - Consumo de matéria seca e de fibra em detergente neutro (kg/d), comportamento ingestivo e índice de seleção praticado por vacas em lactação consumindo diferentes fontes de milho na dieta.

Item	Tratamento			EPM	P-valor	
	Controle	Benz	MiS		MiS $\times$ (C+B)	C $\times$ B
CMS, kg/dia	21,1	20,9	21,4	0,79	0,41	0,80
CFDN, kg/dia	6,23	6,15	6,87	0,24	<0,01	0,66
Ingestão, min/dia	220	197	229	14,7	0,18	0,19
Ruminação, min/dia	468	492	542	13,1	<0,01	0,13
Mastigação, min/dia	685	699	769	23,9	<0,01	0,52
Mastigação / CMS	33,3	34,2	36,9	1,12	<0,01	0,44
Mastigação / CFDN	111	116	115	3,94	0,69	0,22
IS peneira 19 mm, %	94,8	92,2	89,0	0,04	0,24	0,55
IS peneira 8 mm, %	97,5	98,3	96,3	0,01	<0,01	0,16
IS fundo, %	102	103	104	0,01	0,16	0,67

Benz – benzoato; MiS – milho seco; MiS $\times$ (C+B) = contraste milho seco $\times$ silagens; C $\times$ B = contraste silagem controle $\times$ silagem contendo benzoato; CMS – consumo de matéria seca; CFDN – consumo de fibra em detergente neutro; IS – índice de seleção.

Os resultados mais pronunciados em termos de digestibilidade, foram encontrados na comparação entre o milho seco e a média dos tratamentos ensilados (Tab. 17). A digestibilidade das dietas que continham silagens foi maior para matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo, CNF e amido. A digestibilidade da fração fibrosa não diferiu entre os tratamentos. Apesar do ligeiro aumento de FDN dietético nas dietas com milho seco, o aumento na ruminação e mastigação resultaram em maior relação mastigação: CMS, fazendo com que a digestibilidades da fração fibrosa se equivalesse aos demais tratamentos.

A digestibilidade do CNF e do amido foi maior para as silagens e esse aporte energético resultou em maiores teores de NDT nos grãos fermentados. Houve maior excreção de amido nas fezes de vacas alimentadas com silagem controle, em relação à silagem contendo benzoato. Esse comportamento pode ser explicado pela oferta, ligeiramente menor, de amido na dieta com benzoato de sódio, uma vez que a inclusão real de grãos de milho nessa dieta foi de 16,9% da MS, contra uma inclusão de 17,4% da MS, na dieta com milho reidratado sem aditivo. Segundo Owens e Soderlund (2006), a elevada ingestão de alimentos por vacas leiteiras determina maiores taxas de passagem, implicando em diminuição no tempo

para a hidrólise do amido. O aumento no fluxo de amido chegando no intestino delgado, determinará maiores perdas fecais.

Tabela 17 - Digestibilidade da matéria seca, da matéria orgânica, da proteína bruta, da fibra em detergente neutro, do extrato etéreo, dos carboidratos não fibrosos e do amido; nutrientes digestíveis totais das dietas e excreção de amido nas fezes

Item	Tratamento			EPM	P-valor	
	Controle	Benz	MiS		MiS × (C+B)	C × B
DigMS, %	73,3	72,8	69,6	0,01	<0,01	0,65
DigMO, %	76,7	76,2	73,6	0,01	0,01	0,65
DigPB, %	79,9	79,0	75,5	0,01	<0,01	0,41
DigFDN, %	52,8	51,3	52,7	0,02	0,75	0,52
DigEE, %	91,8	91,8	88,8	0,01	<0,01	0,95
DigCNF, %	91,4	91,6	88,1	0,01	<0,01	0,87
DigAmido, %	93,8	94,9	92,9	0,08	0,05	0,18
NDT, %	73,5	73,2	70,4	0,01	0,01	0,79
Amido fecal, %	4,90	3,92	4,99	0,38	0,13	0,03

Benz – benzoato; MiS – milho seco; MiS×(C+B) = contraste milho seco × silagens; C × B = contraste silagem controle × silagem contendo benzoato; DigMS – matéria seca; DigMO – digestibilidade da matéria orgânica; DigPB – digestibilidade da proteína bruta; DigFDN – digestibilidade do FDN; DigEE – digestibilidade do extrato etéreo; DigCNF – digestibilidade dos carboidratos não fibrosos; NDT – nutrientes digestíveis totais.

Os dados de produção e composição do leite estão dispostos na tabela 18. Houve tendência de aumento na produção de leite corrigido para 3,5% de gordura para as silagens de grãos. A média de produção de leite de vacas alimentadas com grãos fermentados foi 1,5 kg maior que dos animais que receberam milho seco. Esse aumento em produção foi suportado pelo maior aporte energético das silagens, com aproximadamente três unidades percentuais de incremento em NDT, comparado ao milho seco. Apesar da semelhança no consumo de alimentos, as silagens resultaram em uma excreção de energia no leite de 20,5 megacalorias por dia, em média, contra 19,3 Mcal para o milho seco. Os ganhos produtivos são frutos do método de processamento dos grãos, uma vez que não houve influência do aditivo sobre a produção de leite. As medidas de eficiência auxiliam na compreensão do efeito predominante da reidratação e ensilagem, visto que houve tendência de maior eficiência alimentar (considerando-se leite corrigido para 3,5% de gordura) para vacas leiteiras alimentadas com silagens. Estes animais também excretaram mais energia no leite em relação ao CMS.

Tabela 18 - Desempenho de vacas leiteiras consumindo dietas com diferentes fontes de milho

Item	Tratamento			EPM	P-valor	
	Controle	Benz	MiS		MiS $\times$ (C+B)	C $\times$ B
CMS, kg/dia	21,1	20,9	21,4	0,79	0,41	0,80
Leite, kg/d	28,7	29	27,4	1,74	0,14	0,75
Leite 3,5% G. kg/d	29,4	29,6	28,0	1,88	0,10	0,82
Gordura, %	3,61	3,61	3,8	0,25	0,36	0,99
Gordura, kg	1,05	1,05	1,00	0,08	0,19	0,92
Proteína, %	3,62	3,55	3,55	0,08	0,62	0,42
Proteína, kg	1,05	1,03	0,95	0,06	0,06	0,72
Lactose, %	4,37	4,44	4,42	0,08	0,68	0,22
ST. g/kg	12,5	12,6	12,8	0,33	0,18	0,83
ESD, %	8,94	8,97	8,97	0,12	0,85	0,71
CCS, $\times$ 100/mL	206	273	278	81,1	0,54	0,35
LOGCCS	2,13	2,15	2,15	0,11	0,76	0,76
NU, mg/dL	11,9	11,9	13,0	0,50	0,01	0,91
CAS, %	2,77	2,71	2,71	0,09	0,72	0,48
PCAS, kg	76,2	76,2	76,3	0,84	0,83	0,9
AGL, mmol/dL	0,88	0,89	0,97	0,19	0,55	0,93
PAGL, kg	0,26	0,25	0,28	0,06	0,46	0,86
Leite/CMS	1.35	1.36	1.31	0.06	0.13	0.86
Leite 3,5% G/CMS	1.39	1.38	1.31	0.06	0.10	0.84
EL _L por kg de leite, Mcal/kg	0,71	0,71	0,72	0,03	0,42	0,97
EL _L total no leite, Mcal/d	20,5	20,5	19,3	1,28	0,07	0,97
EL _L leite/CMS, Mcal/kg	0,97	0,96	0,91	0,04	0,07	0,71

Benz – benzoato; MiS – milho seco; MiS $\times$ (C+B) = contraste milho seco $\times$ silagens; C $\times$ B = contraste silagem controle $\times$ silagem contendo benzoato; G – gordura; EL – energia líquida; ESD – extrato seco desengordurado; AGL – ácidos graxos livres; NU – nitrogênio ureico; CCS – contagem de células somáticas; AGL – porcentagem de ácidos graxos livres; PCAS – porcentagem de caseína na proteína total livres.

Bradford e Allen (2004) obtiveram produções de leite semelhantes para grãos ensilados e secos, com média de 38,4 kg/dia. Houve redução no percentual de gordura do leite, sem alterar os níveis de proteína e lactose. Oba e Allen (2003) não registraram efeito do tipo de grão de milho sobre a produção das vacas leiteiras. A produção de leite variou em função do nível dietético de amido, sendo maior quando as vacas foram alimentadas com

dietas ricas em amido em relação à dieta com menor inclusão (38,6 vs 33,9 kg/d), que no caso era de 21% da MS.

As dietas contendo silagens resultaram em menores valores de N-NH₃, comparadas ao milho seco (11,9 vs 13,0 mg/dL), o que dá indícios de melhor sincronização entre a fermentação de carboidratos e compostos nitrogenados no rúmen. Houve tendência de maior produção diária de proteína no leite para os grãos fermentados, sendo esta, numericamente superior para a silagem de grãos sem aditivo. O efeito do aditivo benzoato de sódio foi pronunciado em maiores relações alantoína: creatinina e alantoína + ácido úrico: creatinina nas dietas com benzoato (Tab. 19), o que remete à maior eficiência de síntese de proteína microbiana para este tratamento.

Tabela 19 – Parâmetros metabólicos de vacas leiteiras consumindo dietas com diferentes fontes de milho

Item	Tratamento			EPM	P-valor	
	Controle	Benz	MiS		MiS × (C+B)	C × B
<i>Relações entre derivados de purinas:</i>						
Alantoína:Creatinina	2,86	3,86	2,84	0,29	0,12	0,01
Ácido úrico: Creatinina	0,52	0,58	0,47	0,07	0,29	0,54
Alantoína + Úrico: Creatinina	3,39	4,44	3,31	0,30	0,09	0,01
<i>Parâmetros sanguíneos:</i>						
Glicose, mg/dL	61,3	64,2	63,6	3,79	0,84	0,57
AGL, mg/dL	0,16	0,16	0,15	0,01	0,48	0,86

Benz – benzoato; MiS – milho seco; MiS×(C+B) = milho seco × silagens; C × B = controle × benzoato; Úrico – ácido úrico; AGL – ácidos graxos livres

No estudo de San Emeterio et al. (2000), a relação alantoína: creatinina foi aumentada para a silagem de grão úmido moído finamente, comparado ao grão úmido de moagem grosseira e aos secos. A excreção e absorção de purinas foi maior para as silagens de grãos úmidos no estudo de Krause; Combs e Beauchemin (2002), sem, contudo, resultar em modificações na proteína do leite, comparado ao grão seco. Conforme relatado anteriormente, no presente trabalho houve tendência de maior produção de proteína no leite de animais alimentados com silagens, sendo a maior contribuição numérica, advinda da silagem sem aditivo. Esse fato não corroborou a observação de melhores relações entre derivados de purinas para o tratamento com benzoato de sódio, uma vez que poderiam ser esperados desdobramentos positivos de uma possível eficiência na síntese de Pmic sobre a proteína do

leite. Entretanto, os achados chamam a atenção para a possibilidade do aditivo poder modificar a microbiota ruminal, resultando em melhoras na produção de proteína microbiana.

Foi demonstrado por Cruess e Richert (1929) que o potencial de ação do benzoato de sódio sobre fungos e bactérias é função da dose e do pH do meio. Por exemplo, em pH 3,0, a fermentação de *Sacharomyce cerevisiae* foi suprimida com a adição de 0,06% de benzoato de sódio. Em pH 4,0, mais de 0,1% de benzoato de sódio foi necessário para prevenir a fermentação, sendo que a dose 0,04% pareceu estimular a atividade da levedura. Isso demonstra a necessidade de pesquisas futuras sobre o comportamento do benzoato de sódio em relação à ampla faixa de pH que o rúmen pode apresentar conforme a dieta e o nível de inclusão de amido, bem como a necessidade de conhecimento das possíveis interações entre o aditivo e as espécies microbianas que colonizam o rúmen.

O possível aumento na digestão do amido em função da ensilagem não refletiu em alterações nos níveis plasmáticos de glicose nos animais. Também não houve indícios da mobilização de depósitos adiposos, visto que a circulação de ácidos graxos livres na corrente sanguínea não variou entre os tratamentos. As dietas formuladas com silagens de grãos reidratados forneceram mais energia líquida em sua composição (Tab. 20). Todavia, os animais utilizados no experimento se encontravam em estágio avançado de lactação e a oportunidade de conversão dessa energia para a produção de leite foi desviada para o acúmulo de peso. O consumo de energia líquida foi semelhante entre os tratamentos e de acordo com o balanço de energia observado, poderiam ser esperadas respostas produtivas diferentes, caso os animais estivessem em produção por menos tempo.

Tabela 20 – Medidas de peso dos animais, energia líquida de manutenção, teor e consumo de energia líquida e balanço de energia de vacas consumindo dietas com diferentes fontes de milho

Item	Tratamento			EPM	P-valor	
	Controle	Benz	MiS		MiS × (C+B)	C × B
Peso vivo, kg	716	710	715	16,3	0,54	0,12
Variação do PV, kg/dia	6,28	7,70	4,47	3,59	0,57	0,78
EL dieta, Mcal/kg	1,61	1,61	1,52	0,03	0,01	0,83
Cons. EL, Mcal/d	33,6	32,8	32,1	1,07	0,21	0,44
EL manutenção, Mcal/d	11,1	11,0	11,1	0,19	0,50	0,13
Balanço de energia, Mcal/d	2,56	2,22	1,56	1,22	0,43	0,77

Benz – benzoato; MiS – milho seco; Cons. EL – consumo de energia líquida; EL – energia líquida.

4.4 Conclusões

A reidratação e ensilagem de grãos de milho revelou-se uma estratégia eficiente para aumentar o valor nutritivo desse ingrediente, em relação a grãos secos moídos.

As semelhanças no consumo e desempenho produtivo de vacas leiteiras alimentadas com estes grãos ocorreram, provavelmente, pelo baixo teor de amido das dietas e pelo uso de vacas em estágio avançado de lactação.

A adição de benzoato de sódio em silagens de grãos de milho reidratados não modificou o desempenho de vacas leiteiras.

Referências

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

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International** 17th. ed. Gaithersburg, USA. 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International** 16th.ed. Washington, USA. 1997.

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

BERNARDES, T.F.; De OLIVEIRA, I.L.; LARA, M.A.S.; CASAGRANDE, D.R.; ÁVILA, C.L.S.; PEREIRA, O.G. Effects of potassium sorbate and sodium benzoate at two application rates on fermentation and aerobic stability of maize silage. **Grass and Forage Science**, Malden, v. 70, p. 491–498, 2015.

BRADFORD, B.J.; ALLEN, M.S. Milk fat responses to a change in diet fermentability vary by production level in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, p. 3800–3807, 2004.

CORREA, C.E.S.; SHAVER, R.D.; PEREIRA, M.N.; LAUER, J.G.; KOHN, K. Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. *Journal of Dairy Science*, Lancaster, v.85, p. 3008-3012, 2002.

CRUESS, W.V.; RICHERT, P.H. Effect of hydrogen ion concentration on the toxicity of sodium benzoate to microorganisms. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 17, p. 363, 1929.

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

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

FERNANDES, J. **Influência de genótipo, maturidade e tempo de armazenamento na qualidade de silagens de grãos de milho com alta umidade**. 2014. 97p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

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

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

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

JONSSON, A. Enumeration and confirmation of *Clostridium tyrobutyricum* in silages using neutral red, D-Cycloserine, and Lactate dehydrogenase activity. **Journal of Dairy Science**, Champaign, vol. 73, P. 719–725, 1990.

JOBIM, C.C.; NUSSIO, L.G.; REIS, R.A.; SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.36, p.101-119, 2007.

JUNGES, D.; MORAIS, G.; DANIEL, J.L.P. ; SPOTTO, M.H.F. ; NUSSIO, L.G. Contribution of proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 17, 2015, Piracicaba. **Proceedings...** Rio das Pedras, SP: Grafica Riopedrense, 2015. p.566-567.

KRAUSE, K.M.; COMBS, D.K.; BEAUCHEMIN, K.A. Effects of forage particle size and grain fermentability in midlactation cows. I. Milk production and diet digestibility. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.85, p.1936–1946, 2002.

KRISHNAMOORTHY, U; MUSCATO, T. V.; SNIFFEN, C. J.; VAN SOEST, P. J. Nitrogen fractions in selected feed stuffs. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 65, p. 217–225, 1982.

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

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

LITHERLAND, N.B. Adequacy of processing adjustment factors (PAF's) and intake discounts for dairy cows. Invited Presentation. In: OKLAHOMA CATTLE GRAIN PROCESSING SYMPOSIUM, 2006. Oklahoma, **Proceeding...** Oklahoma, 2006. p. 110-116.

MAEKAWA, M.; BEAUCHEMIN, K.A.; CHRISTENSEN, D.A. Chewing activity, saliva production and ruminal pH of primiparous and multiparous lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, p. 1176-1182, 2002.

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

MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Maryland, v. 85, p. 1217-1240, 2002.

MORAN, J.P.; WEINBERG, Z.G.; ASHBELL, G.; HEN, Y.; OWEN, T.R.. A comparison of two methods for the evaluation of the aerobic stability of whole crop wheat silage. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 11., 1996. Aberystwyth, UK, **Proceedings...** Aberystwyth, UK, 1996. p.162-163.

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

NELLIS, S.E., HOFFMAN, P.C., SHAVER, R.D. *Technical note*: A modified method to quantify prolamin proteins in dry and high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.96, p.4647-4652, 2013.

OBA, M.; ALLEN, M.S. Effects of corn grain conservation method on feeding behavior and productivity of lactating dairy cows at two dietary starch concentrations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, p.174-183, 2003.

OGDEN, R.K.; COBLENTZ, W.K.; COFFEY, K.P.; TURNER, J.E.; SCARBROUGH, D.A.; JENNINGS, J.A.; RICHARDSON, M.D. Ruminant in situ disappearance kinetics of dry matter and fiber in growing steers for common crabgrass forages sampled on seven dates in northern Arkansas. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, p. 1142-1152, 2005.

ORSKOV, E.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 92, n. 2, p. 499-503, 1979.

SAN EMETERIO, F.; REIS, R.B; CAMPOS, W.E.; SATTER; L.D. Effect of coarse or fine grinding on utilization of dry or ensiled corn by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, p. 2839–2848, 2000.

OWENS, F.N.; SODERLUND, S. Ruminant and postruminal starch digestion by cattle. In: CATTLE GRAIN PROCESSING SYMPOSIUM. 2006, Stillwater. **Proceeding...** 2006, Stillwater. Disponível em: http://beefextension.com/proceedings/cattle_grains06/06-17.pdf. Acesso: 11 maio. 2014.

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

TAYLOR, C.C.; KUNG JR, L. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation and aerobic stability of high moisture corn in laboratory silos. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, p. 1526-1532, 2002.

WEISSBACH, F. Correction of dry matter content of silages used as substrate for biogas production. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 15., 2009. Madison. **Proceedings...** Madison, 2009. p.483-484.

WOOLFORD M.K. Microbial screening of food preservatives, cold sterilants and specific antimicrobial agents as potential silage additives. *Journal of Science and Food Agriculture*, v. 26, p. 229–237, 1975.

ZANOTTO, D.L.; BELLAYER, C. **Método de determinação da granulometria de ingredientes para uso em rações de suínos e aves**. Concórdia : EMBRAPA Suínos e Aves, 1996. 5p.