

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

Estratégias de conservação do coproduto úmido da destilação do milho

Aline Venância Andrade

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

**Piracicaba
2024**

Aline Venância Andrade
Zootecnista

Estratégias de conservação do coproduto úmido da destilação do milho
versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2024

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

Andrade, Aline Venância

Estratégias de conservação do coproduto úmido da destilação do milho
/ Aline Venância Andrade. - - versão revisada de acordo com a Resolução
CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2024.

63 p.

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

1. Ácidos orgânicos 2. Benzoato de sódio 3. Conservação 4. Estabilidade
aeróbia 5. WDGS I. Título

*Aos meus pais Gonçalo e Dulcineia, ao meu irmão Alan
e ao meu noivo Lucas por todo amor e incentivo*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora Aparecida, por estarem sempre presentes em minha vida, me abençoando com saúde e sabedoria para prosseguir em minha caminhada.

Aos meus pais Gonçalo e Dulcinéia, por sempre me apoiarem em meus sonhos e por todo esforço realizado para que eu pudesse concretiza-los.

Ao meu irmão Alan, pelo apoio, carinho, ensinamentos e pela companhia durante minha estadia em Piracicaba.

Ao meu noivo Lucas, que esteve comigo em todos os momentos, me amparando e me aconselhando em cada dificuldade enfrentada.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade concedida e todo suporte técnico para realização desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida.

À toda equipe QCF, pela amizade, troca de experiências e por toda ajuda com o desenvolvimento dessa pesquisa. Agradeço especialmente a Larissa, Talita, Nathalia, Larissa Mandro, Bruno, Andréia e Álvaro por todos os momentos de risadas e descontração.

À equipe do ESALQLab, em especial a Joyce, João Pedro e César pelo apoio, paciência e toda ajuda com as análises.

Ao Professor Dr. Luiz Gustavo Nussio, pela orientação, paciência, confiança, apoio nos trabalhos desenvolvidos e por toda transmissão de conhecimentos.

Aos Drs. Greiciele e Rafael por todos os ensinamentos e amizade.

À FS Bioenergia pela confiança e parceria na realização desse experimento, e também ao apoio financeiro.

Enfim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a elaboração e conclusão desse projeto.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	11
LISTA DE TABELAS	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 Produção de etanol de milho	17
3.2 Processo de produção dos coprodutos	18
3.3 Armazenamento do WDGS	21
3.4 Estratégias para melhorar a estabilidade aeróbia do WDGS	22
3.4.1 Ensilagem	22
3.4.2 Benzoato de sódio	24
3.4.3 Ácidos orgânicos	25
3.4.4 Aditivos microbiológicos	25
3.4.5 Absorventes de umidade	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Caracterização do WDBS	29
4.1.1 Determinação da capacidade fermentativa	29
4.1.2 Análises químicas	29
4.2 Tratamentos e confecção das silagens experimentais	30
4.2.1 Estratégia 1: avaliação de aditivos no WDBS fresco	31
4.2.2 Estratégia 2: avaliação dos aditivos no WDBS conservado	33
4.2.2.1 Caracterização da fermentação: pH, microbiologia e produtos de fermentação formados	33
4.2.3 Análise estatística	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 Estratégia 1: estabilidade aeróbia do WDBS fresco, após aplicação dos aditivos	35
5.2 Estratégia 2	36

5.2.1 Composição química do WDBS após fermentação	36
5.2.2 Características da fermentação.....	41
5.2.3 Perdas de matéria seca	49
5.2.4 Estabilidade aeróbia após 40 dias de estocagem.....	52
6 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS.....	57

RESUMO

Estratégias de conservação do coproduto úmido da destilação do milho

O *wet distillers bran plus solubles* (WDBS) é um coproduto úmido da destilação de milho, que inclui fibras e solúveis condensados. No geral, esses coprodutos apresentam um processo de deterioração aeróbia acelerado, o que obriga o reabastecimento frequente nos consumidores finais. O objetivo desse estudo foi avaliar estratégias para aumentar a estabilidade aeróbia do WDBS e melhorar sua conservação, caracterizada pela composição química e perfil fermentativo. Para isso, foram testados os seguintes aditivos: Benzoato de Sódio nas doses 1,0 g kg⁻¹ da matéria natural (BS1,0), 1,5 g kg⁻¹ MN (BS1,5) e 2,0 g kg⁻¹ MN (BS2,0); *Blend* de ácidos orgânicos (65,66% ácido propiônico) nas doses 2,0 L t⁻¹ MN (BL2), 3,0 L t⁻¹ MN (BL3) e 4,0 L t⁻¹ MN (BL4); *Lentilactobacillus buchneri* (LB - 5×10⁵ ufc g⁻¹ MN); Combo de bactérias (*Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium animalis*, *Lacticaseibacillus casei*, *Saccharomyces cerevisiae* na concentração 10³ ufc mL⁻¹, cada) (Cepa - aplicado na dose de recomendação do fabricante - 750 mL t⁻¹ MN); e adições de 10% MN (M10) e 20% MN (M20) de milho laminado ao WDBS. Na estratégia 1, os aditivos foram aplicados ao WDBS e o material foi imediatamente submetido a um teste de estabilidade aeróbia. Na estratégia 2, os mesmos aditivos foram aplicados ao WDBS e o material foi armazenado por 40 dias em condições aeróbias (caixas plásticas de 20L, cobertas com filme plástico) ou sob anaerobiose (balde de 20L, selados com tampa). Após 40 dias, foram realizados o teste de estabilidade aeróbia e a avaliação química e fermentativa do material. Os dados foram analisados utilizando o procedimento “mixed” do SAS. No primeiro experimento, o efeito de tratamento foi testado. No segundo, o modelo estatístico incluiu os efeitos de tratamento, armazenamento e interação entre eles. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P<0,05). Na estratégia 1, o tratamento controle apresentou 126h de estabilidade aeróbia, a Cepa teve estabilidade intermediária, com 227h, e os demais tratamentos tiveram estabilidade máxima (240h). Quando o material foi armazenado por 40 dias (estratégia 2), o armazenamento em aerobiose proporcionou maior população de bactérias ácido-láticas que em anaerobiose. A contagem de leveduras foi inferior a 2 log ufc g⁻¹ MN para todos os tratamentos. Já a população de fungos filamentosos foi afetada pela interação aditivo×armazenamento. Quando armazenado em anaerobiose, não houve diferença entre os aditivos, no entanto, em aerobiose, os tratamentos BL3, BL4, Cepa e LB apresentaram as menores contagens de fungos. Alterações significativas em composição química, foram encontradas apenas nos tratamentos com inclusão de milho moído. Os valores de pH, ácido láctico e dos compostos voláteis foram afetados pela interação aditivo×armazenamento. No geral, os menores valores de pH foram obtidos sob anaerobiose. De forma inesperada, as maiores concentrações de ácido acético, propiônico e butírico foram registradas para o WDBS armazenado sob aerobiose, com destaque para os tratamentos com *blend* de ácidos orgânicos, que alcançaram teores significativamente superiores de ácido propiônico, devido à composição do aditivo. Não foram encontradas diferenças estatísticas para as perdas de MS, que apresentaram uma média de 3,04%, tendo sido considerada apenas a massa útil, livre de

deterioração para esta análise. Houve interação aditivo×armazenamento sobre a estabilidade aeróbia. Em geral, os aditivos químicos BS1,0; BS1,5; BS2,0 e BL4 foram mais eficientes na promoção da estabilidade aeróbia, garantindo o tempo máximo de 240h, independentemente do tipo de armazenamento. Conclui-se que, para uso imediato do WDBS fresco, todos os aditivos promoveram maior estabilidade aeróbia em comparação ao WDBS não tratado. Os tratamentos à base de benzoato de sódio ou *blend* de ácidos orgânicos destacaram-se como melhores estratégias para conservação e aumento da estabilidade aeróbia do WDBS, seja para uso imediato ou para armazenamento por até 40 dias.

Palavras-chave: Ácidos orgânicos, Benzoato de sódio, Conservação, Estabilidade aeróbia, WDGS

ABSTRACT

Conservation strategies for the wet co-product of corn distillation

The *wet distillers bran plus solubles* (WDBS) is a wet co-product of corn distillation, which includes fiber and condensed solubles. In general, these co-products have an accelerated aerobic deterioration process, which requires frequent replenishment for end consumers. The aim of this study was to evaluate strategies to increase the aerobic stability of the WDBS and improve its conservation, characterized by its chemical composition and fermentation profile. To achieve this, the following additives were tested: Sodium Benzoate at doses of 1.0 g kg⁻¹ of fresh matter (BS1,0), 1.5 g kg⁻¹ FM (BS1,5) and 2.0 g kg⁻¹ FM (BS2,0); Blend of organic acids (65.66% propionic acid) at doses of 2.0 L t⁻¹ FM (BL2), 3.0 L t⁻¹ FM (BL3) and 4.0 L t⁻¹ FM (BL4); *Lentilactobacillus buchneri* (LB - 5×10⁵ cfu g⁻¹ FM); Combo of bacteria (*Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium animalis*, *Lacticaseibacillus casei*, *Saccharomyces cerevisiae* at a concentration of 10³ cfu mL⁻¹) (Cepa - applied at the manufacturer's recommended dose - 750 mL t⁻¹ FM); and additions of 10% FM (M10) and 20% FM (M20) of rolled corn to the WDBS. In strategy 1, the additives were applied to the WDBS and the material was immediately subjected to an aerobic stability test. In strategy 2, the same additives were applied to the WDBS and the material was stored for 40 days under aerobiosis (20L plastic boxes, covered with plastic film) or under anaerobiosis (20L buckets, sealed with a lid). After 40 days, the aerobic stability test and the chemical and fermentation evaluation of the material were carried out. The data was analyzed using the SAS "mixed" procedure. In the first experiment, the treatment effect was tested. In the second, the statistical model included the effects of treatment, storage and the interaction between them. The averages of each treatment were compared using the Tukey test (P<0.05). In strategy 1, the control treatment had 126 hours of aerobic stability, Cepa had intermediate stability, with 227 hours, and the other treatments had maximum stability (240 hours). When the material was stored for 40 days (strategy 2), storage in aerobiosis resulted in a higher population of lactic acid bacteria than in anaerobiosis. The yeast count was less than 2 log cfu g⁻¹ FM for all treatments. The population of filamentous fungi was affected by the additive×storage interaction. When stored in anaerobiosis, there was no difference between the additives. However, BL3, BL4, Cepa and LB showed the lowest fungal counts in aerobiosis treatments. Significant changes in chemical composition were only found in the treatments with the inclusion of ground corn. The pH, lactic acid and volatile compound values were affected by the additive×storage interaction. In general, the lowest pH values were obtained under anaerobiosis. Unexpectedly, the highest concentrations of acetic, propionic and butyric acid were recorded for WDBS stored under aerobiosis. Treatments with a mixture of organic acids stood out, achieving significantly higher levels of propionic acid, due to the composition of the additive. No statistical differences were found for DM losses, which averaged 3.04%, with only the useful mass, free from deterioration, being considered for this analysis. There was an additive×storage interaction on aerobic stability. In general, the chemical additives BS1,0; BS1,5; BS2,0 and BL4 were more efficient in promoting aerobic stability, guaranteeing a maximum time of 240 hours, regardless the type of storage. It can be concluded that, for

immediate use of fresh WDBS, all the additives promoted greater aerobic stability compared to untreated WDBS. Treatments based on sodium benzoate or a blend of organic acids stood out as the best strategies for preserving and increasing the aerobic stability of WDBS, whether for immediate use or for storage for up to 40 days.

Keywords: Organic acids, Sodium benzoate, Conservation, Aerobic stability, WDGS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Processo de produção do etanol utilizando grão de milho e coprodutos formados. Adaptado de MacDonald (2018).	19
Figura 2 – Processo de fabricação do etanol de milho utilizando a técnica Fiber Separation Technology™ e coprodutos formados. Adaptado de Garland (2018).....	20
Figura 3 – Matéria seca do WDBS contendo aditivos e armazenado por 40 dias sob anaerobiose ou aerobiose.....	37
Figura 4 – Teor de proteína bruta do WDBS contendo aditivos e armazenado por 40 dias sob anaerobiose ou aerobiose.....	41
Figura 5 – pH do WDBS contendo aditivos e armazenado por 40 dias sob anaerobiose ou aerobiose.....	42
Figura 6 – Valores de ácido láctico do WDBS contendo aditivos e armazenado por 40 dias sob anaerobiose ou aerobiose.....	43
Figura 7 – População de fungos filamentosos do WDBS contendo aditivos e armazenado por 40 dias sob anaerobiose ou aerobiose.....	45
Figura 8 – Perdas de matéria seca do WDBS contendo aditivos e armazenado por 40 dias sob anaerobiose ou aerobiose.....	49
Figura 9 – Perdas de matéria seca após tratamento dos dados do WDBS contendo aditivos e armazenado por 40 dias sob anaerobiose ou aerobiose.	50
Figura 10 – Aspecto visual representativo do WDBS armazenado em anaerobiose (A) e aerobiose (B).....	51
Figura 11 – Peso da massa verde final em relação da massa verde inicial do WDBS contendo aditivos e armazenado por 40 dias sob anaerobiose ou aerobiose.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química do milho seco e dos grãos de destilaria úmidos (WDGS) e secos (DDGS) obtidos a partir da produção de etanol de milho	18
Tabela 2 - Composição químico-bromatológica da fibra úmida de destilaria com solúveis (WDBS)	30
Tabela 3 – Caracterização químico-bromatológica do WDBS após a aplicação dos aditivos	32
Tabela 4 – Estabilidade aeróbia do WDBS fresco, após aplicação dos aditivos	36
Tabela 5 – Composição química do WDBS contendo aditivos e armazenado por 40 dias sob anaerobiose ou aerobiose.	39
Tabela 6 – Compostos voláteis do WDBS contendo aditivos e armazenado por 40 dias sob anaerobiose ou aerobiose.	47
Tabela 7 - Estabilidade aeróbia do WDBS contendo aditivos e armazenado por 40 dias sob anaerobiose ou aerobiose.	54

1 INTRODUÇÃO

A produção de etanol a partir do milho no Brasil tem experimentado um crescimento significativo nas últimas décadas. Segundo dados da Conab (2023), estima-se uma produção de 5,64 bilhões de litros de etanol à base de milho para safra 2023-2024. Isso representa um aumento de 42% em comparação à safra precedente, que produziu 3,97 bilhões de litros em 2022-2023. Nos últimos seis anos, houve um aumento notável de 1.053% na produção de etanol de milho, e a expectativa é que essa tendência persista nos próximos anos, conforme indicado pela UNEM (2023). No entanto, é importante notar que o crescimento da produção de etanol derivado do milho também é acompanhado pelo aumento da produção de resíduos gerados por esse processo.

Na fabricação do etanol, o amido dos grãos de milho é removido, gerando um resíduo contendo fibras, proteínas, lipídeos e minerais (Veracini et al., 2013). Para cada litro de etanol, são produzidos 2 kg de resíduo (Calzada; Frattini, 2015) que é comercializado pelas indústrias como um coproduto com aplicação na alimentação animal. Os coprodutos mais frequentemente encontrados são os grãos secos de destilaria (*Dry Distillers Grains - DDG*), grãos úmidos de destilaria (*Wet Distillers Grains - WDG*), grãos secos de destilaria com solúveis (*Dry Distillers Grains plus Solubles - DDGS*), grãos úmidos de destilaria com solúveis (*Wet Distillers Grains plus Solubles - WDGS*) e os solúveis condensados ou xarope (*Condensed Distillers Solubles - CDS*) (Liu, 2011). Em virtude dos avanços tecnológicos e da implementação de métodos inovadores de extração nas usinas produtoras de etanol, é possível obter diferentes coprodutos com diversas composições químicas, resultantes da separação das frações de fibra, amido, proteína e óleo.

O “Fiber Separation TechnologyTM (ICM Inc., Colwich, KS)” é um método inovador atualmente empregado pelas indústrias produtoras de etanol de milho. Esse procedimento consiste em separar a parte fibrosa do grão de milho, previamente moído e cozido, antes da etapa de fermentação do amido. A fibra extraída nesse processo é combinada com os solúveis condensados, extraídos durante a centrifugação da vinhaça, que é obtida após a destilação (Palowski et al., 2021). Isso resulta na produção de um coproduto denominado Farelo ou Fibra úmida de destilaria com solúveis (*Wet Distillers Bran plus Solubles – WDBS*). Esse coproduto pode ser desidratado posteriormente, dando origem ao Farelo ou Fibra seca de destilaria com solúveis (*Dry Distillers Bran plus Solubles – DDBS*) (Junior et al., 2019).

Esses coprodutos apresentam potencial para serem empregados na alimentação de bovinos, aves, suínos e demais animais de produção, apresentando vantagens notáveis. Em comparação com as fontes de proteína convencionalmente utilizadas na alimentação animal, esses coprodutos são economicamente vantajosos e não competem com a alimentação humana (Costa et al., 2018). Entretanto, com a crescente produção de etanol e, conseqüentemente, o aumento dos resíduos gerados nesse processo, torna-se difícil que todo esse coproduto produzido seja utilizado rapidamente. Quando se trata dos coprodutos úmidos como WDGS e WDBS, sua matéria seca (MS) relativamente baixa (30-35%) dificulta seu armazenamento, podendo sofrer deterioração com 7 a 10 dias de estocagem, dependendo da temperatura ambiente (Adams et al., 2008).

O processo de secagem do WDGS, que resulta no DDGS, proporciona um produto mais estável e de maior durabilidade, viabilizando um armazenamento prolongado. No entanto, devido ao custo da secagem e ao crescimento da produção de etanol pelas usinas, faz-se necessário a rápida comercialização do coproduto úmido, geralmente direcionado para fazendas próximas às usinas. O WDGS é comumente utilizado em confinamentos de bovinos, sendo armazenado diretamente no solo, em pilhas cobertas por filme plástico. Dado o seu rápido processo de deterioração, é comum o WDGS ser reabastecido frequentemente e em pequenas quantidades nas fazendas do entorno das usinas de etanol (Alvarez et al., 2016; Di Lorenzo; Galyean, 2013).

A estocagem do coproduto úmido nas fazendas apresenta consideráveis desafios. Devido à alta umidade, torna-se difícil a contenção do material em silos (Adams et al., 2008). Quando armazenado em condições inadequadas, o WDGS está sujeito a uma rápida deterioração, decorrente da atividade microbiana, e à lixiviação, que, além de causar perda de nutrientes, pode resultar na contaminação do solo e das águas subterrâneas adjacentes, suscitando preocupações ambientais (Ramirez- Ramirez et al., 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo desse estudo foi avaliar estratégias para controlar a deterioração da fibra úmida de destilaria com solúveis (WDBS), por meio do uso de aditivos combinados a técnicas de vedação de maior ou menor eficiência.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da aplicação de aditivos microbianos, químicos e absorventes de umidade sobre a qualidade e aumento da vida útil do WDBS.

Avaliar o efeito de estratégias de vedação que propiciem um ambiente anaeróbio (alta eficiência) ou não (baixa eficiência) sobre a qualidade e controle da deterioração aeróbia do WDBS.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produção de etanol de milho

A fermentação de grãos de milho para a produção de etanol é a base da geração de biocombustíveis nos Estados Unidos. No Brasil, segundo maior produtor mundial de biocombustível, a cana-de-açúcar figura como a matéria prima principal para a produção de etanol, enquanto o grão de milho representa 13,7% dessa produção (CONAB, 2023). Contudo, essa indústria vem crescendo rapidamente, segundo informações da União Nacional do Etanol de Milho (UNEM, 2023) a safra 2023/24 deve alcançar a capacidade produtiva de 6 bilhões de litros, um aumento de 800% nos últimos 5 anos e estima-se para 2030 uma capacidade de produção de 10 bilhões de litros.

Esse aumento crescente de capacidade produtiva se dá pela ampliação de algumas indústrias, pela inauguração de novas unidades de produção e pela incorporação de tecnologias nas unidades já em operação. Outro aspecto relevante para produção de biocombustíveis no Brasil é a instalação de usinas flex, capazes de utilizar tanto a cana-de-açúcar quanto o grão de milho na fabricação de etanol. Essa abordagem se configura como uma alternativa viável para reduzir a inatividade dessas instalações durante a entressafra da cana-de-açúcar, já que esta deve ser processada dentro de 24h após a colheita e o grão de milho pode ser armazenado por mais tempo (Bortoletto; Alcarde, 2015). Adicionalmente, a produção de etanol utilizando o milho demonstra um maior rendimento, pois com uma tonelada de grão de milho são produzidos de 370 a 460 litros de etanol, enquanto uma tonelada de cana rende de 70 a 85 litros (Piracicaba Engenharia Sucroalcooleira, 2019)

A destilação do grão de milho para produção de etanol resulta em diferentes coprodutos ricos em proteína e energia, os quais possuem uma ampla utilidade na alimentação animal. Geralmente, os coprodutos resultantes são o DDG (grãos secos de destilaria) e o WDG (grãos úmidos de destilaria), ou esses mesmos coprodutos adicionados dos solúveis condensados, resultando nos DDGS (grãos secos de destilaria com solúveis) e WDGS (grãos úmidos de destilaria com solúveis) (Vasconcelos; Galyean, 2007). Esses coprodutos já possuem uma ampla utilização nas dietas de confinamento dos EUA, e no Brasil também é possível observar um crescente interesse pelo uso desses coprodutos em dietas de bovinos confinados.

Em 2021, chegou-se a pagar mais de R\$100,00 pela saca de milho, e os preços desse cereal atingiram patamares recordes no mercado brasileiro (CEPEA, 2022). Esse cenário

reforça a necessidade de aproveitar os resíduos locais, coprodutos e materiais diversos que tenham valor nutritivo e possam ser utilizados em substituição aos grãos convencionais. A composição nutricional dos grãos de destilaria do milho e do milho seco está apresentada na Tabela 1, evidenciando a qualidade desses ingredientes, que conjugam bons teores de fibras e teores de proteína bruta que excedem o triplo da média do milho grão. Destaca-se a possibilidade de esses coprodutos apresentarem teores consideráveis de extrato etéreo, dependendo do processamento na indústria. Contudo, segundo Ferreira et al. (2020), as plantas de bioenergia no Brasil têm produzido coprodutos com baixo teor de gordura (4%) comparado à média dos coprodutos americanos (7,9%), o que permite grandes inclusões de grãos destilados na dieta do gado de corte.

Tabela 1 – Composição química do milho seco e dos grãos de destilaria úmidos (WDGS) e secos (DDGS) obtidos a partir da produção de etanol de milho

Alimento	MS %	% MS			
		FDN	FDA	PB	EE
Milho moído	86,9	9,76	3,55	8,51	3,85
WDGS	33,2	31,7	16,1	31,5	9,31
DDGS	89,1	32,1	14,6	30,2	12,5

Fonte: NASEM (2021)

3.2 Processo de produção dos coprodutos

O processo tradicional de fabricação de etanol utilizando o grão de milho está representado na Figura 1. Segundo o manual técnico da OSHA (2015), a fase inicial do processo de obtenção de etanol envolve a moagem do grão de milho seco, seguida pelo cozimento do grão moído. Nessa etapa, água e a enzima α -amilase são adicionadas ao material, resultando na formação de uma substância pastosa. Essa mistura permanece por algumas horas a 80-85 °C até a transformação em uma massa denominada mosto. Nesse processo o material permanece a um pH entre 6,0 e 6,5, que é o ideal para atuação da α -amilase. Após o cozimento, o mosto é movido para o tanque de sacarificação. Nessa etapa, são adicionados a enzima glucoamilase, responsável pela hidrólise da dextrina em glicose, e o ácido sulfúrico para acidificar o meio, pois, para a ação ótima da glucoamilase, é essencial manter um pH situado entre 4,0 e 5,5. O produto proveniente é submetido a um processo de

fermentação, com duração de 40 a 60 horas, conduzido pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, visando a conversão dos açúcares em etanol. Em seguida, ocorre o processo de destilação, no qual a mistura é conduzida através de um mecanismo de destilação contínua, composto por várias colunas. Esse sistema baseia-se nas disparidades de pontos de ebulição dos líquidos para realizar a separação em água, etanol e vinhaça (Burhoop et al., 2018; Carlson et al., 2016).

Após a fermentação, o produto resultante é denominado vinhaça pesada, composto de 35% de MS, o qual passa por um processo de centrifugação visando a separação dos sólidos dos líquidos. Durante o procedimento de centrifugação, as cinzas podem ser solubilizadas, assim como uma parte significativa do óleo é emulsionada, formando a fração líquida denominada vinhaça fina. A fração líquida é evaporada para produzir os solúveis condensados, ou xarope (CDS), com 20% a 35% MS. A maior parte da proteína se concentra na fração sólida (Liu, 2011), a qual constitui o WDG. Quando acrescido dos CDS, forma o WDGS, que contém normalmente entre 65% e 70% de umidade. O WDG pode passar por um processo adicional de secagem, gerando o DDG, com 10% a 12% de umidade, que também pode ser acrescido dos CDS, formando o DDGS (Hart et al., 2019; Kim et al., 2008). A constituição nutricional do DDGS e WDGS pode variar conforme o método de extração do etanol realizado na usina e na quantidade e composição de solúveis condensados incorporados ao DDG e WDG. Como consequência do uso do amido, os coprodutos resultantes apresentam níveis de fibra, proteína, óleo e cinzas aproximadamente três vezes superiores em comparação ao milho (Liu, 2011).

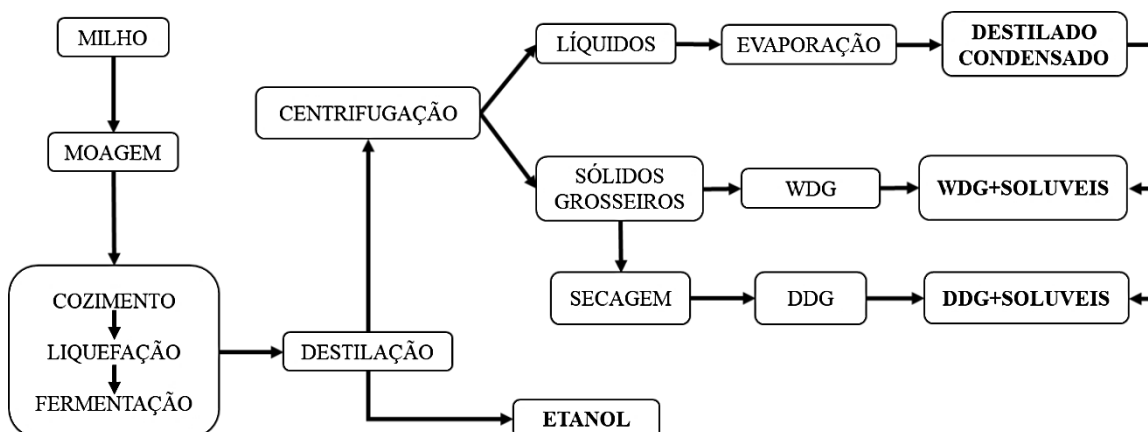


Figura 1 – Processo de produção do etanol utilizando grão de milho e coprodutos formados. Adaptado de MacDonald (2018).

Com a objetivo de otimizar a eficiência e incrementar os resultados na produção de etanol, as indústrias estão explorando inovações que possam diminuir os gastos e criar novos subprodutos voltados para a alimentação animal (Singh et al., 2001; Winkler-Moser; Breyer, 2011). Uma dessas técnicas envolve a subdivisão do grão de milho antes do processo de fermentação, realizado por meio do processo conhecido como Fiber Separation Technology™ (FST™) desenvolvido pela ICM, Inc., em Colwich, KS, representado na Figura 2. Essa técnica consiste na separação da porção fibrosa do grão, conhecida como pericarpo, dos demais componentes. Esse procedimento aumenta a eficiência da fermentação devido à maior proporção de amido no substrato que pode ser fermentado, além de reduzir o desgaste dos equipamentos na usina e demandar menos energia para destilação e secagem. A fibra removida do grão tem a possibilidade de ser combinada com os solúveis condensados, originando um produto denominado Fibra mais solúveis (*Bran plus Solubles*) (Garland et al., 2019), que pode ser comercializado tanto na forma úmida (WDBS) quanto na forma seca (DDBS).

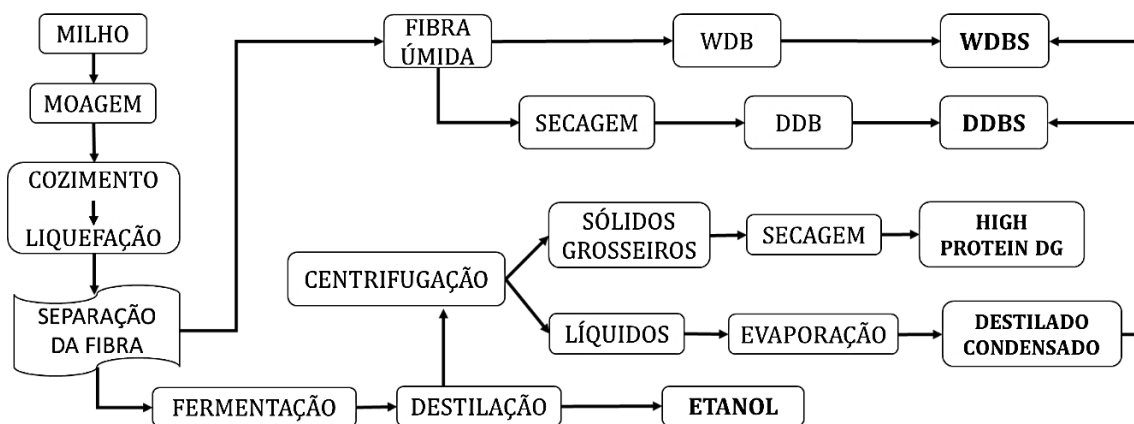


Figura 2 – Processo de fabricação do etanol de milho utilizando a técnica Fiber Separation Technology™ e coprodutos formados. Adaptado de Garland (2018).

Os WDGS são altamente palatáveis, auxiliam na homogeneidade das partículas de ração ao serem combinados com componentes secos (Garcia; Kalscheur, 2006) e sua alta umidade reduz a seletividade dos animais em relação à ração. Contudo, essa elevada umidade limita sua capacidade de armazenamento, restringindo sua utilização. Para contornar essa questão e garantir uma maior estabilidade e tempo de armazenamento, bem como facilitar o transporte do coproduto para regiões mais distantes, as usinas podem realizar a secagem dos coprodutos de destilaria úmidos (WDGS e WDBS) convertendo-os nos respectivos

coprodutos secos (DDGS e DDBS). Contudo, o processo de secagem demanda uma quantidade significativa de energia, o que acarreta em um aumento no custo do produto final. Além disso, pode haver limitação de espaço para armazenamento, o que inviabiliza que todo coproduto úmido produzido seja seco e estocado nas usinas.

3.3 Armazenamento do WDGS

Tradicionalmente o WDGS é armazenado nas fazendas em condições ambientais, em pilhas no solo ou em piso de concreto e cobertas por filme plástico (Alvarez et al., 2016). O teor de MS no WDGS varia entre 30% e 40%. Quando a concentração de MS no produto se situa entre 40% e 55%, ele é referido como grãos úmidos de destilaria 'modificados' (Gunn et al, 2013; Lundy; Loy, 2014). Segundo Garcia e Kalscheur (2007), a qualidade nutritiva desse alimento é influenciada pelas diferenças no teor de MS e pelos processos de produção, manuseio e armazenamento. A qualidade do WDGS entregue na fazenda pode ser prejudicada pelas condições de armazenamento temporário na usina de etanol. Para manter a qualidade, as plataformas de armazenamento temporário devem ser mantidas limpas e protegidas contra intempéries. Também é crucial manter uma área livre de roedores, pássaros e animais de estimação, pois eles podem consumir o alimento e contaminá-lo com excrementos. Todo material remanescente dos lotes anteriores com crescimento de fungos deve ser removido, pois os fungos podem atuar como inoculantes (Garcia; Kalscheur, 2007).

Devido à alta umidade, o coproduto úmido deve ser utilizado rapidamente, pois a partir de 5 a 14 dias, dependendo da temperatura ambiente, já pode-se observar a deterioração do material (Garcia; Kalscheur 2007, Lehman; Rosentrater, 2013). Devido esse curto prazo de validade, é necessário um reabastecimento em intervalos de 3 a 15 dias das usinas de etanol para as fazendas de produção animal, porém a logística envolvida torna-se muito complexa e cara, o que impossibilita o uso extensivo de WDGS, especialmente em locais distantes da planta de produção. Além disso, muitas fazendas estão localizadas vários quilômetros no interior em estradas de terra, que após fortes chuvas não são acessíveis para entregar cargas de WDGS frescas. Assim, os produtores são forçados a mudar as dietas, afetando o desempenho animal e a produtividade da fazenda (Alvarez et al., 2019)

Duas estratégias potencialmente eficazes para preservar o WDGS por mais tempo, evitando sua deterioração e desperdício, são a ensilagem e a aplicação de aditivos. A ensilagem proporciona um ambiente anaeróbio favorável que inibe o crescimento microbiano

e mantém a qualidade do material (Alvarez et al. 2019). Por sua vez, a aplicação de aditivos pode potencializar a conservação do material, oferecendo proteção adicional contra deterioração e aumentando sua estabilidade durante o armazenamento. Os aditivos podem ser utilizados com diferentes propósitos, tais como estimulantes de fermentação, inibidores de fermentação, inibidores de deterioração aeróbia, nutrientes e absorventes (McDonald et al., 1991). Os aditivos podem desempenhar uma função inibitória, atuando de forma seletiva sobre microrganismos específicos, o que resulta na inibição de reações desfavoráveis, tais como as fermentações etílica e butírica, geralmente ocasionadas por leveduras e por bactérias do gênero *Clostridium*, respectivamente (Kung Jr., 2010). Os aditivos absorventes de umidade, por sua vez, são adicionados à massa para elevar o teor de matéria seca do material e propiciar melhores condições para uma fermentação de qualidade (Ramirez-Ramirez et al., 2011).

Conforme destacado por McDonald et al. (1991), para garantir uma fermentação adequada na produção de silagem, recomenda-se um teor de carboidratos solúveis (CS) de pelo menos 6% a 8% na MS no material ensilado e que este mantenha um nível de umidade na faixa de 65% a 72%. Isso ocorre porque uma escassez de carboidratos solúveis e concentrações de umidade acima de 75% e podem impactar adversamente o desenvolvimento do processo de fermentação da silagem. Em concordância, uma métrica importante para definir o potencial de ensilagem de um material é a sua capacidade fermentativa (CF). Tal atributo leva em consideração o teor de matéria seca (fração do alimento que não é água), o teor de carboidratos solúveis (que serve como substrato para o desenvolvimento de microrganismos) e a capacidade tamponante (ou seja, a capacidade de manter o pH da massa estável). A fórmula apresentada por Weissbach e Honig (1996) para calcular a capacidade fermentativa é a seguinte: $CF = MS + 8 * (CS/CT)$, em que CF representa a capacidade fermentativa, MS a matéria seca, CS os carboidratos solúveis e CT a capacidade tamponante. Esses elementos desempenham um papel crucial na obtenção de uma silagem de excelência através de um procedimento de ensilagem eficiente.

3.4 Estratégias para melhorar a estabilidade aeróbia do WDGS

3.4.1 Ensilagem

A ensilagem é um método de conservação de alimentos, comumente aplicado a forragens como milho, capim ou sorgo, bem como a grãos úmidos, por meio do processo de

fermentação anaeróbia. Durante a ensilagem, o material é armazenado em silos herméticos, onde é compactado para expulsar o ar e, em seguida, coberto por filme plástico para criar um ambiente anaeróbio propício à fermentação láctica. Esse processo é conduzido por bactérias ácido-láticas, que convertem os açúcares presentes no material em ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico, reduzindo o pH do meio e inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis. Essa técnica permite a preservação do valor nutricional, a redução de perdas de matéria seca e a disponibilidade de alimento de qualidade ao longo do ano (Jobim; Nussio, 2013; Pahlow et al., 2003).

Armazenar do WDGS em exposição ao ar e ao ambiente pode facilitar a contaminação por microrganismos externos, a deterioração aeróbia e a lixiviação de efluentes. Especialmente se a remessa do coproduto demorar mais de uma semana para ser utilizada na fazenda, a ensilagem torna-se necessária para evitar a infiltração de ar, uma vez que o mofo pode desenvolver na superfície exposta, resultando em perdas de material. Segundo Gunn et al. (2013) o WDGS em si não demonstra uma alta capacidade de fermentação devido ao baixo pH (inferior a 4,5), que retarda o crescimento de bactérias fermentativas. Além disso, há quantidades limitadas de açúcares fermentescíveis e uma baixa população de bactérias ácido-láticas epifíticas do material (36 UFC g⁻¹ MS) (Lehman; Rosentrater, 2007; Lundy; Loy, 2014). No entanto, a ensilagem do coproduto úmido pode contribuir significativamente para preservar as características desse alimento.

Os estudos de Anderson et al. (2009), que analisaram a evolução de parâmetros como pH, ácido láctico, etanol e amônia, destacaram que a acidez intrínseca do WDGS desempenha um papel fundamental na preservação de sua qualidade durante o período de armazenamento de 21 dias em silos de escala laboratorial. De maneira semelhante, as pesquisas conduzidas por Alvarez et al. (2016) e Alvarez et al. (2019) declararam que o armazenamento do WDGS em silos bags resultou em estabilidade do material por 20 e 60 dias, respectivamente, além de uma atividade microbiológica reduzida em comparação com o armazenamento exposto ao ambiente. Essas conclusões reforçam a importância de considerar as características intrínsecas do WDGS e as condições de armazenamento ao avaliar a preservação e a qualidade desse coproduto.

3.4.2 Benzoato de sódio

O benzoato de sódio é um composto químico amplamente empregado na indústria alimentícia e farmacêutica devido às suas excelentes propriedades conservantes e antimicrobianas. Na produção de silagens, ele também desempenha um papel crucial como inibidor da deterioração aeróbia. Quando adicionado às forragens ensiladas, o benzoato de sódio auxilia no controle do desenvolvimento de microrganismos indesejados, como leveduras e fungos filamentosos, os quais podem causar a deterioração da silagem e perda de nutrientes, além de estar relacionado a reduções de proteólise durante a fermentação (Da Silva et al., 2014). Ao inibir a atividade desses microrganismos, esse aditivo contribui para a preservação da qualidade da silagem, permitindo que ela mantenha seus nutrientes e valor alimentar por mais tempo.

O benzoato de sódio exerce sua ação como conservante e antimicrobiano principalmente por meio do ácido benzoico, que é a forma ativa desse composto, obtida após sua dissociação em ambientes ácidos. O ácido benzoico atravessa a membrana celular dos microrganismos, uma vez dentro da célula, o íon benzoato interfere em processos metabólicos vitais, como a geração de ATP (Bosund, 1963), que é a fonte principal de energia para a célula, e pode afetar outros processos metabólicos, como o transporte de prótons e a síntese de proteínas (Freese; Sheu; Galliers, 1973). Essa inibição do metabolismo compromete o crescimento e a reprodução de fungos filamentosos e leveduras, levando à sua morte e à consequente preservação do alimento.

Cruess e Richert (1929) investigaram os efeitos do benzoato de sódio em fungos e bactérias, analisando sua resposta em relação à dose aplicada e ao pH do meio. Altas doses de benzoato de sódio foram requeridas quando os valores de pH ultrapassaram 5,5 para bactérias lácticas e certas espécies de *Bacillus*, e 4,5 para leveduras e fungos. Este estudo destaca a influência significativa desses dois fatores no potencial de ação do benzoato de sódio. Pode-se compreender o padrão de resposta influenciado pelo pH devido ao fato de que o pKa do ácido benzóico é 4,19. Assim, em pHs mais baixos, a forma não dissociada predomina (Baird-Parker, 1980), exercendo controle sobre os microrganismos.

Avaliando o efeito do aditivo benzoato de sódio no processo ensilagem de grãos de sorgo reidratados, Santos et al. (2019) constataram que a utilização de 0,2% de benzoato em comparação ao controle, apresentou uma redução na concentração de leveduras, bem como em menores concentrações de etanol, ésteres etílicos e proteína solúvel, evidenciando que o

benzoato de sódio também tem o potencial de reduzir a proteólise no silo. Além disso, a silagem de sorgo tratada exibiu um acréscimo significativo de 94,4 horas na estabilidade aeróbia.

3.4.3 Ácidos orgânicos

Ácidos orgânicos podem ser utilizados para inibir a fermentação no processo de ensilagem ou para impedir a deterioração aeróbia do silo. Ácidos fracos como o ácido acético, propiônico e fórmico quando adicionados à silagem, reduzem o pH do ambiente. Esse ambiente ácido inibe o crescimento e a multiplicação de microrganismos patogênicos sensíveis ao baixo pH, como fungos filamentosos e bactérias indesejáveis, melhorando assim a estabilidade aeróbia da silagem (Weiss; Auerbach, 2012). Alguns ácidos, como o ácido acético, propiônico, sórbico e benzóico possuem uma ação antifúngica, atuando como agentes desacopladores nas células fúngicas, sendo uma boa estratégia para aumentar a estabilidade aeróbia na abertura do silo (Mills; Kung Jr. 2002). A forma não dissociada dos ácidos é inibitória para os microrganismos, pois esta atravessa facilmente as membranas celulares e libera H^+ , acidificando o citoplasma das células e diminuindo o gradiente de prótons levando à morte dos mesmos.

Nofsinger et al. (1983) conduziram uma pesquisa na qual foi adicionado ácido sórbico, sorbato de potássio, ácido propiônico e amônia ao WDGS, nas doses 0,25%, 0,5% e 1,0% na matéria natural. Eles observaram uma redução na perda de matéria seca quando utilizado ácido sórbico, sorbato de potássio e amônia. No entanto, nenhuma melhora foi observada na silagem com o uso do ácido propiônico. Por outro lado, Abrams et al. (1983) realizaram pesquisas com os aditivos químicos hidróxido de cálcio e hidróxido de amônio ao WDGS. Eles constataram que as adições de álcalis, independentemente da fonte, resultaram em uma fermentação butírica com menor produção de acetato e propionato. A fermentação não ocorreu na ausência de álcali, e a ensilagem tendeu a aumentar o N solúvel e diminuir o lactato presente no WDGS.

3.4.4 Aditivos microbiológicos

O *Lentilactobacillus buchneri* é uma bactéria amplamente estudada e aplicada no processo de ensilagem visando a conservação do alimento. Durante o processo de ensilagem, essa bactéria realiza a fermentação heterolática, em que não apenas converte os açúcares

presentes na forragem em ácido láctico, como também metabólitos adicionais, como ácido acético e etanol. Além disso, a *L. buchneri* demonstra a habilidade de transformar uma parcela do ácido láctico em ácido acético durante a fase em que há grande concentração de ácido láctico e baixo teor de açúcares na silagem, contribuindo para uma maior estabilidade aeróbia na abertura do silo. Esse fenômeno é explicado pela propriedade do ácido acético, conforme destacado por Kleinschmit e Kung Jr. (2006), de exercer um efeito inibitório no crescimento de fungos e leveduras, atuando como um antifúngico e controlando a deterioração da silagem. Os referidos pesquisadores também observaram que a inoculação de *L. buchneri* em concentrações superiores a 100.000 ufc g⁻¹ na matéria natural pode proporcionar uma estabilidade aeróbia superior (500 h) em silagens de milho comparando-se com silagem não tratada (25 h).

Segundo Pahlow et al. (2003) o *Bacillus subtilis* pode ser promissor no aumento da estabilidade aeróbia durante o processo de ensilagem, devido à sua habilidade em sintetizar bacteriocinas com propriedades inibitórias sobre leveduras e fungos filamentosos. Uma pesquisa conduzida por Lara et al. (2015), avaliou três tratamentos aplicados à silagem de milho: um controle não tratado, outro tratado com *B. subtilis* e um terceiro tratado com a combinação de *B. subtilis* e *L. plantarum*. Após um período de ensilagem de 96 dias, a população de leveduras foi inferior no grupo tratado com *B. subtilis*, enquanto as contagens nos dois outros tratamentos mantiveram-se comparáveis. Adicionalmente, constatou-se que a estabilidade aeróbia foi prolongada em três e duas vezes, respectivamente, nos grupos tratados com *B. subtilis* e com a combinação, quando contrastadas com a silagem não tratada.

O desenvolvimento de aditivos que combinem diferentes tipos de microrganismos tem como objetivo alcançar os benefícios de diferentes inoculantes em um único produto. A sinergia de diferentes cepas de BAL, leveduras e microrganismos específicos pode desempenhar um papel central na otimização do processo fermentativo, resultando em rápida acidificação do meio, estabilização do pH e prevenção de microrganismos indesejáveis, como bolores e leveduras (Reich; Kung Jr, 2010). Além de que, a combinação de microrganismos permite escolher cepas que sejam mais adaptadas às condições específicas da silagem, como o tipo de forragem, o clima e o ambiente de armazenamento (Pahlow et al. 2003)

Na pesquisa conduzida por Kang et al. (2009), constatou-se que a mistura de *L. casei* e *L. buchneri* resultou em uma resistência à deterioração aeróbia na silagem de uma das variedades de milho. Porém, em outra variedade, a utilização do inoculante diminuiu o tempo

de estabilidade aeróbia em relação à silagem não tratada. No segundo caso, as características de fermentação foram semelhantes entre a silagem inoculada e a não tratada, indicando a possibilidade de que o inoculante tenha sido superado pela população natural de bactérias lácticas associadas à forragem de milho.

3.4.5 Absorventes de umidade

O uso de aditivos absorventes aumenta a concentração de MS do WDGS, tornando-o menos suscetível à deterioração microbiana e à lixiviação de nutrientes (Adams et al., 2008). Além disso, reduz a atividade de água (A_w) do material, criando um ambiente desfavorável ao desenvolvimento de microrganismos nocivos, o que contribui para a estabilidade do alimento (Garcia; Kalscheur, 2006). Adicionalmente, a utilização de alimentos estratégicos pode aumentar o valor nutritivo da silagem, resultando em benefícios para produção animal (Anderson et al., 2009).

O WDGS tem o pH, geralmente, entre 3,5 e 4,5, ao ser misturado com outros alimentos esse pH aumenta, para depois cair proporcionalmente, dependendo do efeito tampão e/ou pH original do outro alimento, conforme indicado por Anderson et al. (2015), Kalscheur et al. (2002), Mjoun, Kalscheur e Garcia (2011), Ramirez-Ramirez et al. (2011). Se armazenado adequadamente e em anaerobiose esta acidez é suficiente para manter a conservação do material. Adicionalmente, as melhores opções para combinação são ingredientes que possuam nutrientes que se complementam ao conteúdo do WDGS. Como alimentos com baixa proporção de proteína, gordura e fósforo, visto que o WDGS apresenta uma alta concentração desses nutrientes (Garcia; Kalscheur, 2007).

Experimentos conduzidos por Nishino, Harada e Sakaguchi (2003); Nishino e Hattori (2007) e Wang e Nishino (2008) demonstraram que a combinação de grãos úmidos de cervejaria (subproduto muito semelhante ao WDGS) com vários alimentos de baixo teor de umidade melhorou a estabilidade aeróbia e as características químicas da silagem quando comparado com a silagem de grãos úmidos de cervejaria ensilados sozinhos. Similarmente, a ensilagem de WDGS com outros alimentos como milho, feno de capim, feno de alfafa, palha de trigo, DDG e casca de soja resulta em misturas de alta qualidade, com maior tempo de estocagem e menor deterioração (Adams et al., 2008; Anderson et al., 2009; Anderson et al., 2015; Kalscheur et al., 2002; Ramirez-Ramirez et al., 2011). Também foi relatado por Mjoun,

Kalscheur e Garcia (2011) que o armazenamento de WDGS misturado com planta inteira de milho pode melhorar a fermentação, o perfil de nutrientes e a estabilidade aeróbia da silagem.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A fibra úmida de destilaria com solúveis (WDBS) foi obtida de uma usina de bioenergia situada em Lucas do Rio Verde, MT. O material foi transportado até Piracicaba, SP, onde o experimento foi conduzido no Laboratório de Qualidade e Conservação de Forragens do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP). O transporte da carga foi realizado em bombonas plásticas de 200 L vedadas, com duração de 2 dias. Previamente à imposição dos tratamentos, mensurou-se a temperatura da massa ($29,6 \pm 0,14$ °C) e o valor de pH ($3,86 \pm 0,0$), para constatação do grau de atividade microbiano-enzimática no WDBS recebido.

4.1 Caracterização do WDBS

Foram coletadas amostras em triplicata do WDBS para formação de uma amostra composta que foi fracionada em subamostras, parte congelada e parte destinada à secagem, para utilização nas análises descritas a seguir:

4.1.1 Determinação da capacidade fermentativa

Para calcular a capacidade fermentativa, uma subamostra foi submetida à secagem a 55°C em estufa de circulação forçada, ao longo de 72 horas, visando a determinação do teor de MS. Posteriormente, a amostra foi moída utilizando um moinho de facas tipo Willey, equipado com uma peneira de 1,0 mm. A análise do teor de carboidratos solúveis (CS) foi realizada a partir da amostra seca e moída, seguindo a metodologia delineada por Hall (2000). Outra porção do WDBS, devidamente congelada, foi utilizada posteriormente em seu estado *in natura*, para preparo de um extrato aquoso, que foi destinado à análise da capacidade tamponante (CT), segundo Playne e McDonald (1966). De posse dos valores dessas três variáveis, foi calculada a capacidade fermentativa (CF) (apresentada na tabela 2), conforme equação de Weissbach e Honig (1996). Onde, $CF = MS + 8 * (CS/CT)$.

4.1.2 Análises químicas

O WDBS foi caracterizado quanto a concentração de MS, obtida por meio da secagem a 105°C em estufa por 12 horas (AOAC, 2000). A quantificação das cinzas (MM) ocorreu consecutivamente à determinação da MS a 105°C, e foi realizada pela combustão das subamostras a 600°C por 4 horas, (AOAC, 1997). A obtenção da fibra em detergente neutro

(FDN) se deu por meio da lavagem das amostras em detergente neutro, ao qual foi acrescentado amilase termoestável e sulfito de sódio (Mertens, 2002). A fibra em detergente ácido (FDA) foi determinada por lavagem em detergente ácido, procedimento realizado de forma sequencial à análise de FDN. A determinação do extrato etéreo (EE) foi conduzida pelo método de extração Soxhlet (AOAC, 1997). A quantificação de nitrogênio nas amostras foi realizada através da combustão no equipamento Leco 2000 (Leco Instruments Inc. (AOAC, 1990) e a concentração de proteína bruta (PB) foi calculada multiplicando-se o nitrogênio total pelo fator 6,25. O teor de carboidratos solúveis foi determinado por colorimetria, conforme Hall (2000). Estes atributos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição químico-bromatológica da fibra úmida de destilaria com solúveis (WDBS)

Variável	Média e Desvio Padrão
MS, %MN	35,1 ± 0,30
MM, %MS	6,78 ± 0,01
FDN, %MS	37,1 ± 0,18
FDA, %MS	12,1 ± 0,63
PB, %MS	23,5 ± 0,05
EE, %MS	5,98 ± 0,05
CNF, %MS	26,7 ± 0,16
CS, %MS	2,77 ± 0,95
CF	35,4 ± 0,11

MS – matéria seca; MN – matéria natural; MM – matéria mineral; FDN – fibra em detergente neutro; FDA – fibra em detergente ácido; PB – proteína bruta; EE – extrato etéreo; CNF – carboidratos não fibrosos; CS – carboidratos solúveis; CF – capacidade fermentativa.

4.2 Tratamentos e confecção das silagens experimentais

Além do WDBS não tratado (Controle), foram utilizados os aditivos químicos, Benzoato de sódio e um *blend* de químicos composto por ácido propiônico (65,66%), ácido acético, hidróxido de amônio, polisorbato, água e hidróxido de tolueno butilado, com densidade de 1,059 g mL⁻¹ e pH 5,15, da empresa Kemin South America®. Os aditivos biológicos, *Lentilactobacillus buchneri* da empresa Lallemand Animal Nutrition® e um combo de bactérias comercial denominado Cepa TPC composto por *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium animalis*, *Lacticaseibacillus casei* e *Saccharomyces cerevisiae* na concentração de 10³ ufc mL⁻¹, da empresa Global Saúde Biotecnologia®. Por fim, o WDBS

foi misturado com milho seco laminado, nas proporções 90:10 e 80:20, base na matéria natural, a fim de modificar a estrutura física do material. O conjunto de tratamentos avaliados e as respectivas nomenclaturas foram:

- Cont: sem uso de aditivo
- BS1,0: Benzoato de sódio na dose de 1,0 g/kg MN
- BS1,5: Benzoato de sódio na dose de 1,5 g/kg MN
- BS2,0: Benzoato de sódio na dose de 2,0 g/kg MN
- BL2: *Blend* de químicos na dose de 2,0 L/t MN
- BL3: *Blend* de químicos na dose de 3,0 L/t MN
- BL4: *Blend* de químicos na dose de 4,0 L/t MN
- LB: *Lentilactobacillus buchneri*, na dose 5×10^5 ufc/g MN
- Cepa: Cepa TPC, na dose de 750 mL/t MN
- M10: 90% WDBS: 10% Milho seco, MN
- M20: 80% WDBS: 20% Milho seco, MN

Os aditivos foram aplicados utilizando pulverizadores e a homogeneização foi realizada de forma manual. Ao tratamento controle, que não recebeu nenhum aditivo, foi adicionado água na mesma proporção que os tratamentos receberam aditivos. A caracterização do WDBS após a aplicação dos tratamentos está apresentada na Tabela 3.

4.2.1 Estratégia 1: avaliação de aditivos no WDBS fresco

O teste de estabilidade aeróbia foi conduzido usando amostras de 3 kg, as quais foram dispostas sem compactação em baldes plásticos. Cada balde foi equipado com um sensor de temperatura posicionado no centro da massa e programado para coletar dados em intervalos de 30 minutos. Além disso, sensores adicionais foram distribuídos pelo ambiente para captar a temperatura da sala, formando assim o padrão de comparação, que é a temperatura ambiente. A sala permaneceu em temperatura controlada de 21°C. Entendeu-se como rompimento da estabilidade aeróbia o instante em que a temperatura ambiente foi superada pela temperatura da massa em 2°C (Moran et al., 1996). As amostras foram avaliadas por um período de 240 horas. Adicionalmente, foram determinadas a temperatura máxima alcançada pelas amostras e o tempo demandado para a temperatura máxima ser alcançada.

Tabela 3 – Caracterização químico-bromatológica do WDBS após a aplicação dos aditivos

Tratamento	Variável								
	% MN			%MS					
	MS	MM	FDN	FDA	PB	EE	CNF	CS	CF
Cont	35,8 ± 0,13	6,89 ± 0,13	35,4 ± 0,59	12,0 ± 0,40	23,8 ± 1,37	5,84 ± 0,05	28,1 ± 0,76	2,98 ± 0,37	36,2 ± 0,01
LB	35,6 ± 0,12	7,11 ± 0,37	35,6 ± 0,45	12,7 ± 1,21	22,9 ± 0,17	5,76 ± 0,16	28,6 ± 0,41	3,80 ± 0,30	31,9 ± 0,00
Cepa	34,8 ± 0,09	6,79 ± 0,10	33,5 ± 0,42	11,0 ± 0,58	23,3 ± 0,27	6,27 ± 0,01	30,1 ± 0,77	3,59 ± 0,58	35,3 ± 0,06
BS1,0	36,2 ± 0,03	7,00 ± 0,07	38,0 ± 0,36	11,5 ± 1,61	23,5 ± 0,21	5,79 ± 0,10	25,7 ± 0,03	3,04 ± 0,24	36,5 ± 0,02
BS1,5	35,9 ± 0,03	7,24 ± 0,17	35,0 ± 0,04	11,3 ± 0,35	23,2 ± 0,03	6,72 ± 0,04	27,8 ± 0,22	4,11 ± 0,45	36,4 ± 0,01
BS2,0	36,3 ± 0,15	6,66 ± 0,20	35,5 ± 0,17	11,1 ± 0,05	23,0 ± 0,03	5,86 ± 0,07	29,0 ± 0,06	3,24 ± 0,24	41,8 ± 0,02
BL2	35,5 ± 0,02	7,19 ± 0,05	33,1 ± 0,16	9,50 ± 0,04	24,1 ± 0,14	6,19 ± 0,00	29,4 ± 0,25	3,90 ± 0,13	36,0 ± 0,02
BL3	35,4 ± 0,07	7,10 ± 0,09	35,3 ± 0,54	10,6 ± 0,09	22,7 ± 0,03	5,63 ± 0,11	29,3 ± 0,49	3,40 ± 0,28	35,8 ± 0,02
BL4	35,7 ± 0,09	6,70 ± 0,19	35,6 ± 0,25	10,9 ± 0,33	24,1 ± 0,07	5,96 ± 0,01	27,7 ± 0,38	3,64 ± 0,57	36,1 ± 0,04
M10	39,7 ± 0,11	6,06 ± 0,08	28,4 ± 0,18	8,20 ± 0,42	20,6 ± 0,17	6,25 ± 0,01	38,6 ± 0,42	3,41 ± 0,20	40,1 ± 0,02
M20	44,8 ± 0,07	5,28 ± 0,13	24,4 ± 0,82	5,43 ± 0,37	18,8 ± 0,03	5,16 ± 0,06	46,3 ± 0,79	3,66 ± 0,21	45,5 ± 0,04

MS – matéria seca; MN – matéria natural; MM – matéria mineral; FDN – fibra em detergente neutro; FDA – fibra em detergente ácido; PB – proteína bruta; EE – extrato etéreo; CNF – carboidratos não fibrosos; CS – carboidratos solúveis; CF – capacidade fermentativa; Cont – sem uso de aditivo; LB – *L. buchneri*; Cepa – combo de bactérias; BS1,0 – Benzoato de Sódio 1,0 g/kg MN; BS1,5 – Benzoato de Sódio 1,5 g/kg MN; BS2,0 – Benzoato de Sódio 2,0 g/kg MN; BL2 – *Blend* de ácidos orgânicos 2,0 L/t MN; BL3 – *Blend* de ácidos orgânicos 3,0 L/t MN; BL4 – *Blend* de ácidos orgânicos 4,0 L/t MN; M10 – adição de 10% de milho moído ao WDBS; M20 – adição de 20% de milho moído ao WDBS.

4.2.2 Estratégia 2: avaliação dos aditivos no WDBS conservado

Os 11 tratamentos foram testados sob duas formas de armazenamento: em caixa plástica de 20 litros sem tampa cobertas com filme plástico e voal para evitar a entrada de moscas, simulando as pilhas utilizadas a campo, e em baldes plásticos de 20 litros, com tampas de vedação e envoltos por fita adesiva para assegurar a anaerobiose. Antes do acondicionamento do WDBS, o conjunto vazio foi pesado e, após o enchimento, procedeu-se a uma segunda pesagem para determinar a massa no momento da ensilagem. Em ambas formas de armazenamento o material não foi compactado. Os tratamentos foram armazenados em sala com temperatura ambiente por 40 dias. Cada tratamento foi confeccionado com 4 repetições.

Ao final dos 40 dias de armazenamento, as caixas e baldes foram pesados novamente e abertos para a amostragem das silagens. Os pesos das caixas foram relacionados aos teores de MS na ensilagem e na abertura, para avaliação das perdas fermentativas. Após pesagem retirou-se o material superficial que apresentava deterioração e o restante foi homogeneizado para a coleta de amostras, as quais foram destinadas às avaliações de teores de nutrientes, de estabilidade aeróbia e das características fermentativas apresentadas a seguir.

4.2.2.1 Caracterização da fermentação: pH, microbiologia e produtos de fermentação formados

A análise de perfil microbiano das silagens deu-se a partir de um extrato aquoso obtido pela homogeneização de 25g de amostra fresca em 225g de água deionizada estéril, por 4 minutos em aparelho homogeneizador de alimentos. No dia da abertura dos silos, foi calibrado um pHmetro digital da marca Digimed DM-22® para a realização das leituras de pH. Para determinação da quantidade de microrganismos, foram efetuadas diluições decimais sequenciais na faixa de 10^{-1} a 10^{-5} . Placas contendo meio de cultura MRS com antifúngico Natamicina ($0,25 \text{ g L}^{-1}$) foram incubadas sob anaerobiose a 32°C durante 48h visando a quantificação de bactérias ácido lácticas (BAL). Adicionalmente, placas contendo ágar DRBC foram incubadas a 27°C para o cultivo de fungos filamentosos e leveduras. A leitura de leveduras realizou-se após 48 horas de incubação, enquanto a contagem de fungos filamentosos ocorreu após 5 a 7 dias.

Os teores de ácido láctico das amostras foram analisados por método colorimétrico, segundo Pryce (1969). Os teores de ácidos orgânicos, ésteres, aldeídos e etanol dos

tratamentos foram obtidos a partir do extrato aquoso filtrado e centrifugado, utilizando-se um cromatógrafo gasoso com detector de massas (GC-MS) (GCMS QP 2010 plus, Shimadzu®, Kyoto, Japan), dotado de coluna capilar Stabilwax, Restek® (Bellefonte, USA, 60 m, 0,25 mm ϕ , 0,25 μ m crossbond carbowax polyethylene glycol).

A matéria seca do material, estipulada por secagem em estufa a 55°C, foi acrescida dos produtos voláteis, gerando a matéria seca corrigida para voláteis, conforme equação de Weissbach (2009). Nesta equação, os ácidos graxos voláteis(*) englobam os ácidos propiônico, acético, butírico, iso-butírico, valérico e iso-valérico:

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

4.2.3 Análise estatística

A pesquisa foi conduzida em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento. Os dados foram analisados por análise de variância através do procedimento Mixed do software SAS Studio® (SAS Institute INC.) e para remoção de outlier foi utilizado o procedimento GLM do software SAS Studio®. O modelo estatístico incluiu o efeito fixo do aditivo, da forma de armazenamento e da interação entre esses fatores. A significância estatística foi estabelecida para valores de $P < 0,05$, com a comparação das médias realizada através do teste Tukey a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estratégia 1: estabilidade aeróbia do WDBS fresco, após aplicação dos aditivos

A estabilidade aeróbia do WDBS fresco, logo após a aplicação dos tratamentos, está apresentada na tabela 4. O tratamento Cont, que não recebeu nenhum aditivo, apresentou menor tempo de estabilidade aeróbia, maior valor de temperatura máxima e menor tempo para temperatura máxima ser alcançada. A inoculação com o combo de bactérias (Cepa) teve um maior tempo de estabilidade em relação ao controle, porém foi menos eficiente que os demais tratamentos. Possivelmente devido as características do WDBS, que apresentava baixo pH (3,86) e baixa concentração de CS (2,77). Conforme estacado por McDonald et al. (1991), valores de pH abaixo de 4,00 inibe o desenvolvimento da maioria das bactérias e concentrações de CS inferiores a 6% na MS prejudica o processo de fermentação da silagem.

O tratamento com BS1,0 apresentou quebra da estabilidade com 237 horas, mas não foi diferente estatisticamente dos demais tratamentos, que mantiveram a estabilidade máxima do WDBS, por 240 horas. Portanto, pode-se observar uma ação eficaz dos aditivos em aumentar o tempo de estabilidade aeróbia do WDBS fresco, reduzindo sua velocidade de deterioração e estendendo a vida útil do alimento.

Tabela 4 – Estabilidade aeróbia do WDBS fresco, após aplicação dos aditivos

Tratamentos	Variável		
	EA, h	Tmax, °C	TempoTmax, h
Cont	126c	25,6c	151b
LB	240a	21,9 ^a	240a
Cepa	227b	24,9bc	240a
BS1,0	237a	23,2ab	240a
BS1,5	240a	21,3 ^a	240a
BS2,0	240a	21,1 ^a	240a
BL2	240a	21,2 ^a	240a
BL3	240a	21,1 ^a	240a
BL4	240a	21,2 ^a	240a
M10	240a	21,5 ^a	240a
M20	240a	21,1 ^a	240a
EPM	2,59	0,41	0,11
<i>P</i> valor	<,0001	<,0001	<,0001

EA- estabilidade aeróbia; Tmax – temperatura máxima; TempoTmax- tempo para alcance da temperatura máxima; Cont – sem uso de aditivo; LB – *L. buchneri*; Cepa – combo de bactérias; BS1,0 – Benzoato de Sódio 1,0 g/kg MN; BS1,5 – Benzoato de Sódio 1,5 g/kg MN; BS2,0 – Benzoato de Sódio 2,0 g/kg MN; BL2 – *Blend* de ácidos orgânicos 2,0 L/t MN; BL3 – *Blend* de ácidos orgânicos 3,0 L/t MN; BL4 – *Blend* de ácidos orgânicos 4,0 L/t MN; M10 – 90% de WDBS e 10% de milho moído; M20 – 80% de WDBS e 20% de milho moído. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferenciam estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

5.2 Estratégia 2

5.2.1 Composição química do WDBS após fermentação

Após estocagem, o WDBS armazenado em condições de anaerobiose apresentou um teor de MS superior ao WDBS armazenado em aerobiose (Figura 3). Acredita-se que o material exposto à oxigênio tenha sido afetado por uma taxa de respiração aeróbia mais elevada por parte dos microrganismos, resultando em uma perda maior de MS. Entre os tratamentos aplicados, o WDBS tratado com adição de milho apresentou um acréscimo no teor de MS proporcional ao nível de adição de milho moído. Como esperado, a inclusão de 10% de milho elevou a concentração de MS em 5 pontos percentuais, enquanto a inclusão de 20% de milho proporcionou um acréscimo de 10 pontos percentuais. A inoculação com a Cepa resultou em um teor de MS inferior aos tratamentos Cont, BS2,0 e BL3. No entanto, vale ressaltar que todos os tratamentos exibiram um teor de MS superior a 30%, o que é

considerado adequado para assegurar uma conservação eficaz do alimento (McDonald et al.,1991).

A composição de nutrientes dos coprodutos de destilaria não é constante e flutua frequentemente dependendo de muitos fatores, como tipo e qualidade do grão e condições de processamento, como moagem, fermentação, temperaturas adotadas durante a secagem e a quantidade de solúveis condensados que são misturados ao WDGS (Reddy et al., 2017). Segundo Buckner et al. (2011) o teor de MS é um dos componentes do WDGS com maior variação entre diferentes plantas produtoras de etanol, apresentando também variação entre os dias e durante o mesmo dia em uma única usina. Conforme relatado por alguns autores, a MS do WDGS pode variar de 46% a 48% na faixa superior (Lehman; Rosentrater, 2007, Lehman; Rosentrater, 2013) para 25% a 34% na faixa inferior (Anderson et al., 2015; Buckner et al., 2008; Garcia; Kalscheur, 2006; Junior et al. 2022).

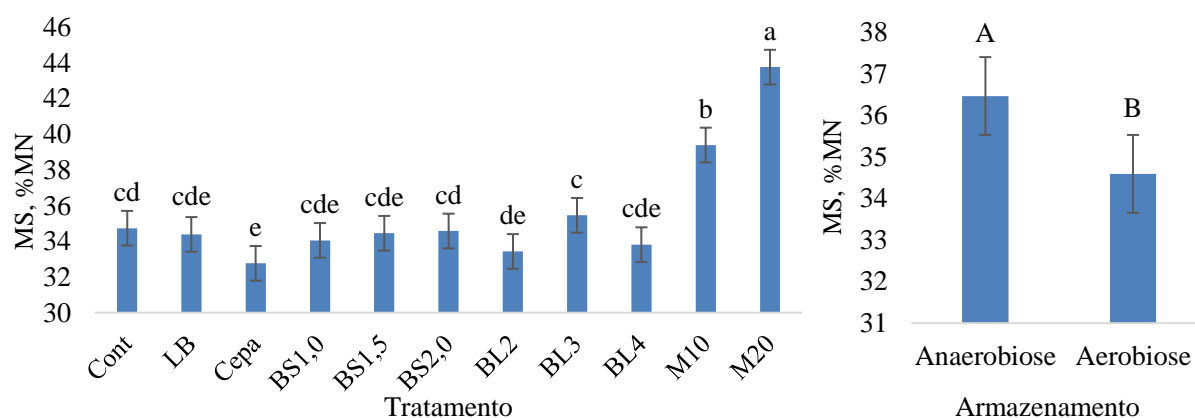


Figura 3 – Teor de matéria seca (MS) do WDGS sem aplicação de aditivos (Cont) ou tratado com *L. buchneri* (LB), combo de bactérias (Cepa), Benzoato de Sódio nas doses 1,0 g/kg MN (BS1,0); 1,5 g/kg MN (BS1,5); 2,0 g/kg MN (BS2,0), Blend de ácidos orgânicos nas doses 2,0 L/t MN (BL2); 3,0 L/t MN (BL3); 4,0 L/t MN (BL4), adição de milho moído nas inclusões de 10% MN (M10) e 20% MN (M20) e armazenado sob anaerobiose ou aerobiose. P-valor trat <0,01, P-valor armazen < 0,01, EPM trat= 0,16, EPM armazen= 0,38. Valores seguidos de letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos. Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tipos de armazenamento. Ambos diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

As variáveis matéria mineral (MM) ou cinzas, estrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e carboidrato não fibroso (CNF) apresentadas na tabela 5, apresentaram efeito apenas de tratamento. Como esperado, a adição de milho

proporcionou diferenças substanciais à composição nutricional. O teor de MM do WDBS foi menor quando foi misturado 10% e 20% de milho, o tratamento Cont apresentou valores intermediários de MM, com 6,86% na MS diferindo estatisticamente dos tratamentos LB, Cepa, BS1,5, BS2,0 e BL4 que apresentaram os maiores teores de MM. Segundo McDonald et al. (1991), uma perda no conteúdo de cinzas pode ser causada pela perda de minerais no efluente ou pode ocorrer um aumento no teor de cinzas se houver perdas de matéria orgânica por oxidação ou fermentação.

O teor de EE acompanhou as taxas de inclusão de milho moído ao WDBS, quanto maior a inclusão de milho menor foi a concentração de EE, isso devido a menor porcentagem de EE nesse ingrediente que contribuiu para essa redução. Uma análise conduzida por Buckner et al. (2011) estudando o WDGS de seis usinas de etanol dos Estados Unidos revelou uma média de 11,9% de EE na MS, um valor superior ao encontrado neste estudo, que foi aproximadamente 6,00%. Esse valor se assemelha ao resultado obtido por Junior et al. (2022), que estudaram um produto de uma usina brasileira e encontraram um teor de EE de 6,79%. O teor de EE dos grãos de destilaria é um componente altamente variável entre usinas. Algumas indústrias também podem implementar etapas adicionais de separação do óleo, visando a comercialização desse ingrediente separadamente, resultando em coprodutos com teores de EE mais baixos.

As concentrações de FDN e FDA foram menores para os tratamentos em que foram adicionados milho moído, devido a sua composição, reduzindo em 14,6 pontos percentuais de FDN e 4,97 de FDA, quando foi adicionado 20% de milho. Entre os demais tratamentos, o WDBS inoculado com *L. buchneri* (LB) apresentou menor teor de FDN (34,9%) em comparação com os tratamentos Cont, Cepa e BS1,0. A diferença de FDN e FDA podem estar relacionadas com as mudanças nos componentes de carboidrato durante o processo de fermentação. Quanto ao teor de carboidrato não fibroso (CNF), a adição de milho resultou em aumentos significativos. A adição de 10% e 20% de milho proporcionou incrementos de 13,8 e 24,7 pontos percentuais, respectivamente, em comparação ao tratamento controle. O teor de CNF inferior a 30% na MS do WDBS se deve ao fato que as usinas utilizam o amido para produção do etanol, resultando em um material rico em fibras e com menor teor de CNF.

Tabela 5 – Composição química do WDBS contendo aditivos e conservado por 40 dias sob anaerobiose ou aerobiose

Item ¹ , % da MS	Tratamentos ²											EPM	P valor ³		
	Cont	LB	Cepa	BS1,0	BS1,5	BS2,0	BL2	BL3	BL4	M10	M20		T	A	T*A
EE	6,42a	5,74ab	6,28a	6,49a	5,87ab	6,31a	5,92ab	6,06ab	5,80ab	5,43bc	4,91c	0,17	<0,01	0,50	0,35
FDN	38,1a	34,9c	37,0ab	38,1a	36,8abc	36,0bc	36,3abc	35,7bc	36,6abc	29,4d	23,6e	0,41	<0,01	0,78	0,35
FDA	11,9a	10,7a	12,0a	11,6a	11,3a	11,2a	11,6a	10,8a	11,2a	8,77b	6,96c	0,33	<0,01	0,66	0,06
MM	6,86b	7,45a	7,33a	7,32ab	7,38a	7,36a	7,29ab	7,25ab	7,33a	6,01c	4,92d	0,10	<0,01	0,26	0,06
CNF	24,9ef	28,9c	25,5def	24,6f	26,6cdef	27,4cde	26,7cdef	28,0cd	26,8cdef	38,7b	49,3a	0,57	<0,01	0,06	0,09

^{a,b,c,d,e,f} Médias seguidas de letra deferente na linha, diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

¹ EE = extrato etéreo; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; MM = matéria mineral; CNF = carboidratos não fibrosos;

² Cont = sem uso de aditivo; LB = *L. buchneri*; Cepa = combo de bactérias; BS1,0 = Benzoato de Sódio 1,0 g/kg MN; BS1,5 = Benzoato de Sódio 1,5 g/kg MN; BS2,0 = Benzoato de Sódio 2,0 g/kg MN; BL2 = *Blend* de ácidos orgânicos 2,0 L/t MN; BL3 = *Blend* de ácidos orgânicos 3,0 L/t MN; BL4 = *Blend* de ácidos orgânicos 4,0 L/t MN; M10 = adição de 10% de milho moído ao WDBS; M20 = adição de 20% de milho moído ao WDBS.

³ T = tratamento, A = armazenamento

Os valores de FDN e FDA encontrados na literatura apresentam uma variabilidade significativa. Exemplificativamente, Anderson et al. (2015) encontraram teores de 32,1% de FDN e 16,2% de FDA na MS, e Ramirez-Ramirez et al. (2011) de 36,4% de FDN e 13,8% de FDA na MS do WDGS. Por outro lado, autores como Antunes (2020), Junior et al. (2022) e Naveena et al. (2020) relataram valores acima de 50% de FDN e 20% de FDA na MS. Esses dados evidenciam a ampla variação que pode ser encontrada na composição dos coprodutos de destilaria.

Em relação à concentração de proteína bruta (PB), houve interação estatística entre tratamento e forma de armazenamento, conforme apresentado na Figura 4. O WDBS inoculado com combo de bactérias, benzoato de sódio nas doses 1,0 e 2,0 g kg⁻¹ MN, *blend* de ácidos orgânicos na dose 2,0 L t⁻¹ e inclusão de 10% de milho apresentou teor de PB menor quando armazenado em condições anaeróbias no que quando armazenado sob aerobiose. De forma similar, Alvarez et al. (2016) relataram que o WDGS armazenado em aerobiose apresentou 0,7 pontos percentuais a mais de PB, em relação ao WDGS armazenado em anaerobiose. Segundo os mesmos autores, pode-se especular que, uma maior perda de MS no armazenamento em aerobiose resultou em um aumento proporcional do teor de proteína bruta.

Independente da forma de armazenamento, os tratamentos com 10% e 20% de milho apresentaram teores de PB mais baixos, devido à composição do milho, que possui uma menor concentração de PB em relação ao WDBS. Entre os demais tratamentos, quando armazenado em anaerobiose, o WDBS que não recebeu nenhum aditivo apresentou um teor de PB de 23,6% na MS, superior ao WDBS tratado com BS2,0, que registrou 22,2% de PB. Quando armazenado sob aerobiose, o tratamento BL3 apresentou um teor de PB inferior aos tratamentos Cepa e BL2, e não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos. Estudos conduzidos por Alvarez et al. (2019), Buckner et al. (2011) e Naveena et al. (2020) relataram valores entre 28,8% e 32% de PB na MS para o coproduto úmido, valores superiores aos encontrados neste experimento, no qual o maior teor de PB foi de 24,5%. Essa variação pode ser atribuída ao processo de obtenção do WDBS utilizado nesse experimento, que envolve a separação da parte fibrosa do milho anteriormente à fase de fermentação.

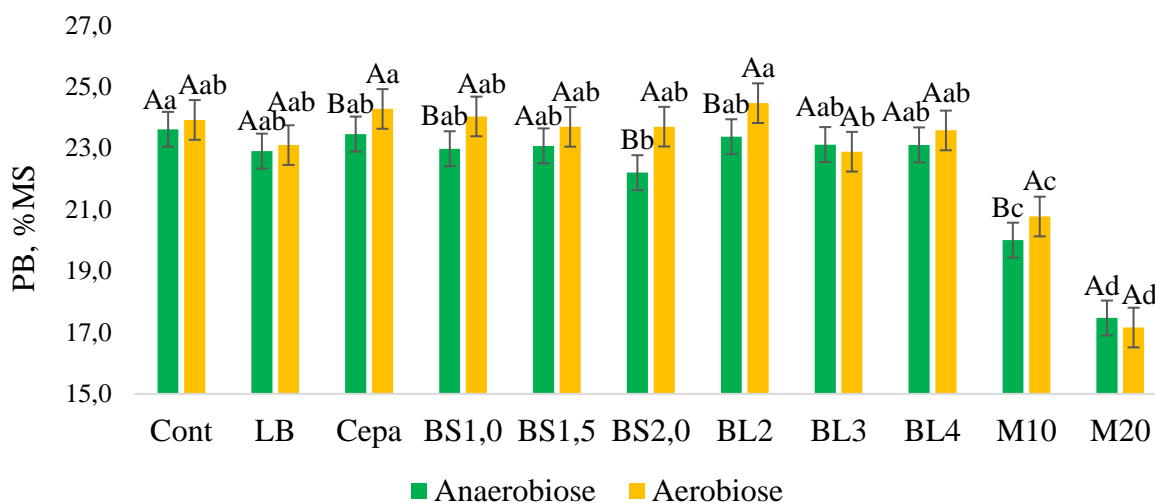


Figura 4 – Teor de proteína bruta (PB) do WDBS sem aplicação de aditivos (Cont) ou tratado com *L. buchneri* (LB), combo de bactérias (Cepa), Benzoato de Sódio nas doses 1,0 g/kg MN (BS1.0); 1,5 g/kg MN (BS1.5); 2,0 g/kg MN (BS2.0), Blend de ácidos orgânicos nas doses 2,0 L/t MN (BL2); 3,0 L/t MN (BL3); 4,0 L/t MN (BL4), adição de milho moído nas inclusões de 10% MN (M10) e 20% MN (M20), armazenados sob anaerobiose ou aerobiose. P-valor trat \times armaz = 0,03, EPM = 0,26. Valores seguidos de letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos dentro da mesma forma de armazenamento. Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tipos de armazenamento no mesmo tratamento. Ambos diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

5.2.2 Características da fermentação

Houve interação estatística entre tratamento e forma de armazenamento para os valores de pH (Figura 5). Os tratamentos Cont, Cepa, BS1,0, BS1,5, M10 e M20 apresentaram menores valores de pH quando armazenados em anaerobiose do que em aerobiose. Não foram identificadas diferenças estatísticas entre os tratamentos armazenados em anaerobiose, e os mesmos apresentaram valores inferiores a 3,90. Já no armazenamento em aerobiose os tratamentos com *L. buchneri* e Blend de ácidos orgânicos na dose de 3,0 L t⁻¹ exibiram os menores valores de pH. Contudo, o valor máximo de pH encontrado foi 4,00 o que já é suficientemente baixo para controlar o desenvolvimento de microrganismos nocivos como enterobactérias, *Clostridium* e fungos filamentosos. Segundo McDonald et al. (1991), quando o pH apresenta valores inferiores a 4,00, a maioria das bactérias indesejáveis são inibidas e a maior parte da fermentação é realizada por bactérias do ácido lático.

Normalmente, o pH do WDGS é baixo devido ao uso de ácido sulfúrico para interromper o processo de fermentação durante a produção de etanol (Mjoun; Kalscheur;

Garcia, 2011). O WDBS utilizado nesse experimento apresentava pH inicial de 3.86. Desta forma, pode-se observar que o pH se manteve baixo por 40 dias de armazenamento, sendo que o armazenamento em anaerobiose resultou em um pH ainda mais baixo, sugerindo que houve uma fermentação desse material. Na mesma linha, Alvarez et al. (2016), Alvarez et al. (2019), Anderson et al. (2015) e Ramirez-Ramirez et al. (2011) observaram valores de pH reduzindo de 4,6 para 4,0 quando o WDBS foi armazenado em anaerobiose.

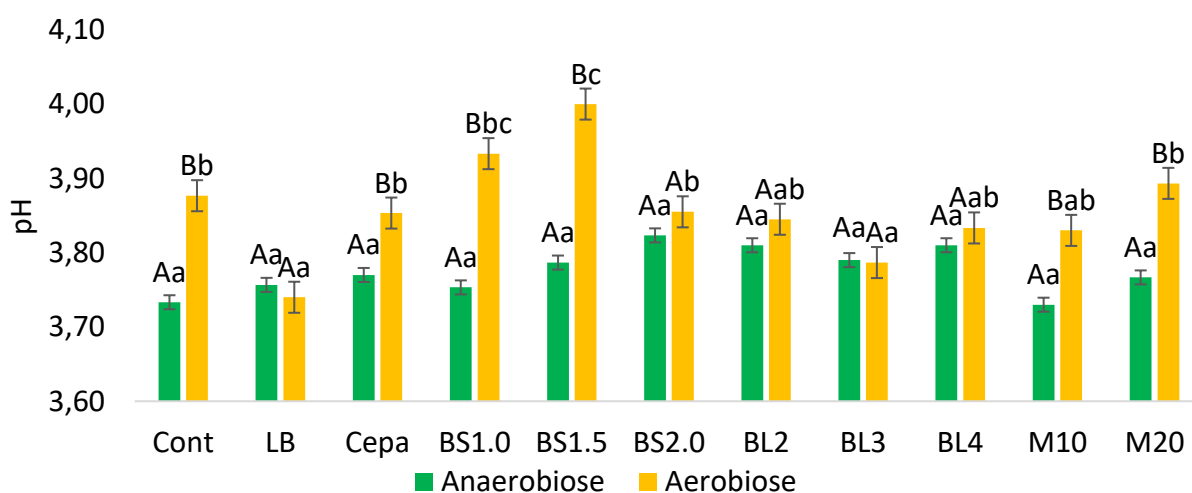


Figura 5 - Valores de pH do WDBS sem aplicação de aditivos (Cont) ou tratado com *L. buchneri* (LB), combo de bactérias (Cepa), Benzoato de Sódio nas doses 1,0 g/kg MN (BS1,0); 1,5 g/kg MN (BS1,5); 2,0 g/kg MN (BS2,0), Blend de ácidos orgânicos nas doses 2,0 L/t MN (BL2); 3,0 L/t MN (BL3); 4,0 L/t MN (BL4), adição de milho moído nas inclusões de 10% MN (M10) e 20% MN (M20), armazenados sob anaerobiose ou aerobiose. P-valor trat×armaz <0,01, EPM = 0,02. Valores com letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos dentro da mesma forma de armazenamento. Valores com letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tipos de armazenamento no mesmo tratamento. Ambos diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Houve interação entre forma de armazenamento e tratamento para os teores de ácido láctico. Os tratamentos Cont e BS1,0 apresentaram uma concentração de ácido láctico superior quando armazenados em ambiente anaeróbio. Em contrapartida, os tratamentos BL3, BL4, e M20 exibiram maiores valores de ácido láctico quando armazenados em condições aeróbias. Ao analisar os valores de ácido láctico representados na Figura 6, torna-se evidente que esses dados seguem um padrão correspondente aos valores de pH. Nos casos em que a quantidade de ácido láctico foi maior, observa-se que o pH estava em níveis mais baixos, como esperado. Essa relação entre pH e ácido láctico é evidente na interação entre as condições de

armazenamento e os tratamentos Cont e BS1,0, bem como numericamente no tratamento BS1,5.

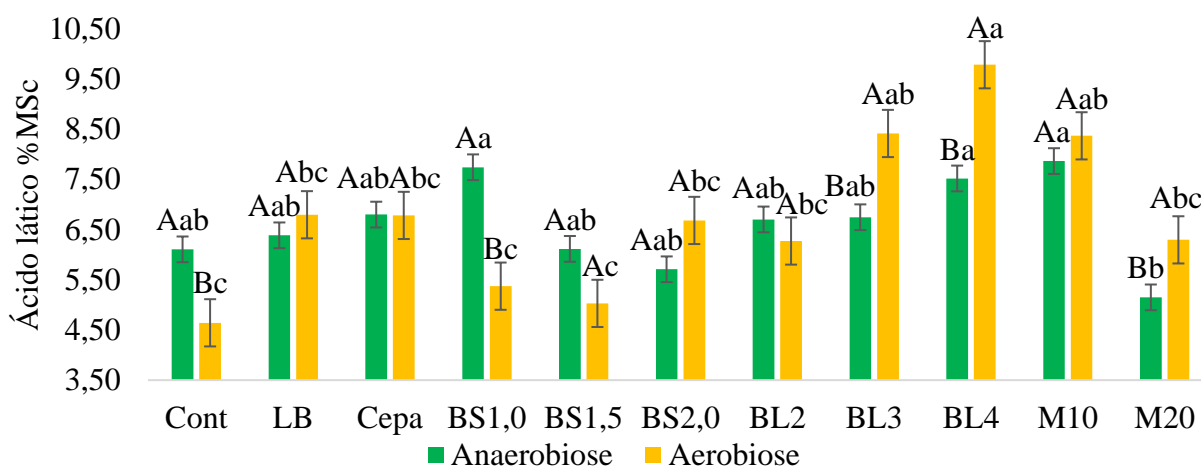


Figura 6 – Valores de ácido láctico do WDBS sem aplicação de aditivos (Cont) ou tratado com *L. buchneri* (LB), combo de bactérias (Cepa), Benzoato de Sódio nas doses 1,0 g/kg MN (BS1,0); 1,5 g/kg MN (BS1,5); 2,0 g/kg MN (BS2,0), Blend de ácidos orgânicos nas doses 2,0 L/t MN (BL2); 3,0 L/t MN (BL3); 4,0 L/t MN (BL4), adição de milho moído nas inclusões de 10% MN (M10) e 20% MN (M20), armazenados sob anaerobiose ou aerobiose. P-valor trat \times armaz <0,01, EPM= 0,29. Valores com letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos dentro da mesma forma de armazenamento. Valores com letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tipos de armazenamento no mesmo tratamento. Ambos diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Quando o WDBS foi armazenado em condições aeróbias, a população de bactérias ácido-láticas (BAL) foi superior, exibindo uma média de 5,29 log ufc g⁻¹, enquanto o armazenamento em anaerobiose apresentou uma contagem média de 3,45 log ufc g⁻¹. Não foi identificado um efeito significativo de tratamento sobre o crescimento das mesmas. Embora o armazenamento em aerobiose tenha favorecido um maior crescimento das BAL, isso não se traduziu necessariamente em uma maior produção de ácido láctico, que é o produto principal do metabolismo desses microrganismos. Isso pode ser atribuído ao fato que o ambiente aeróbio causa uma perturbação sobre o crescimento microbiano, devido a presença de oxigênio na superfície da massa. Essa perturbação pode ter afetado a ação das BAL, de modo que, apesar de sua maior população, sua metabolização de ácido láctico foi prejudicada.

É importante ressaltar que as BAL presentes nas silagens são compostas por diferentes gêneros, sendo *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e

Leuconostoc os seis mais comuns (Pahlow et al., 2003). A população específica das bactérias lácticas pode variar dependendo de diferentes fatores, como o tipo de forragem utilizada, o processo de ensilagem, a temperatura e o ambiente (Macêdo et al., 2017). Deste modo, as variações ocorridas no ambiente das formas de armazenamento deste projeto podem ter influenciado sobre o perfil de BAL, resultando potencialmente no desenvolvimento de um gênero menos eficaz na produção de ácido láctico, mas com um maior crescimento.

Houve efeito da interação entre forma de armazenamento e tratamento para o crescimento de fungos filamentosos, como apresentado na Figura 7. Com exceção dos tratamentos Cepa e BL3, todos os demais tratamentos apresentaram maior quantidade de fungos filamentosos quando armazenados em condições aeróbias do que em anaerobiose. Após os 40 dias de armazenamento, foi possível observar a presença de bolor na superfície do WDBS armazenado nas caixas (aerobiose), enquanto os baldes (anaerobiose) não apresentavam alterações no aspecto visual da massa. O armazenamento em anaerobiose apresentou uma população média de 2,11 log ufc g⁻¹ MS e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas de tratamento nesse método de armazenamento, o que evidencia a alta eficiência da anaerobiose em impedir o desenvolvimento de fungos filamentosos.

No armazenamento em aerobiose, o tratamento com *Blend* de ácidos orgânicos na dose 3,0 L t⁻¹ MN resultou em um menor crescimento de fungos filamentosos, registrando 2,10 log ufc g⁻¹ MS. Isso sugere a eficácia do ácido propiônico como agente antifúngico no WDBS, com melhor eficiência na dose intermediária. Em contrapartida, o tratamento com 20% de milho demonstrou desenvolvimento mais acentuado, alcançando uma população de 4,89 log ufc g⁻¹ MS. Esse resultado pode ser atribuído à composição da silagem, que forneceu uma maior quantidade de substrato para o desenvolvimento de fungos, ou talvez à presença de contaminantes externos provenientes do milho utilizado como aditivo.

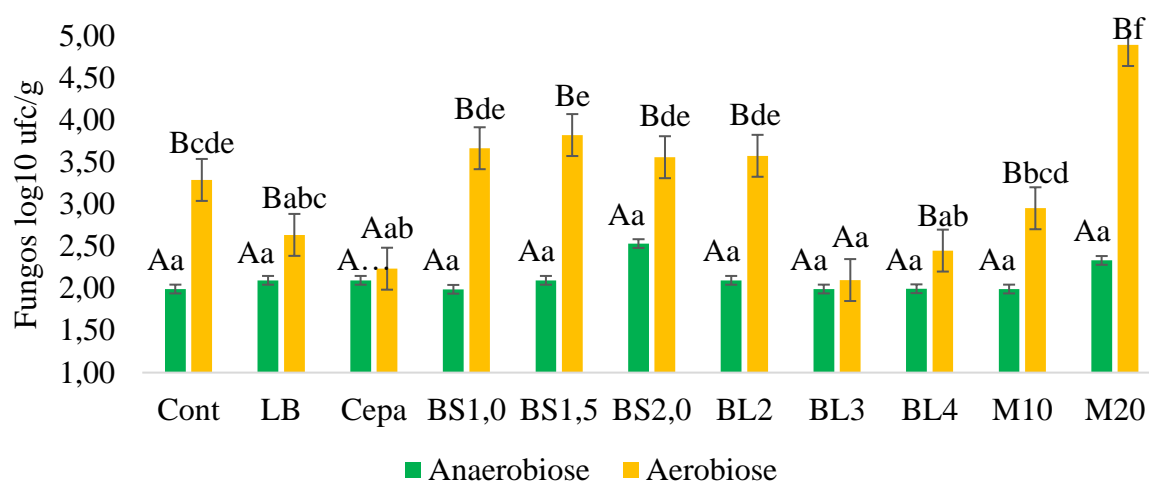


Figura 7 – População de fungos filamentosos do WDBS sem aplicação de aditivos (Cont) ou tratado com *L. buchneri* (LB), combo de bactérias (Cepa), Benzoato de Sódio nas doses 1,0 g/kg MN (BS1,0); 1,5 g/kg MN (BS1,5); 2,0 g/kg MN (BS2,0), Blend de ácidos orgânicos nas doses 2,0 L/t MN (BL2); 3,0 L/t MN (BL3); 4,0 L/t MN (BL4), adição de milho moído nas inclusões de 10% MN (M10) e 20% MN (M20), armazenados sob anaerobiose ou aerobiose. P-valor trat×armaz <0,01, EPM= 0,14. Valores com letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos, dentro da mesma forma de armazenamento. Valores com letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tipos de armazenamento no mesmo tratamento. Ambos diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

O crescimento de leveduras foi mínimo para todos os tratamentos após os 40 dias de armazenamento. Alvarez et al. (2019) observaram que o crescimento de fungos filamentosos no armazenamento em anaerobiose zerou após 30 dias de armazenamento, enquanto o crescimento de leveduras permaneceu constante, mantendo-se em média 6,0 log ufc g⁻¹ MS durante 60 dias de armazenamento. Em contrapartida, no armazenamento em aerobiose, o crescimento de fungos atingiu 6,5 log ufc g⁻¹ MS após 20 dias, enquanto o crescimento de leveduras alcançou 7,6 log ufc g⁻¹ MS. As discrepâncias nas populações desses microrganismos neste estudo podem estar relacionadas ao produto em análise. É importante notar que Alvarez et al. (2019) trabalharam com o WDGS obtido após o processo de destilação do etanol, enquanto o WDBS do presente estudo foi obtido pela separação da fibra antes da fermentação.

Entre os ácidos voláteis presentes, o 2,3-butanodiol foi o composto volátil que apresentou maior concentração, conforme apresentado na tabela 6. O 2,3-butanodiol é um álcool derivado da fermentação de açúcares, realizada principalmente por bactérias do gênero *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus* e *Serratia* (Magee; Kosaric, 1987). Ademais, a levedura

Saccharomyces cerevisiae também demonstra a capacidade de sintetizar esse composto (Sugimura et al., 2023). O WDBS utilizado neste estudo apresentava uma concentração inicial elevada de 2,3-butanodiol (2,3% da MSc), sugerindo a possibilidade de sua origem no processo de fermentação realizado na usina de produção de etanol, onde *S. cerevisiae* é utilizada. A temperatura de ebulição elevada do 2,3-butanodiol, aproximadamente 180°C, sugere que o composto não é separado durante a destilação do etanol, que ocorre em torno de 80°C. Como resultado, o 2,3-butanodiol permanece dissolvido nos condensados solúveis, os quais são incorporados ao WDBS.

Foi evidenciada uma interação entre tratamento e forma de armazenamento para os demais compostos voláteis (Tabela 6). De forma geral, os ácidos acético e propiônico apresentaram concentrações superiores quando armazenados em condições aeróbias do que em anaerobiose, o que está em consonância com a população de BAL. Isso sugere a predominância de BAL heteroláticas, uma vez que, como mencionado anteriormente, o teor de ácido láctico não foi consistente com a população de BAL, enquanto os níveis desses ácidos graxos de cadeia curta estiveram em conformidade com o crescimento de BAL. Em relação ao ácido propiônico, observa-se uma concentração notavelmente superior quando o WDBS foi tratado com o *Blend* de químicos, o que pode ser atribuído à composição predominante de ácido propiônico no aditivo utilizado.

As concentrações de etanol foram baixas, correspondendo à escassa população de leveduras, que apresentou uma contagem mínima. A concentração de etanol manteve conformidade com a concentração de ácido propiônico, sempre que a quantidade de ácido propiônico se mostrou mais elevada, o teor de etanol foi proporcionalmente menor, corroborando assim a eficácia antifúngica desse ácido sobre leveduras.

No armazenamento em condições anaeróbias, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos em relação às concentrações dos compostos voláteis apresentados na Tabela 6. Com exceção do aumento do ácido propiônico quando o *Blend* de químicos foi adicionado. Geralmente, quando se utiliza *L. buchneri* na dose empregada neste trabalho, espera-se uma maior concentração de ácido acético e ácido propiônico, como evidenciado por Kung Jr. e Ranjit (2001) e Reich e Kung Jr. (2010).

Tabela 6 – Compostos voláteis do WDBS contendo aditivos e conservado por 40 dias sob anaerobiose ou aerobiose

Item	Tratamentos ¹											Média	EPM	<i>P</i> valor ²		
	Cont	LB	Cepa	BS1,0	BS1,5	BS2,0	BL2	BL3	BL4	M10	M20			T	A	T*A
MSc ³ , %													0,59	<0,01	<0,01	0,70
Anaerobiose	40,0	39,5	37,6	38,7	39,1	40,4	37,4	39,9	39,2	44,9	48,7	40,5A				
Aerobiose	38,1	38,5	35,1	37,9	38,2	37,8	37,3	40,4	37,7	42,9	48,3	39,3B				
Média	39,1cd	39,0cd	36,4d	38,3cd	38,7cd	39,1cd	37,4cd	40,2c	38,5cd	43,9b	48,5a					
2,3-Butanodiol, %MSc													0,22	0,13	0,20	0,14
Anaerobiose	2,81	2,81	3,06	2,46	3,10	3,22	2,67	2,74	2,94	2,77	2,07	2,79				
Aerobiose	3,31	3,14	1,78	3,39	3,03	3,18	2,73	3,36	3,18	2,96	2,51	2,96				
Média	3,06	2,98	2,42	2,93	3,07	3,20	2,70	3,05	3,06	2,87	2,29					
Ácido acético, %MSc													0,07	<0,01	<0,01	<0,01
Anaerobiose	0,82Ba	0,74Ba	0,81Aa	0,63Ba	0,85Ba	0,87Ba	0,78Ba	0,83Ba	0,91Ba	0,81Aa	0,66Ba	0,79				
Aerobiose	1,36Aa	1,08Aab	0,66Ab	1,57Aa	1,52Aa	1,36Aa	1,51Aa	1,30Aa	1,36Aa	0,99Aab	1,30Aa	1,27				
Média	1,09	0,91	0,74	1,10	1,19	1,12	1,14	1,06	1,14	0,90	0,98					
1,2-Propanodiol, %MSc													0,02	0,04	0,02	<0,01
Anaerobiose	0,32Aa	0,27Ba	0,30Aa	0,24Aa	0,30Aa	0,28Aa	0,25Aa	0,24Aa	0,28Aa	0,26Aa	0,23Aa	0,27				
Aerobiose	0,26Aab	0,37Aa	0,17Bb	0,22Aab	0,16Bb	0,24Aab	0,19Ab	0,29Aab	0,28Aab	0,19Ab	0,27Aab	0,24				
Média	0,29	0,32	0,24	0,23	0,23	0,26	0,22	0,27	0,28	0,23	0,25					

Continua

Item	Tratamentos ¹											Média	EPM	P valor ²			
	Cont	LB	Cepa	BS1,0	BS1,5	BS2,0	BL2	BL3	BL4	M10	M20			T	A	T*A	
Etanol, %MSc														0,02	<0,01	<0,01	0,01
Anaerobiose	0,25Aa	0,26Aa	0,26Aa	0,19Aa	0,34Aa	0,23Aa	0,24Aa	0,23Aa	0,24Aa	0,32Aa	0,27Aa	0,26					
Aerobiose	0,11Bab	0,23Aa	0,11Bab	0,07Bb	0,07Bb	0,10Bb	0,09Bb	0,17Aab	0,14Bab	0,26Aa	0,19Bab	0,14					
Média	0,18	0,24	0,18	0,13	0,2	0,16	0,17	0,2	0,19	0,29	0,23						
Ácido propiônico, mg/kg MSc														71,3	<0,01	<0,01	<0,01
Anaerobiose	114Bc	74,6Ac	96,7Bc	63,3Bc	74,6Bc	59,8Bc	981Bb	2265Aa	2726Ba	352Ac	118Bc	630					
Aerobiose	678Acd	220Ad	436Acd	866Ac	902Ac	708Acd	2285Ab	2090Ab	3773Aa	478Acd	608Acd	1186					
Média	396	147	266	465	488	384	1633	2177	3250	415	363						
Ácido butírico, mg/kg MSc														15,8	<0,01	<0,01	<0,01
Anaerobiose	17,4Ba	16,6Ba	15,2Ba	19,4Ba	12,2Ba	15,0Ba	18,8Ba	11,1Ba	11,6Ba	10,6Aa	6,51Ba	14					
Aerobiose	91,6Ac	81,4Ac	128Ac	111Ac	259Ab	267Ab	429Aa	92,5Ac	89,6Ac	53,7Ac	179Abc	162					
Média	54,5	49	71,5	65,2	135	141	224	51,8	50,6	32,1	92,8						

a, b, c, d Médias seguidas de letra minúscula deferente na linha, diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

A, B Médias seguidas de letra maiúscula deferente na coluna, diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

¹ Cont= sem uso de aditivo; LB= *L. buchneri*; Cepa= combo de bactérias; BS1,0= Benzoato de Sódio 1,0 g/kg MN; BS1,5= Benzoato de Sódio 1,5 g/kg MN; BS2,0= Benzoato de Sódio 2,0 g/kg MN; BL2= *Blend* de ácidos orgânicos 2,0 L/t MN; BL3= *Blend* de ácidos orgânicos 3,0 L/t MN; BL4= *Blend* de ácidos orgânicos 4,0 L/t MN; M10= adição de 10% de milho moído ao WDBS; M20= adição de 20% de milho moído ao WDBS.

² T= tratamento, A= armazenamento

³ MSc= Matéria seca corrigida para compostos voláteis

As ligeiras variações nos compostos voláteis sugerem que o sucesso do armazenamento anaeróbio do WDBS pode ser atribuído, provavelmente, ao baixo pH inicial e à baixa quantidade de açúcares fermentáveis, em vez do processo subsequente de fermentação, como também observado por Anderson e Garcia (2015) e Garcia e Kalscheur (2001).

5.2.3 Perdas de matéria seca

Os valores originais das perdas de MS estão apresentados na Figura 8, contudo, em virtude da alternância dos dados, procedeu-se a um tratamento dos mesmos utilizando a função módulo. Desta forma, a fundamentação de nossa discussão será embasada nos dados tratados, os quais estão detalhados na Figura 9.

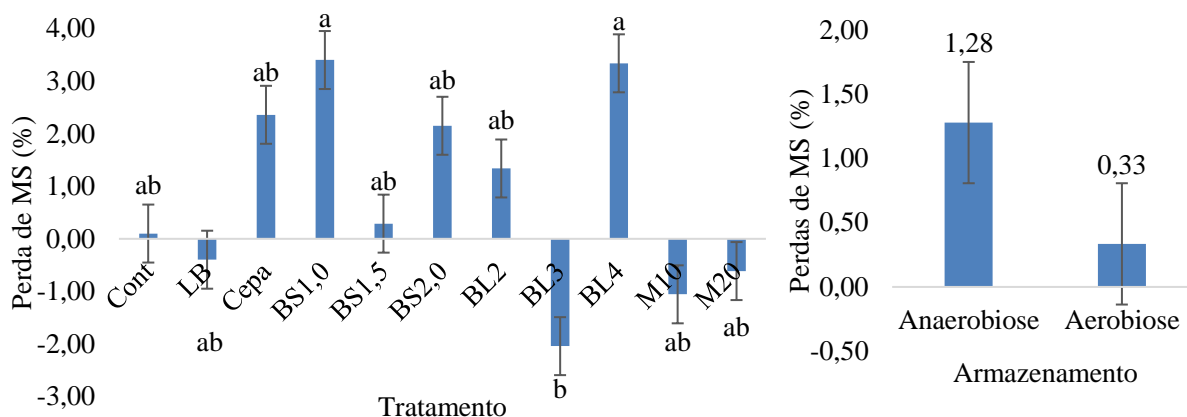


Figura 8 – Perdas de matéria seca do WDBS sem aplicação de aditivos (Cont) ou tratado com *L. buchneri* (LB), combo de bactérias (Cepa), Benzoato de Sódio nas doses 1,0 g/kg MN (BS1,0); 1,5 g/kg MN (BS1,5); 2,0 g/kg MN (BS2,0), Blend de ácidos orgânicos nas doses 2,0 L/t MN (BL2); 3,0 L/t MN (BL3); 4,0 L/t MN (BL4), adição de milho moído nas inclusões de 10% MN (M10) e 20% MN (M20) e armazenado sob anaerobiose ou aerobiose. P-valor trat <0,01, P-valor armazen= 0,15, EPM trat= 1,07, EPM armazen= 0,46. Valores com letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

As análises de perda de MS do WDBS apresentaram uma média geral de 3,04%, e não foram encontradas diferenças estatísticas para essa variável (Figura 9). Isso revela que, para as condições deste trabalho, nenhum aditivo ou forma de armazenamento testado apresentou efeito sobre as perdas de MS. No geral, o padrão de perdas de MS não apresentou associação com os teores de MS, os quais, por sua vez, revelaram diferenças estatísticas significativas tanto entre as formas de armazenamento quanto entre os aditivos utilizados. Entretanto, pode-se observar que, enquanto o teor de MS foi superior para o armazenamento em condições anaeróbias em comparação com o armazenamento em aerobiose, de maneira congruente, as

perdas de MS durante o armazenamento em anaerobiose foram numericamente menores que no armazenamento em aerobiose. Para estudos futuros, é sugerido realizar também a quantificação das perdas do material deteriorado retirado da superfície da massa, assim como as perdas por efluentes que não foram analisados neste trabalho.

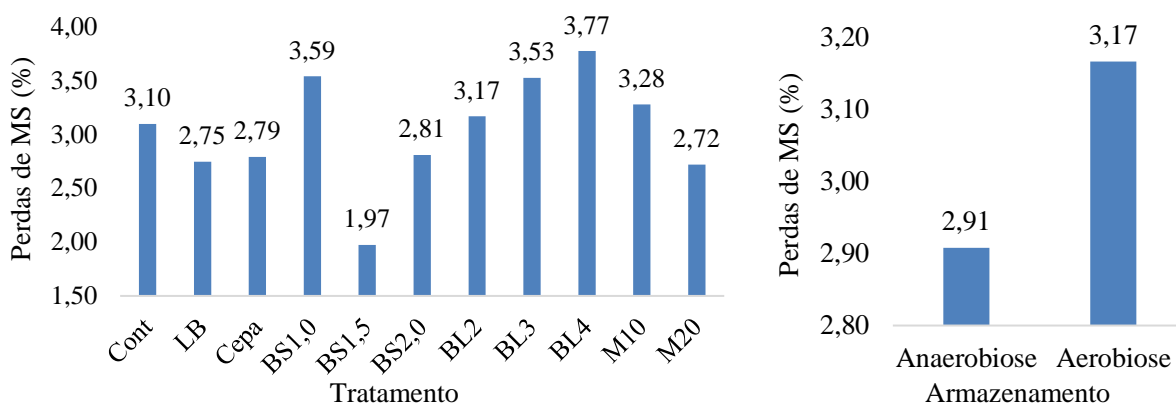


Figura 9 – Perdas de matéria seca após tratamento dos dados do WDBS sem aplicação de aditivos (Cont), ou tratado com *L. buchneri* (LB), combo de bactérias (Cepa), Benzoato de Sódio nas doses 1,0 g/kg MN (BS1,0); 1,5 g/kg MN (BS1,5); 2,0 g/kg MN (BS2,0), Blend de ácidos orgânicos nas doses 2,0 L/t MN (BL2); 3,0 L/t MN (BL3); 4,0 L/t MN (BL4), adição de milho moído nas inclusões de 10% MN (M10) e 20% MN (M20) e armazenado sob anaerobiose ou aerobiose. P-valor trat= 0,81, P-valor armazen= 0,51, EPM trat= 0,65, EPM armazen= 0,28.

Na figura 10 é retratado o aspecto visual dos baldes e caixas logo após a abertura aos 40 dias. Observa-se um notável crescimento de mofo na superfície do WDBS durante o armazenamento em aerobiose, quando comparado ao armazenamento em condições anaeróbias. As análises do peso da matéria verde final, realizadas aos 40 dias, em relação ao peso da matéria verde inicial (no dia da inoculação), revelaram uma interação estatisticamente significativa entre forma de armazenamento e tratamento (Figura 11). No armazenamento em aerobiose, todos tratamentos apresentaram um elevado ganho de massa ao longo do período de armazenamento, possivelmente atribuído ao ganho de massa microbiana resultante da proliferação de fungos na superfície do material. Em contrapartida, no armazenamento em anaerobiose, apenas os tratamentos com aditivos microbianos, LB e Cepa, apresentaram ganho de peso. De acordo com Schmidt, Novinski e Zopollato (2018) e Vigne (2022), em condições anaeróbias, os microrganismos presentes na silagem podem metabolizar e incorporar o CO₂ de fontes inorgânicas na MS da silagem. Embora ainda não seja possível afirmar quais microrganismos estão envolvidos nesse processo de fixação de CO₂, tal

fenômeno pode justificar o aumento de peso encontrado no WDBS tratado com inoculantes microbianos.

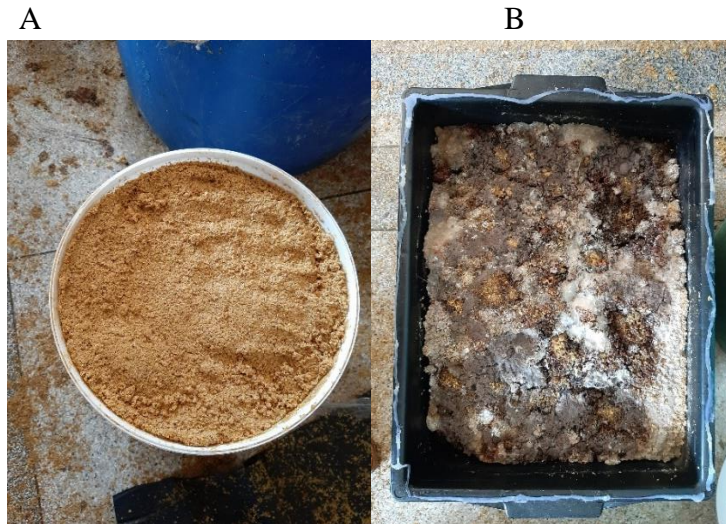


Figura 10 – Aspecto visual representativo do WDBS armazenado em anaerobiose (A) e aerobiose (B).

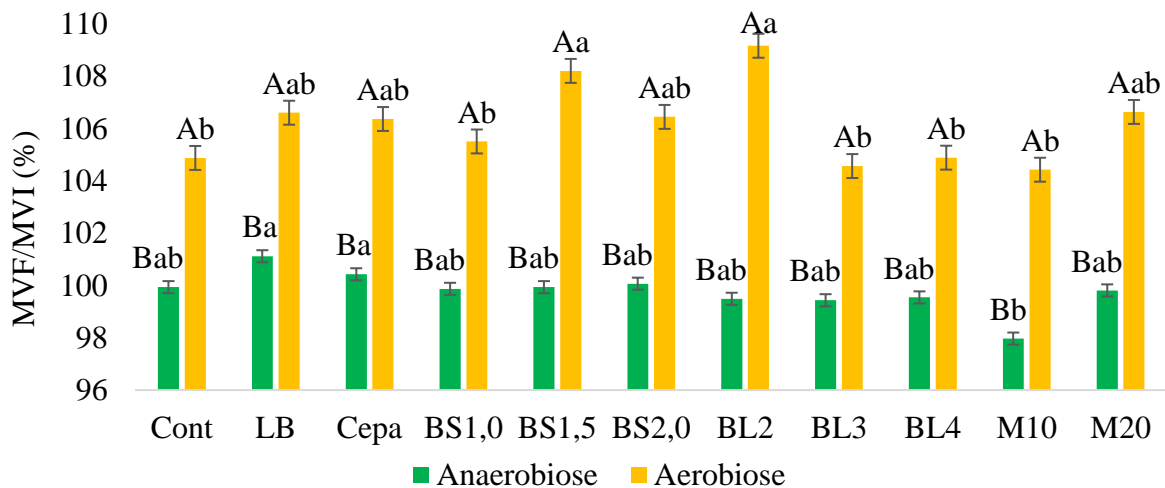


Figura 11 – Peso da massa verde final (MVF) em relação da massa verde inicial (MVI) do WDBS sem aplicação de aditivos (Cont) ou tratado com *L. buchneri* (LB), combo de bactérias (Cepa), Benzoato de Sódio nas doses 1,0 g/kg MN (BS1,0); 1,5 g/kg MN (BS1,5); 2,0 g/kg MN (BS2,0), Blend de ácidos orgânicos nas doses 2,0 L/t MN (BL2); 3,0 L/t MN (BL3); 4,0 L/t MN (BL4), adição de milho moído nas inclusões de 10% MN (M10) e 20% MN (M20), armazenados sob anaerobiose ou aerobiose. P-valor trat \times armaz <0,01, EPM= 0,48. Valores com letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos, dentro da mesma forma de armazenamento. Valores com letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tipos de armazenamento no mesmo tratamento. Ambos diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

5.2.4 Estabilidade aeróbia após 40 dias de estocagem

A estabilidade aeróbia após o período de armazenamento de 40 dias está apresentada na Tabela 7. Houve interação significativa entre forma de armazenamento e tratamento em relação às variáveis estabilidade aeróbia e temperatura máxima alcançada. O WDBS tratado com o combo de bactérias (Cepa) apresentou maior tempo de estabilidade quando foi armazenado sob aerobiose (221h) do que em anaerobiose (176h). As análises fermentativas revelaram que o tratamento Cepa apresentou resultados semelhantes ao controle quando armazenado em anaerobiose. No entanto, em condições aeróbias, ele apresentou menor contagem de fungos filamentosos, maior teor de ácido lático e menor teor de ácido acético em comparação ao controle. Isso evidencia que, quando o WDBS foi armazenado em anaerobiose, as características intrínsecas do material inibiram o desenvolvimento dos microrganismos inoculados, enquanto que em aerobiose esse efeito inibitório não foi transmitido. Essa constatação justifica o motivo pelo qual o tratamento com o combo de bactérias contribuiu para o aumento da estabilidade aeróbia quando o material foi armazenado em condições aeróbias.

Em contrapartida, os tratamentos que envolveram a adição de milho (M10 e M20) proporcionaram um maior tempo de estabilidade aeróbia quando armazenados em condições anaeróbias. Isso ocorreu devido à ausência de oxigênio, a qual inibiu eficazmente o desenvolvimento de fungos, conforme ilustrado na Figura 7, quando comparado ao armazenamento em condições aeróbias. A mudança na composição química do WDBS, acarretada pela adição de milho (Tabela 5), criou um ambiente mais favorável ao crescimento de fungos quando armazenado em aerobiose, o que resultou em uma maior deterioração aeróbia e, conseqüentemente, em uma maior temperatura máxima alcançada. Por outro lado, quando armazenado em anaerobiose, a redução da umidade proporcionada pela adição de milho, resultou em uma maior estabilidade aeróbia quando comparado com o tratamento controle.

Quando armazenado em anaerobiose, o WDBS sem qualquer aditivo (Cont) apresentou menor estabilidade aeróbia e maior velocidade de deterioração, em comparação com os tratamentos que foram adicionados aditivos químicos e milho laminado. Os tratamentos com aditivos biológicos, LB e Cepa, resultaram em tempos de estabilidade intermediários, porém sem diferenças estatisticamente significativas em relação ao Cont. Em contrapartida, os tratamentos com os aditivos químicos, benzoato de sódio e *blend* de ácidos

orgânicos, alcançaram estabilidade aeróbia máxima (240 h), independentemente da dose aplicada. Isso destaca a eficácia desses aditivos químicos em manter o WDBS estável por um período prolongado após a abertura, devido ao seu efeito antimicrobiano.

No armazenamento em aerobiose o WDBS tratado com benzoato de sódio nas três doses e com *blend* de químicos orgânicos na maior dose (BL4) apresentaram o maior tempo de estabilidade aeróbia. Comprovando a alta eficácia do benzoato de sódio, mesmo na menor dose, em manter a vida útil do WDBS após abertura. O tratamento com adição de 10% de milho apresentou menor tempo de estabilidade aeróbia (172h) e maior temperatura máxima alcançada (35,8°C) em comparação com os tratamentos BS1, BS1,5, BS2 e BL4. Em suma, nota-se que os aditivos microbiológicos não tiveram um bom desempenho em aumentar a estabilidade aeróbia do WDBS quando comparado aos aditivos químicos. Esses resultados podem ser atribuídos as características do WDBS, que é um produto que possui baixo pH, baixa quantidade de substrato para o crescimento de microrganismos e que demonstra boa capacidade em se manter estável enquanto armazenado em anaerobiose.

No estudo conduzido por Da Silva et al. (2015), foi investigado o impacto de um aditivo composto por benzoato de sódio, sorbato de potássio e nitrito de sódio na preservação aeróbia do milho úmido. Após um período de armazenamento de 21 dias, os resultados revelaram um notável aumento na estabilidade aeróbia, com um tempo de mais de 500 horas para o grupo submetido ao tratamento, em contraste com as 89 horas de estabilidade observadas no grupo de controle. Um estudo conduzido por Kung Jr. et al. (2000), que investigou a aplicação do ácido propiônico na ensilagem de silagem de milho, foi observado um aumento de 37 horas na estabilidade aeróbia do WDGS tratado, em comparação com a silagem não tratada. Ambas pesquisas destacam a eficácia dos aditivos químicos em promover a estabilidade aeróbia das silagens.

Mjoun, Kalscheur e Garcia (2011) avaliaram a inclusão da planta inteira de milho ao WDGS e constataram que a estabilidade aeróbia melhorou à medida que a concentração de WDGS na silagem aumentou. De maneira semelhante, Buckmaster et al. (2008) estudaram a ensilagem de WDGS em combinação com silagem de milho, talos de milho, casca de soja e palha de trigo, e observaram uma melhoria significativa na estabilidade aeróbia da silagem à medida que a proporção de WDGS na mistura aumentava.

Tabela 7 - Estabilidade aeróbia do WDBS contendo aditivos e conservado por 40 dias sob anaerobiose ou aerobiose

Item ¹	Tratamentos ²											Média	EPM	P valor ³			
	Cont	LB	Cepa	BS1,0	BS1,5	BS2,0	BL2	BL3	BL4	M10	M20			T	A	T*A	
EA, h																	
Anaerobiose	167Ac	231Aabc	176Bbc	240Aa	240Aa	240Aa	240Aa	240Aa	240Aa	240Aa	234Aab	240Aa	226	7,80	<0,01	0,10	<0,01
Aerobiose	190Aab	217Aab	221Aab	240Aa	240Aa	240Aa	219Aab	216Aab	240Aa	172Bb	204Bab	218					
Média	179	224	198	240	240	240	229	228	240	203	222						
Tmax, °C																	
Anaerobiose	32,0Aa	24,5Aa	32,9Aa	22,0Aa	21,6Aa	22,0Aa	22,2Aa	21,4Aa	21,7Aa	22,9Aa	21,7Aa	24,1	1,64	<0,01	0,01	0,05	
Aerobiose	32,1Aab	27,3Aab	29,4Aab	22,0Aa	21,9Aa	21,6Aa	27,7Aab	25,8Aab	22,4Aa	35,8Bb	30,1Bab	26,9					
Média	32,1	25,9	31,2	22,0	21,8	21,8	25,0	23,6	22,1	29,4	25,9						
TempoTmax, h																	
Anaerobiose	240	240	240	240	240	240	240	240	240	239	240	240	2,13	0,04	0,07	0,08	
Aerobiose	232	240	240	240	240	240	240	240	240	221	240	237					
Média	236ab	240a	240a	240a	240a	240a	240a	240a	240a	230b	240a						

a, b, c Médias seguidas de letra minúscula deferente na linha, diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

A, B Médias seguidas de letra maiúscula deferente na coluna, diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

¹ EA = Estabilidade aeróbia; Tmax = Temperatura máxima alcançada; TempoTmax = Tempo para alcance da temperatura máxima;

² Cont = sem uso de aditivo; LB = *L. buchneri*; Cepa = combo de bactérias; BS1,0 = Benzoato de Sódio 1,0 g/kg MN; BS1,5 = Benzoato de Sódio 1,5 g/kg MN; BS2,0 = Benzoato de Sódio 2,0 g/kg MN; BL2 = *Blend* de ácidos orgânicos 2,0 L/t MN; BL3 = *Blend* de ácidos orgânicos 3,0 L/t MN; BL4 = *Blend* de ácidos orgânicos 4,0 L/t MN; M10 = adição de 10% de milho moído ao WDBS; M20 = adição de 20% de milho moído ao WDBS.

³ T = tratamento, A = armazenamento

6 CONCLUSÕES

Para utilização do WDBS em um prazo de até 10 dias após sua produção na usina, todos os aditivos testados demonstraram eficácia em manter a estabilidade aeróbia e prolongar a vida útil do material em comparação ao WDBS não tratado, estabelecendo-se como boas opções para a conservar o alimento.

Em relação ao armazenamento do WDBS, a conservação sob alta eficiência de vedação (anaerobiose) mostrou-se mais eficiente em preservar a composição nutricional do material após 40 dias de armazenamento. Adicionalmente, os aditivos à base de benzoato de sódio e *blend* de ácidos orgânicos destacaram-se como melhores estratégias para conservação e aumento da estabilidade aeróbia durante esse período.

Recomenda-se a realização de pesquisas futuras para avaliar a deterioração aeróbia do WDBS tratado ao longo de períodos de exposição mais prolongados. Tais estudos podem ajudar a determinar a durabilidade da ação dos aditivos na preservação da vida útil do WDBS.

REFERÊNCIAS

ABRAMS, S. M. *et al.* Preservation of wet distillers grains and its value as a protein source for growing ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 57, n. 3, p. 729-738, 1983.

ADAMS, D. R. *et al.* Evaluation of storage methods for wet distillers grains plus solubles with added forages. **Nebraska Beef Cattle Reports**, p. 9, 2008.

ADDAH, W. *et al.* Effects of chop-length and a ferulic acid esterase-producing inoculant on fermentation and aerobic stability of barley silage, and growth performance of finishing feedlot steers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 197, p. 34-46, 2014.

ALVAREZ, E. *et al.* A preliminary comparative study of conventional and hermetic storage of wet distillers grains with solubles. In: **Proceedings of the 10th International Conference on Controlled Atmospheres and Fumigation in Stored Products**. CAF Permanent Committee New Delhi, India, p. 324-328, 2016.

ALVAREZ, E. *et al.* Storage of WDGS under hermetic and non-hermetic conditions: Effect on sensory properties, microorganisms, mycotoxins and nutritional value. **Journal of Stored Products Research**, v. 80, p. 65-70, 2019.

ANDERSON, J. L. *et al.* Ensiling characteristics of distillers wet grains with corn stalks and determination of the feeding potential for dairy heifers. **The Professional Animal Scientist**, v. 31, n. 4, p. 359-367, 2015.

ANDERSON, J. L. *et al.* Ensiling characteristics of wet distillers grains mixed with soybean hulls and evaluation of the feeding value for growing Holstein heifers. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 6, p. 2113-2123, 2009.

ANTUNES, S. L. **Inclusão de novos coprodutos derivados do processo de produção de etanol de milho em dietas de terminação de bovinos**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba. p. 44. 2020

AOAC – Association of Official Analytical Chemistry. 1990. **Official methods of analyses**. 15th ed. AOAC International, Arlington, USA.

AOAC – Association of Official Analytical Chemistry. 1997. **Official methods of analyses**. 16th ed. AOAC International, Washington, USA.

AOAC – Association of Official Analytical Chemistry. 2000. **Official methods of analyses**. 17th ed. AOAC International, Gaithersburg, USA

BAIRD-PARKER, A. C. Organic acids. **Microbial ecology of foods**, v. 1, p. 126, 1980.

BORTOLETTO, A. M.; ALCARDE, A. R. Dominante nos EUA, etanol de milho é opção, no Brasil, para safra excedente. **Visão Agrícola**, v. 13, p. 135-137, 2015.

BOSUND, I. The action of benzoic and salicylic acids on the metabolism of microorganisms. **Advances in food research**, v. 11, p. 331-353, 1963.

BUCKMASTER, D. R. *et al.* Co-ensiling of wet distiller's grains. In: **2008 Providence, Rhode Island, June 29–July 2, 2008**. American Society of Agricultural and Biological Engineers. p. 1. 2008.

BUCKNER, C. D. *et al.* Nutrient variability for distillers grains plus solubles and dry matter determination of ethanol by-products. **The Professional Animal Scientist**, v. 27, n. 1, p. 57-64, 2011.

BUCKNER, C. D. *et al.* Sampling wet distillers grains plus solubles to determine nutrient variability. **Nebraska Beef Cattle Reports**, p. 48, 2008.

BURHOOP, J. E. *et al.* Impact of Feeding Distillers Grains With or Without Oil Removal As Well As Supplemental Corn Oil on Nutrient Digestibility by Finishing Cattle. **Nebraska Beef Cattle Report**. MP105:105-108.2018.

CALZADA, J.; FRATTINI, C. In spanish: "USDA vision about ethanol use in Argentina" **Informativo semanal de la Bolsa de Comercio de Rosario**. 2015.

CARLSON, Z. E. *et al.* 337 Evaluation of the relative contribution of protein in distillers grains in finishing diets on performance and carcass characteristics. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. suppl_2, p. 158-159, 2016.

CEPEA – Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. **Milho NPR - Indicador Região**. 2020. Disponível em: <https://cepea.esalq.usp.br/br/indicador/milho-npr.aspx>. Acesso em: 25 out. 2023.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Produção de cana-de-açúcar deve crescer 4,4% na safra 2023/24, estimada em 637,1 milhões de toneladas**. 2023. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4982-producao-de-cana-de-acucar-deve-crescer-4-4-na-safra-2023-24-estimada-em-637-1-milhoes-de-toneladas> Acesso em: 17 mai. 2023.

COSTA. I. C, *et al.* Coprodutos da indústria de etanol de milho na alimentação de ruminantes. **Pubvet**. v.12, n.11, a214, p.1-7, 2018.

CRUESS, W. V.; RICHERT, P. H. Effect of hydrogen ion concentration on the toxicity of sodium benzoate to microorganisms. **Journal of Bacteriology**, v. 17, n. 5, p. 363-371, 1929.

DA SILVA, N. C. *et al.* Evaluation of the effects of two *L actobacillus buchneri* strains and sodium benzoate on the characteristics of corn silage in a hot-climate environment. **Grassland Science**, v. 60, n. 3, p. 169-177, 2014.

DA SILVA, T. C. *et al.* The effect of a chemical additive on the fermentation and aerobic stability of high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 12, p. 8904-8912, 2015.

DI LORENZO, N; GALYEAN, M. Uso de subproductos de la producción de etanol en nutrición animal. **4º Jornada Nacional de Forrajes Conservados Ediciones INTA**. p 63-73. 2013.

ETANOL De Cana X Etanol De Milho. **Piracicaba Engenharia Sucroalcooleira**. 06 set. 2019. Disponível em: <https://www.piracicabaengenharia.com.br/etanol-de-cana-x-etanol-de-milho/>. Acesso em: 04 dez. 2023.

FERREIRA, M. *et al.* Dry matter intake, performance, carcass traits and expression of genes of muscle protein metabolism in cattle fed increasing levels of de-oiled wet distillers grains. **Animal Feed Science and Technology**, v. 269, p. 114627, 2020.

FREESE, E.; SHEU, C. W.; GALLIERS, E. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. **Nature**, v. 241, n. 5388, p. 321-325, 1973.

GARCIA, A. D.; KALSCHEUR, K. F. Ensiling wet distillers grains with other feeds. *SDSU Extension Extra Archives*. 127. 2006.

GARCIA, A. D.; KALSCHEUR, K. F. Storage of wet distillers grains. In: **Proceedings of Tri-State dairy Nutrition Conference, Fort Wayne, In., USA**. 2007. p. 111-118.

GARLAND, S. A. *et al.* Evaluation of fractionated distillers grains (high protein and bran plus solubles) on performance and carcass characteristics in finishing diets. Nebraska Beef Cattle Report. MP106: 88-90. 2019.

GARLAND, S. A. **Impact of ethanol process changes on distillers grains for beef cattle**. M.S. Thesis. University of Nebraska, Lincoln. p. 98. 2018.

GUNN, P. J. *et al.* Preservation characteristics of modified wet distillers grains with solubles stored with marginal-quality feedstuffs in laboratory-scale mini silos. **The Professional Animal Scientist**, v. 29, n. 6, p. 671-676, 2013.

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

HART, K. B. *et al.* Quality effects on beef strip steaks from cattle fed high-protein corn distillers grains and other ethanol by-products. **Journal of Animal Science**, v. 97, n. 5, p. 2087-2098, 2019.

JOBIM, C. C.; NUSSIO, L. G. Princípios básicos da fermentação na ensilagem. **Forragicultura– Ciência, tecnologia e gestão de recursos forrageiros. Jaboticabal: Editora FUNEP**, 2013.

JUNIOR, A. S. L. *et al.* Effects of wet distillers bran plus solubles and corn oil in diets containing flint corn grain and citrus pulp for finishing Nellore bulls. **Livestock Science**, v. 255, p. 104774, 2022.

JUNIOR, A. S. L. *et al.* PSXIV-17 Effects of corn bran plus solubles and corn oil on growth performance and carcass traits of finishing bulls. **Journal of Animal Science**, v. 97, n. Supplement_3, p. 436-437, 2019.

KALSCHEUR, K. F. *et al.* Ensiling wet corn distillers grains alone or in combination with soyhulls. **J. Dairy Sci**, v. 85, n. Suppl 1, p. 234, 2002.

KANG, T. W. *et al.* Effects of an esterase-producing inoculant on fermentation, aerobic stability, and neutral detergent fiber digestibility of corn silage. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 2, p. 732-738, 2009.

KIM, Y. *et al.* Composition of corn dry-grind ethanol by-products: DDGS, wet cake, and thin stillage. **Bioresource technology**, v. 99, n. 12, p. 5165-5176, 2008.

KLEINSCHMIT, D. H.; KUNG JR, L. A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 10, p. 4005-4013, 2006.

KUNG JR, L. *et al.* Microbial populations, fermentation end-products, and aerobic stability of corn silage treated with ammonia or a propionic acid-based preservative. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 7, p. 1479-1486, 2000.

KUNG JR, L.; RANJIT, N. K. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 5, p. 1149-1155, 2001.

KUNG JR, L. Understanding the biology of silage preservation to maximize quality and protect the environment. In: **Proceedings, 2010 California Alfalfa & forage symposium and corn/cereal silage conference**. p. 1-2. 2010.

LARA, E. C. *et al.* Changes in the nutritive value and aerobic stability of corn silages inoculated with *Bacillus subtilis* alone or combined with *Lactobacillus plantarum*. **Animal Production Science**, v. 56, n. 11, p. 1867-1874, 2015.

LEHMAN, R. M.; ROSENTRATER, K. A. Aerobic stability of distillers wet grains as influenced by temperature. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 3, p. 498-503, 2013.

LEHMAN, R. M.; ROSENTRATER, K. A. Microbial development in distillers wet grains produced during fuel ethanol production from corn (*Zea mays*). **Canadian journal of microbiology**, v. 53, n. 9, p. 1046-1052, 2007.

LIU, KeShun. Chemical composition of distillers grains, a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 1508-1526, 2011.

LUNDY, E. L.; LOY, D. Ethanol Coproducts for Beef Cattle: The Processes and Products. Iowa Beef Center. **Iowa State University Extension and Outreach fact sheet IBCR 200A**. 2014.

MACDONALD, J. C. Does removing nutrients components from distillers grains affect the feeding value for beef cattle. **22nd Annual Distillers Grains Symposium**, Des Moines – Iowa – United States, 16 – 18 May, 2018.

MACÊDO, A. J. S. *et al.* Microbiologia de silagens: Revisão de Literatura. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinária**, v. 18, n. 9, p. 1-11, 2017.

MAGEE, R. J.; KOSARIC, N. The microbial production of 2, 3-butanediol. In: **Advances in Applied Microbiology**. Academic Press, 1987. p. 89-161.

McDONALD, P. *et al.* **The biochemistry of silage**. 2nd. edn. Marlow: Chalcombe Publication. 1991.

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**, v. 85, p. 1217-1240, 2002.

MILLS, J. A.; KUNG JR, L. The effect of delayed ensiling and application of a propionic acid-based additive on the fermentation of barley silage. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 8, p. 1969-1975, 2002.

MJOUN, K.; KALSCHEUR, K. F.; GARCIA, A. D. Fermentation characteristics and aerobic stability of wet corn distillers grains with solubles ensiled in combination with whole plant corn. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 7, p. 1336-1340, 2011.

MORAN, J. P. *et al.* A comparison of two methods for the evaluation of the aerobic stability of whole crop wheat silage. In: **XI International Silage Conference**. 1996. p. 162-163.

NASEM (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine). **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 8th rev. ed. The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/25806>. 2021

NAVEENA, K. *et al.* Effect of supplementing wet distillers' grains with solubles to maize silage based diet on performance of growing nellore jodipi ram lambs. **Indian Journal of Animal Nutrition**, v. 37, n. 2, p. 106-114, 2020.

NISHINO, N.; HARADA, H.; SAKAGUCHI, E. Evaluation of fermentation and aerobic stability of wet brewers' grains ensiled alone or in combination with various feeds as a total mixed ration. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 6, p. 557-563, 2003.

NISHINO, N.; HATTORI, H. Resistance to aerobic deterioration of total mixed ration silage inoculated with and without homofermentative or heterofermentative lactic acid bacteria. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 13, p. 2420-2426, 2007.

NOFSINGER, G. W. *et al.* An evaluation of chemical methods to extend the allowable storage time of wet distillers' grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 276-279, 1983.

OSHA – Occupational Safety & Health Administration. 2015. OSHA Technical Manual (OTM). Section IV, Chapter 5. **Ethanol Processing**. Disponível em: <https://www.osha.gov/otm/section-4-safety-hazards/chapter-5>. Acesso em: 25 out. 2023.

PAHLOW, G. *et al.* Microbiology of ensiling. **Silage science and technology**, v. 42, p. 31-93, 2003.

PALOWSKI, A. *et al.* Determination of in vitro dry matter, protein, and fiber digestibility and fermentability of novel corn coproducts for swine and ruminants. **Translational Animal Science**, v. 5, n. 2, p. txab055, 2021.

PLAYNE, M. J.; MCDONALD, P. The buffering constituents of herbage and of silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 17, n. 6, p. 264-268, 1966.

PRYCE, J. D. A modification of Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. **Analyst**, Cambridge, v. 94, n. 1125, p. 1151-1152, 1969.

RAJALE, T. *et al.* Separation, recovery and upgrading of 2, 3-butanediol from fermentation broth. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 2023.

RAMIREZ-RAMIREZ, H. A. *et al.* Storage conditions of wet corn distillers' grains with solubles in combination with other feeds and understanding the effects on performance of lactating dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 91, n. 2, p. 331-339, 2011.

REDDY, P. *et al.* CNCPS Fractionations and in-vitro nutrient digestibility of corn dried distiller grains with Solubles from various ethanol plants in Andhra Pradesh. **International Journal of Livestock Research**, v. 7, n. 2, p. 164-171, 2017.

REICH, L. J.; KUNG JR, L. Effects of combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with various lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 159, n. 3-4, p. 105-109, 2010.

SANTOS, W. P. *et al.* The effect of sodium benzoate on the nutritive value of rehydrated sorghum grain silage for dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 256, p. 114267, 2019.

SCHMIDT, P.; NOVINSKI, C.; ZOPOLLATO, M. Carbon absorption in silages: a novel approach in silage microbiology. In: International Silage Conference, XVIII, Bonn, Germany. **Proceedings of the XVIII International Silage Conference. Bonn: Universität Bonn**. p. 20-21. 2018.

SCHMIDT, R. J. *et al.* The development of lactic acid bacteria and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation of alfalfa silage. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 10, p. 5005-5010, 2009.

SINGH, V. *et al.* Modified dry grind ethanol process. **Departments of Agricultural Engineering, University of Illinois at Champaign-Urbana, UILU**, n. 2001-7021, 2001.

SUGIMURA, M. *et al.* Improved 2, 3-butanediol production rate of metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* by deletion of RIM15 and activation of pyruvate consumption pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 22, p. 16378, 2023.

UNEM – União Nacional de Etanol de Milho. **Unem projeta alta de 36% na produção de etanol de milho**. 2023. Disponível em: <https://etanoldemilho.com.br/2023/03/07/unem-projeta-alta-de-36-na-producao-de-etanol-de-milho/> Acesso em: 17 mai 2023.

VASCONCELOS, J. T.; GALYEAN, M. L. Effects of proportions of wet corn gluten feed and distiller's dried grains with solubles in steam-flaked, corn-based diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. **The Professional Animal Scientist**, v. 23, n. 3, p. 260-266, 2007.

VERACINI, J. L. *et al.* Effects of high fat, modified wet, corn distiller's grains plus solubles on beef steer performance and carcass characteristics. **Livestock Science**, v. 157, n. 1, p. 151-161, 2013.

VIGNE, G. L. D. **Gas Production, pressure and carbon dioxide absorption in maize silage**. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal do Paraná. Curitiba. p. 130. 2022.

WANG, F.; NISHINO, N. Ensiling of soybean curd residue and wet brewers grains with or without other feeds as a total mixed ration. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 6, p. 2380-2387, 2008.

WEISS, K.; AUERBACH, H. The effect of different types of chemical silage additives on dry matter losses, fermentation pattern, volatile organic compounds (VOC) and aerobic stability of maize silage. In: **Proceedings of the XVI international silage conference**. 2012. p. 360-361.

WEISSBACH, F.; HONIG, H. About the prediction and control of course of fermentation in the ensilage of green fodder from extensive cultivation. **Landbauforschung Volkenrode**, v. 1, n. 1, p. 10-17, 1996.

WEISSBACH, F. Correction of dry matter content of silages used as substrate for biogas production. In: **Proceedings of the 15th International Silage Conference, US Dairy Forage Research Center, Madison, WI**. 2009. p. 483-484.

WINKLER-MOSER, J. K.; BREYER, L. Composition and oxidative stability of crude oil extracts of corn germ and distillers grains. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 3, p. 572-578, 2011.