

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

Stela Nätzold Pereira

**COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL, PERDAS E ESTABILIDADE  
AERÓBICA DE SILAGENS DE MILHO SUBMETIDAS À DIFERENTES  
PERÍODOS DE ESTOCAGEM**

**PPGZ/UFSM, RS PEREIRA, Stela Nätzold Mestre 2019**

Santa Maria, RS  
2019

**Stela Näetzold Pereira**

**COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL, PERDAS E ESTABILIDADE AERÓBICA DE  
SILAGENS DE MILHO SUBMETIDAS À DIFERENTES PERÍODOS DE  
ESTOCAGEM**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de concentração em Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Zootecnia**.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Julio Viégas

Santa Maria, RS  
2019

Pereira, Stela Naetzold Pereira  
COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL, PERDAS E ESTABILIDADE AERÓBICA  
DE SILAGENS DE MILHO SUBMETIDAS À DIFERENTES PERÍODOS DE  
ESTOCAGEM / Stela Naetzold Pereira Pereira.- 2019.  
87 p.; 30 cm

Orientador: Julio Viégas  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Zootecnia, RS, 2019

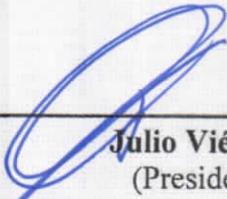
1. Qualidade da silagem 2. Estabilidade a silagem 3.  
Frações proteica e de carboidratos da silagem 4. Efeitos  
do tempo de estocagem na silagem 5. Cinética de  
degradação da silagem I. Viégas, Julio II. Título.

**Stela Näetzold Pereira**

**COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL, PERDAS E ESTABILIDADE  
AERÓBICA DE SILAGENS DE MILHO SUBMETIDAS Á DIFERENTES  
PERÍODOS DE ESTOCAGEM**

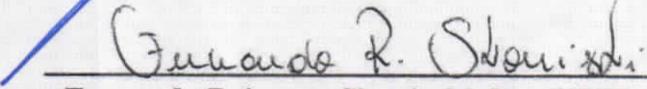
Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de concentração em Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Zootecnia**.

**Aprovado em 15 de março de 2019:**



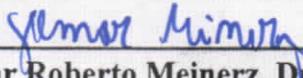
---

**Julio Viégas, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)



---

**Fernando Reimann Skonieski, Dr. (UTFPR)**  
(Videoconferência)



---

**Gilmar Roberto Meinerz, Dr. (UFFS)**

Santa Maria, RS  
2019

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, por me abençoar e iluminar meus passos durante essa caminhada.
  - A todos meus familiares por todo apoio e incentivos prestados em especial ao meu esposo Rodrigo, filho Henrique, mãe Mary, pai Elio, irmãs Liane e Kelen e a minha cunhada e amiga Macleine. Não foi fácil, mas com a ajuda de vocês tudo fica mais leve. A vocês todo meu amor e gratidão!
  - Ao amigo, professor e orientador Dr. Julio Viégas, obrigada pela confiança, compreensão, apoio, ensinamentos e dedicação.
  - Aos Estagiários, Mestrandos, Doutorandos e amigos do setor de Bovinocultura de Leite (GEAPA) de Santa Maria, pela ajuda e dedicação, em especial Tiago, Leonardo, Lídia, Larissa, João, Laura, Ana, Michele, Janaina.
  - Ao professor Gilmar Roberto Meinerz, por todo auxílio prestado na condução do experimento.
  - A todos meus amigos pela amizade, companheirismo e apoio, em especial a Lisiani por todo o auxílio prestado.
  - Aos técnicos do laboratório Clóvis, Gisele e Vitor por toda ajuda e ensinamentos prestados durante a realização das análises.
  - Ao pessoal do LABRUMEN, Prof. Gilberto Vilmar Kozloski, e seus orientados, pela amizade e pela ajuda na realização das análises laboratoriais.
  - Aos demais professores e técnicos do PPGZ-UFSM, pelo convívio e colaboração com a minha formação.
- A toda equipe do laboratório de piscicultura em especial prof. Leila, Ana Betine e Silvino pela ajuda nas análises de amido e preparação das amostras.
- Ao professor Roger Wagner e doutoranda Mariane do laboratório de análise de compostos voláteis e precursores em alimentos (UFSM) da Tecnologia de Alimentos, pela ajuda nas análises ácidos orgânicos.
  - A Universidade Federal de Santa Maria e ao PPGZ por oferecer uma infraestrutura incrível, aos professores e técnicos que foram tão importantes na minha formação, pela oportunidade em fazer parte do seu corpo docente. A CAPES, pela bolsa de estudo concedida durante o mestrado.
  - A todos que, de forma indireta, colaboraram com este projeto, meu muito obrigada.

## RESUMO

### COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL, PERDAS E ESTABILIDADE AERÓBICA DE SILAGENS DE MILHO SUBMETIDAS À DIFERENTES PERÍODOS DE ESTOCAGEM

AUTORA: Stela Nätzold Pereira

ORIENTADOR: Julio Viégas

Objetivou-se avaliar os efeitos na qualidade nutricional, fermentação, parâmetros cinéticos, perdas inerentes aos processos aeróbio e anaeróbio e as frações proteicas e glicídicas das silagens abertas em diferentes tempos de estocagem 45, 90, 180 e 360 dias, que após a abertura permaneceram exposto ao ambiente com temperatura controlada de 25 °C durante 96 horas para avaliação da composição e estabilidade. As estimativas de temperatura, pH, N-NH<sub>3</sub> e MS foram realizadas uma vez ao dia e a avaliação nutricional das silagens foi realizada na abertura e após 96 horas de exposição ao ar. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e quatro repetições cada. A composição nutricional da silagem foi alterada pelo tempo de estocagem assim como pela exposição ao ar, visto que ocorreu um aumento nas frações FDN, FDA, LDA e na produção de efluentes, causando redução das frações solúveis dos carboidratos, enquanto que a MS, cinzas, perdas e a RMS não foram afetadas pelo tempo de estocagem e de exposição. A concentração do ácido láctico, acético e o pH apresentaram efeito quadrático com maiores níveis com 233, 162 e 264 dias, reduzindo posteriormente, enquanto que o ácido propiônico aumentou progressivamente com o tempo de estocagem. Em relação ao N-amoniaco foi observado aumentou na concentração com o tempo de estocagem e redução com o tempo de exposição das silagens ao ar. Também observamos que o tempo de estocagem alterou a composição nitrogenada das silagens, com o aumento do NS, NNP e a redução da proteína verdadeira, enquanto que o NIDA não foi afetado pelos tratamentos. Para os parâmetros cinéticos de degradação das silagens observamos efeitos quadráticos para a produção de gás com maiores níveis aos 310 dias e a fração A apresentou decréscimo e sua taxa de degradação B aumentou ao longo do tempo de armazenamento. Os demais parâmetros não foram afetados ( $P > 0,05$ ). O teor de amido e a digestibilidade da MS apresentaram efeitos quadráticos e o NDT aumentou, enquanto que a estimativa de produção de leite, energia líquida para lactação, e digestibilidade do FDN não foi afetada pelo tempo de estocagem. As temperaturas das silagens aumentaram independente do tempo de estocagem e de exposição ao ar em que se encontravam. A perda da estabilidade ocorreu antes das 24 horas de exposição ao ar, em todos os tempos de estocagem avaliados. À medida que aumenta o tempo de estocagem, observa-se redução na qualidade das silagens, devido à elevação na produção de efluentes, nos teores de N-amoniaco, no NNP, na parede celular e nas perdas de proteína verdadeira e carboidratos solúveis. O tempo de exposição da silagem ao ambiente deve ser reduzido ao máximo, visto que o pH e temperatura aumentaram com o passar das horas de exposição, causando maior deterioração aeróbia do material ensilado.

**Palavras-chave:** Perdas de MS. pH. Qualidade da silagem. Fracionamento de carboidratos. Tempo de armazenamento. Temperatura.

## ABSTRACT

### NUTRITIONAL COMPOSITION, LOSSES AND AEROBIC STABILITY OF CORN SILGAINS SUBMITTED AT DIFFERENT STORAGE PERIODS

AUTHOR: Stela Nätzold Pereira

ADVISOR: Julio Viégas

This study aimed to evaluate the effects on nutritional quality, fermentation, kinetic parameters, losses inherent to the aerobic and anaerobic processes and the protein fractions and glicídicas of silages open at different times of storage 45, 90, 180 and 360 days after the opening remained exposed to the environment with controlled temperature of 25 °C during 96 hours to evaluate the composition and stability. The estimates of temperature, pH, N-NH<sub>3</sub> and MS were performed once a day and the nutritional assessment of the silages was performed at the opening and after 96 hours of exposure to the air. The experimental design was a completely randomized block design, with four treatments and four replicates each. The nutritional composition of the silage was changed by the time of storage as well as by exposure to air, since there was an increase in the fractions NDF, ADF, Lda and the production of effluent, causing a reduction of soluble fractions of carbohydrates, while the MS, ash, losses and the RMS were not affected by storage time and exposure. The concentration of lactic acid, acetic acid and the pH showed a quadratic effect with higher levels with 233, 162 and 264 days, reducing later, while the propionic acid increased progressively with the time of storage. In relation to the N-ammoniacal nitrogen concentration was observed increased with storage time and reducing the exposure time of silage to air. We also observed that the time of storage has changed the composition of the silages, fertilization with the increase of the NS, NNP and the reduction of true protein, while the NIDA was not affected by treatments. For the kinetic parameters of degradation of the silages observed quadratic effects for the production of gas with higher levels to 310 days and the fraction presented decrease and its degradation rate of B increased throughout the storage time. The other parameters were not affected ( $P>0.05$ ). The starch content and the digestibilidade of MS showed quadratic effects and the TDN increased, while the estimate of milk production, net energy for lactation, and digestibility of NDF was not affected by storage time. The temperatures of the silages increased regardless of the time of storage and exposure to air in which they were. The stability loss occurred before the 24 hours of exposure to air, at all times of storage evaluated. To the extent that increases the storage time, we observed a reduction in quality of silages, due to the increase in the production of effluent, the levels of N-ammoniacal nitrogen, the NNP, the cell wall and the loss of true protein and soluble carbohydrates. The time of exposure of the silage to the environment should be reduced to the maximum, since the pH and temperature increased with the passing of the hours of exposure, causing greater aerobic deterioration of the silage material.

**Keywords:** Loss of MS. pH. Quality of silage. Fractionation of carbohydrate. Storage time. Temperature.

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO 1

Figura 1- Efeito do tempo da estocagem nas frações fibrasas de silagens de milho AG 8690..	55
Figura 2- Efeito do tempo de estocagem nas concentrações dos ácidos orgânicos e do pH de silagens de milho AG 8690 .....	55

### ARTIGO 2

Figura 1- Perdas de matéria seca em silagens de milho submetida a diferentes tempos de estocagem e exposta ao ambiente por 96 horas .....	71
Figura 2- a) Temperaturas (barras) e do pH (linha); b) Teores matéria seca (barra) e do N-amoniacoal (linha), de silagens de milho estocadas por 45 dias e exposta ao ar por um período de até 96 horas. ....	73
Figura 3- a) Temperaturas (barras) e do pH (linha); b) Teores matéria seca (barra) e do N-amoniacoal (linha), de silagens de milho estocadas por 90 dias e exposta ao ar por um período de até 96 horas .....	73
Figura 4- a) Temperaturas (barras) e do pH (linha); b) Teores matéria seca (barra) e do N-amoniacoal (linha), de silagens de milho estocadas por 180 dias e exposta ao ar por um período de até 96 horas .....	74
Figura 5- a) Temperaturas (barras) e do pH (linha); b) Teores matéria seca (barra) e do N-amoniacoal (linha), de silagens de milho estocadas por 360 dias e exposta ao ar por um período de até 96 horas .....	74

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Tabela 1- Composição nutricional, proteica e estrutural da planta de milho do híbrido AG 8690, utilizada na confecção das silagens .....	52
Tabela 2- Valor nutritivo da silagem de milho AG 8690 com distintos tempos de estocagem.. .....	533
Tabela 3- Volume de produção de gás e os parâmetros cinéticos de degradação das silagens de milho AG 8690 com distintos tempos de fermentação. ....	544
Tabela 4- Valores de nitrogênio total (NT) e da composição das frações proteicas das silagens de milho AG 8690 com diferentes tempos de estocagem. ....	566
Tabela 5- Carboidratos totais (CHO), carboidratos não fibrosos (CNF) e frações dos carboidratos proposto por Lanzas et al. (2007), em silagens de milho com diferentes períodos de estocagem.....	57
Tabela 6- Parâmetros utilizados para a simulação da dieta e os teores de digestibilidade <i>in vitro</i> da MS (DIVMS) e da FDN (DIVFDN), nutrientes digestíveis totais (NDT) e energia líquida para lactação (EL <sub>l</sub> ) das silagens com diferentes tempos de estocagem e a estimativa da produtividade de leite.....	58

### ARTIGO 2

Tabela 1- Composição química e o valor nutritivo de silagens de milho AG 8690 com diferentes períodos de estocagem no momento da abertura (0 horas) e com 96 horas de exposição ao ar.....	66
Tabela 2- Perdas do processo fermentativo e a concentração de ácidos orgânicos das silagens de milho AG 8690 submetida a diferentes tempos estocagem.....	69

## SUMÁRIO

<b>1 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>11</b>
1.1 INTRODUÇÃO.....	11
1.2 HIPÓTESES .....	12
1.3 OBJETIVOS .....	12
1.3.1 Objetivo geral.....	12
1.3.2 Objetivos específicos.....	13
<b>2 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 PRODUÇÃO DE MILHO E SUA ENSILAGEM .....</b>	<b>14</b>
2.1.1 Processo Fermentativo da Silagem de Milho .....	15
2.2 OS EFEITOS DO TEMPO DE ESTOCAGEM .....	17
2.3 ESTABILIDADE DA SILAGEM.....	20
2.3.1 Perdas anaeróbicas e aeróbicas nas silagens.....	21
2.4 DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> GÁS NA SILAGEM.....	23
2.5 FRACIONAMENTO DO NITROGÊNIO E CARBOIDRATOS DA SILAGEM.....	25
<b>3 ARTIGO 1- COMPOSIÇÃO QUÍMICA, PARÂMETROS CINÉTICOS E FRAÇÕES PROTEICAS E DE CARBOIDRATOS DE SILAGENS DE MILHO SUBMETIDAS A DIFERENTES TEMPOS DE ESTOCAGEM .....</b>	<b>28</b>
<b>4 ARTIGO 2- AVALIAÇÃO DAS PERDAS E ESTABILIDADE DA SILAGEM DE MILHO AO LONGO DO TEMPO DE ESTOCAGEM DE EXPOSIÇÃO AO AR.....</b>	<b>59</b>
<b>5 DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>80</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>82</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>

# 1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

## 1.1 INTRODUÇÃO

O processo de ensilagem, quando comparado com outros processos de conservação de forragens, é o que disponibiliza a maior quantidade de nutrientes do material original (PAHLOW et al., 2003). No Brasil, a silagem de milho é o volumoso conservado mais utilizado para vacas em lactação (BERNARDES e REGO, 2014), se destacando pelas suas características de qualidade, facilidade de fermentação, boa aceitação pelos animais, além do elevado teor de energia por quilograma de matéria seca e rendimento por área (OLIVEIRA e SOBRINHO, 2007). O processo de ensilagem consiste na conservação da forragem, através da fermentação dos açúcares em ácidos orgânicos que reduzem o pH, inibindo o crescimento de micro-organismos indesejáveis em ambiente anaeróbio (JOBIM et al., 2007).

A estabilização das silagens com a queda do pH ocorre entre 3 e 7 dias, no entanto, períodos entre 21 e 30 dias têm sido amplamente divulgados como adequados para a estabilização da fermentação (KUNG et al., 2013). No entanto, vários trabalhos corroboram que a fermentação prossegue além de 7 dias, com aumentos significativos nas concentrações de produtos de fermentação (KLEINSCHIMIT e KUNG, 2006; JUNGES et al., 2013), alteração na microbiologia da silagem (STORM et al., 2010), mudanças na composição e qualidade da silagem (SARICICEK et al., 2016). O processo contínuo de fermentação ao longo do armazenamento ficou evidente nos trabalhos de Der Bedrosian et al. (2012) e Young et al. (2012), que verificaram aumentos nos teores de nitrogênio amoniacal e proteína solúvel ao longo do tempo de estocagem da silagem de milho. Esses aumentos estão correlacionados a níveis crescentes de proteólise e consequentemente maior disponibilidade da fração amido. Hoffman et al. (2011) apontaram as proteínas do endosperma, especialmente as prolaminas, que atuam como fator inibitório à digestão do amido.

A silagem de milho é particularmente susceptível à deterioração aeróbia (WEINBERG et al., 2011). Está, por sua vez, é promovida pela ação de micro-organismos que degradam o ácido lático, causando o aumento do pH da silagem e permitindo o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis. De modo prático, esta deterioração é observada pelo aparecimento de mofos e elevação da temperatura, sendo que esta deterioração pode ocorrer antes mesmo da abertura dos silos por problemas de vedação, mas também durante o transporte da silagem e alimentação dos animais (WILKINSON e DAVIES, 2012). Estas

alterações que se tornam visíveis nas silagens são indicadoras de perdas reais muito maiores que estão ocorrendo na massa ensilada, sendo que a deterioração aeróbia pode gerar perdas de matéria seca (MS) de 10 a 20 %, podendo chegar a 40 % em casos em que as silagens não tenham sido manejadas corretamente (WOOLFORD, 1990). Também podemos observar as perdas que ocorrem ao longo do período de ensilagem na forma de efluente e gases, as quais podem chegar a 33 % da massa ensilada devendo ser evitadas para não proporcionar prejuízos ao processo fermentativo (MCDONALD et al., 1991), além de causar graves prejuízos econômicos aos produtores.

Por isso, a compreensão das alterações decorrente do longo período de estocagem na composição da silagem e na dinâmica das perdas tornam-se importantes para otimizar longos tempos de armazenamento, minimizando assim, os erros nas formulações das dietas e a deterioração do material ensilado. Neste sentido, o trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos na qualidade nutricional, fermentativa, parâmetros cinéticos, perdas inerentes ao processo aeróbio e anaeróbio e as frações proteicas e glicídicas das silagens de milho utilizadas com diferentes tempos de estocagem.

## 1.2 HIPÓTESES

Silagem estocada em diferentes períodos sofre alteração na sua composição química e nos parâmetros fermentativos.

Silagem exposta ao ar por diferentes períodos após abertura do silo aumenta a deterioração do material ensilado.

## 1.3 OBJETIVOS

### 1.3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos na qualidade nutricional, fermentação, parâmetros cinéticos, perdas inerentes aos processos aeróbio e anaeróbio e as frações proteicas e glicídicas das silagens de milho submetidas à diferentes tempos de estocagem.

### **1.3.2 Objetivos específicos**

Quantificar as mudanças ocorridas nas silagens de milho armazenadas e expostas ao ambiente por diferentes tempos.

Avaliar os efeitos do tempo de estocagem sobre as perdas e as frações de proteína e carboidratos das silagens de milho.

Avaliar os efeitos do tempo de exposição ao ar após a abertura dos silos sobre a estabilidade aeróbia e deterioração do material ensilado.

## 2 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

### 2.1 PRODUÇÃO DE MILHO E SUA ENSILAGEM

O milho é produzido em quase todos os continentes, e possui uma grande importância econômica caracterizada pelas diversas formas de sua utilização, que vão desde a alimentação animal e humana, até o uso para combustíveis e confecção de embalagens pela indústria. Diferentes cultivares forrageiras podem ser ensiladas, desde que tenha as características que permita que ocorra uma boa fermentação, como o teor de matéria seca (MS), população epifítica, capacidade tamponante e a concentração de carboidratos solúveis, estas variáveis influenciam fortemente a qualidade da silagem, sendo que a combinação desses fatores determinará o potencial desta cultura para silagem (SANTOS e ZANINE, 2006).

Por isso, a planta de milho é considerada ideal para ensilagem, pois, ao ser colhida com maturidade adequada, apresenta características que favorecem a fermentação, como: teor de matéria seca (MS) entre 30 % e 35 %, com no mínimo, 3 % de carboidratos solúveis (CS) na matéria verde e baixa capacidade tamponante (NUSSIO et al., 2001). Além disso, a cultura de milho tem alta produtividade com aproximadamente 20 toneladas de MS por hectare o que contribui para a diluição de custos de implantação (PAZIANI et al., 2009). Muck (2010), relata que existem diversos fatores nos métodos de ensilagem que podem afetar a qualidade da silagem, como a forma de colheita, tamanho de partícula, compactação, fechamento do silo, presença de oxigênio e o processo fermentativo que é influenciado pelo poder tampão, matéria seca, carboidratos solúveis e a atividade microbiana.

A população epifítica da planta é responsável pela produção de ácido láctico e consequente acidificação do meio. A queda do pH permite que ocorra a paralisação do metabolismo da planta, dos micro-organismos deterioradores e das próprias bactérias responsáveis pela fermentação (MCDONALD et al., 1991). Ensilagem é um método de conservação da forragem úmida para alimentação animal, sendo realizada através fermentação láctica. As bactérias do ácido láctico convertem carboidratos solúveis em água (açúcares) em ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico, causando a queda do pH, e a preservação do valor nutritivo do material ensilado, no entanto, para que isso ocorra deve ser criado um ambiente de anaerobiose (WEIMBERG e CHEN, 2013).

Uma vez que a grande importância na confecção da ensilagem está relacionada à estacionalidade na produção de pastagens, período de escassez de alimentos ou pela variação

causada de acordo com o seu estágio vegetativo da quantidade e qualidade da forragem fornecida para animais em pastejo, sendo que a silagem é a principal fonte de volumoso conservado para alimentação dos animais. Da mesma forma, a silagem de milho é muito utilizada como fonte de volumoso para animais confinados, e o seu valor nutritivo é resultado da espécie forrageira utilizada, do correto manejo agrônomo da cultura, das tecnologias aplicadas durante todo o processo de conservação e da qualidade do processo fermentativo (OLIVEIRA et al., 2010).

Além das características apresentadas acima, a silagem de milho é recomendada pelas suas características de qualidade, facilidade de fermentação do silo e boa palatabilidade, sendo bem apreciado pelos animais, e possuir bons rendimentos (OLIVEIRA e SOBRINHO, 2007). Devido a isso a correta aplicação das práticas de ensilagem resulta no adequado processo fermentativo com manutenção do valor nutritivo da massa ensilada até o fornecimento aos animais, demonstrando ser uma técnica útil e rentável.

### **2.1.1 Processo Fermentativo da Silagem de Milho**

De acordo com Wilkinson e Davies; (2012) o processo de ensilagem pode ser descrito em quatro fases, de acordo com A fase 1, aeróbica que se inicia no momento do corte até anaerobiose do silo, (2) a fase de fermentação, (3) é fase da estabilidade e do armazenamento no silo e (4) a fase de abertura de silo, exposição ao oxigênio e de fornecimento aos animais. O processo fermentativo da silagem consiste na fase dois, onde com a ausência de oxigênio, ocorre a fermentação de carboidratos solúveis, o qual resulta em diversos produtos finais, em última análise, resultando na preservação do material ensilado. Sendo que os principais componentes utilizados na avaliação do processo fermentação da silagem são: o pH, teores de MS, nitrogênio amoniacal, e a quantificação da produção de ácidos orgânicos. No entanto, existem outros componentes importantes que são quantificados nas silagens, como as micotoxinas, alguns compostos nitrogenados (PAHLOW et al., 2003) e a atividade microbiana da fermentação (MACÊDO, 2017).

Segundo o estudo de Muck (2010), podemos classificar a atividade microbiana, de duas formas: micro-organismos desejáveis, benéficos ao processo de conservação das características nutricionais da forragem, como as bactérias ácido lácticas. E os micro-organismos indesejáveis, como os clostrídios, enterobactérias, mofos e leveduras, que afetam negativamente a qualidade da silagem. O ecossistema microbiano da silagem é dominado

pelas bactérias ácido láctico (BAL), possui três grupos homofermentativa obrigatória, heterofermentativa facultativa, e heterofermentativa obrigatória (MUCK, 2010). As bactérias homofermentativa produzem apenas ácido láctico, onde 1 mol de glicose gera 2 moles de ácido láctico e bactérias heterofermentativa produzem diversos produtos, onde 1 mol glicose resulta 1 mol ácido láctico, CO<sub>2</sub> ou etanol e ácido acético (STORM et al., 2010).

Enquanto que Macêdo (2017) em uma revisão sobre microbiologia da silagem relata seis principais micro-organismos, que atuam no processo fermentativo, sendo estas as bactérias do ácido láctico e do ácido acético, enterobactérias (ENT), clostrídios, leveduras, fungos filamentosos. E os principais gêneros apresentadas pelas BAL de micro-organismos que atuam na fermentação da silagem são: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *enterococcus*, *streptococcus*, *leuconostoc* e o composto mais metabolizável é o ácido láctico em silagem. (MCDONALD et al., 1991).

O teor de matéria seca apresenta bastante influencia no processo fermentação de ensilagem, uma vez que o BAL são as principais bactérias responsáveis pela fermentação e necessitam de umidade para o seu crescimento e a reprodução (HU et al. 2009). Existem muitos fatores que afetam a comunidade microbiana da silagem, de acordo com Guan et al. (2018), estudando os efeitos do ambiente e do clima sobre os micro-organismo, observou que a chuva e umidade afetaram a comunidade de bactérias epífitas da forrageira de milho e a temperatura mostrou influencia na quantidade de espécies bacterianas durante a ensilagem. No entanto esses efeitos do clima podem ser minimizados com a realização de adequado processo de ensilagem, com isso reduz o impacto sobre a qualidade da silagem.

Dessa forma Kung Jr. et al. (2018), propõe algumas alternativas de avaliação do processo fermentativo da silagem evitando custos com análises, uma técnica é através do odor e coloração, a silagem não deve apresentar cheiro forte, devido o ácido láctico o principal produto da fermentação, ser quase inodoro. Porém, a maioria das silagens tende a ter um odor levemente ácido de vinagre e coloração amarelada, devido a presença de ácido acético, sendo que este ácido é o segundo mais produzido na silagem e tem alta volatilização. Contudo silagem com excesso de ácido acético deixa uma sensação de ardor nos olhos e nariz, além do cheiro de vinagre, cor amarela.

As silagens que apresentam cheiro doce e frutado são associadas a um alimento estável e bem fermentado, que não é verdade, já que estes cheiros ocorrem devido elevada concentração de álcool (etanol) produzidas principalmente por leveduras, mas também por muitas bactérias (MCDONALD et al., 1991). De acordo com estudo de Kung Jr et al. (2018),

relatou valores de referência para que ocorra um adequado processo de fermentação na silagem de milho são: a matéria seca de 30 a 40 %, pH de 3,7 a 4,0, ácido lático de 3 a 6 % ácido acético de 1 a 3 %, ácido propiônico menor 0,1 %, butirico igual a zero, etanol de 1 a 3 % MS e N-amoniaco com valores entre 5 a 7 % em NT.

## 2.2 OS EFEITOS DO TEMPO DE ESTOCAGEM

A estabilização das silagens com a queda do pH ocorre entre 3 e 7 dias, no entanto, períodos entre 21 e 30 dias têm sido amplamente divulgados como adequados para a estabilização da fermentação (KUNG JR et al., 2013). Em pesquisas mais recentes demonstram que a fermentação continua por muito mais tempo na silagem de milho integral Der Bedrosian et al. (2012), avaliando até 150 dias e Saricicek et al. (2016), estudando em períodos de estocagem até 202 dias, relataram declínio do pH ao longo do tempo de armazenamento. Além disso foi possível observar alteração nos produtos de fermentação como o aumento gradual concentração dos ácidos lático e acético à medida que a duração do armazenamento progrediu. Santos et al. (2016), avaliando tempo de estocagem em silagem de alfafa por 360 dias, relataram que o *Lactobacillus buchneri* permanece ativo por períodos prolongados, mesmo em pH baixo, devido a presença de 1,2-propanodiol aos 180 dias fermentação.

Além destas alterações, há evidências de mudanças na qualidade nutricional dos alimentos durante a processo fermentativo da silagem, uma vez que também existem enzimas tolerantes ao pH que podem realizar hidrólise de partículas de fibra, colaborando para aumento da disponibilidade dos carboidratos solúveis na forragem (DER BEDROSIAN et al., 2012). Então, o período de armazenamento, por sua vez, com relação à qualidade silagens, assume enorme importância. Sendo que as principais alterações bioquímicas que ocorrem durante os períodos de armazenamento descritas na literatura são a hidrólise de prolaminas e hemicelulose. Sendo que a hemicelulose é o que possui maior taxa de degradação, dentre os componentes do FDN (MASON e STUCKEY, 2016). Devido essa maior digestão ocorre aumento no valor nutricional do material armazenado por longos períodos, devido a solubilização parcial da hemicelulose (DER BEDROSIAN et al., 2012; HALLADA et al., 2008).

No entanto esse efeito sobre a composição estrutural da silagem é contraditório como relata Junges et al. (2013) avaliando silagem de milho com 120 dias armazenamento não observou efeito nos teores de FDN e hemicelulose. De acordo com Der Bedrosian et al.

(2012) a razão para a divergência entre os estudos é desconhecida, mas podem ser atribuídas ao período de maturação, tipo de híbridos ou técnica utilizada para medir os teores destes componentes nas silagens. Herrmann et al. (2011) relataram redução de 5,8 % nos teores de FDN, em silagens armazenadas por 365 dias. Este efeito pode ser considerado positivo para o processo de ensilagem, devido ocorrer uma maior disponibilidade de carboidrato solúvel para que ocorra a fermentação e aumentando a ingestão de silagem.

Outra alteração importante observada na composição da silagem foi que degradabilidade do amido progrediu de forma constante ao longo do tempo de armazenamento de acordo com estudos de Ferraretto et al. (2014), na silagem de milho com 360 dias e Hoffman et al. (2011) com 240 dias armazenamento. Esses autores justificam que o aumento em digestibilidade é causada pela quebra da prolamina, que é um constituinte da matriz proteica (HOFFMAN et al., 2011), visto que os pontos de menor presença de prolamina no grão de milho foram relacionados com as maiores taxas de degradabilidade de amido no rúmen. As prolaminas são proteínas que formam a matriz proteica que cercam o grânulo de amido (SIMPSON, 2001).

A prolamina possui característica hidrofóbica e com isso a sua matriz proteica representa um bloqueio, limitando o acesso de enzimas ao amido. Por isso que a compreensão dos efeitos de período prolongado de ensilagem sobre a digestibilidade do amido permite que produtores de leite e nutricionistas otimizem dietas para reduzir os problemas causados pela baixa disponibilidade de amido sobre a produção leite (FERRARETTO et al., 2014). Nesse sentido, tem se observado relação positiva entre o tempo de armazenamento e a digestibilidade do amido da silagem de milho, em especial da fração amido (DER BEDROSIAN et al., 2012; HOFFMAN et al., 2011).

De acordo com Der Berdrosian et al. (2012) as alterações na degradabilidade do amido podem ocorrer devido ao tipo de híbrido e a maturidade da matéria seca no momento da colheita. Segundo Kung Jr et al. (2013) quando as vacas passam a receber silagens “novas”, ou seja, silagens fermentadas por períodos curtos, apresentam menor produtividade. Provavelmente isto ocorre porque o aporte total de energia líquida consumida pelos animais diminui quando as silagens mais recentes passam a compor a dieta, devido a sua menor digestibilidade em relação às silagens estocadas por longos períodos.

Outro efeito do tempo de armazenamento que fica bem evidente na literatura são os aumentos nos teores de proteína solúvel e a concentração de nitrogênio amoniacal, como observaram Naeini et al. (2014) em silagem de sorgo com 120 dias, Santos et al. (2016)

trabalhando com silagem de alfafa com 360 dias, Hoffman et al. (2011) e Der Berdrosian et al. (2012) avaliaram silagem de milho com 360 dias e Ferraretto et al. (2014) 240 dias de estocagem. Esses dados confirmam a ocorrência de proteólise continuada durante a período de fermentação das silagens, mesmo sob condições de baixo pH durante armazenamento, algumas enzimas proteolíticas dos micro-organismos da massa ensilada ainda estão ativas, degradando o material, especialmente as prolaminas revestindo os grãos e aumentando a quantidade de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>).

O aumento da solubilidade da proteína em tampão borato-fosfato, sugere que a proteínas da planta, tornou-se menos hidrofóbica com o avanço do tempo de estocagem, esses aumentos estão correlacionados as maiores ocorrências de proteólise e com isso ocorrerá uma maior disponibilidade da fração amido. Esses resultados estão de acordo com Heron et al. (1989) relataram que algumas enzimas proteolíticas continuavam ativas mesmo em condição ácida e de pH baixo em extrato de azevém. Alguma proteólise que ocorre durante o armazenamento prolongado também pode vir de fontes microbianas, como algumas bactérias ácidas (BAL) são metabolicamente ativas na silagem por muito tempo (KLEINSCHMIT e KUNG, 2006). Com o aumento no tempo de estocagem, os teores de proteína demonstraram comportamento quadrático na média dos tratamentos.

Segundo Der Bedrosian et al. (2012), este aumento nos teores de proteína da dieta, poderia ser reflexo da maior quantidade de nitrogênio solúvel, resultante da intensa proteólise ocorrida durante o tempo de fermentação. Segundo estes autores, mesmo em condições de pH baixos durante a estocagem, algumas enzimas proteolíticas dos micro-organismos da massa ensilada ainda estão ativas, degradando o material, sobretudo as prolaminas de recobrimento dos grãos, e aumentando a quantidade de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>). Young et al (2012) também observaram esta mesma tendência em silagens de milho armazenadas por longos períodos.

Em relação aos efeitos do tempo de estocagem sobre os micro-organismos presente na silagem, Junges (2014) observaram diminuição exponencial população de leveduras e das bactérias lácticas (BAL), ao longo do tempo de armazenamento, variando de 5,9 para 3,4 log ufc/g e 8,9 para 4,0 log ufc/g para os dias 3 e 570 de armazenamento respectivamente. Essa redução é considerada benéfica uma vez que as leveduras contribuem para as perdas de matéria seca na forma de dióxido de carbono. A exposição prolongada aos produtos de fermentação com ação antifúngica, em ambiente anaeróbico e ácido, como o ácido acético é possivelmente a explicação para a redução contagens de leveduras ao longo da fermentação

de silagens bem conservadas. Enquanto que Boudra e Morgavi (2008) avaliando o efeito do tempo de estocagem (3 e 6 meses), observaram que o incremento no tempo de estocagem pode ser uma forma de restringir algumas toxinas de *Fusarium* em silagens contaminadas.

### 2.3 ESTABILIDADE DA SILAGEM

A estabilidade aeróbia da silagem é definida como sendo a resistência da massa de forragem à deterioração após a abertura do silo, ou seja, a rapidez que ocorre decomposição do material ensilado, após abertura do silo e contato com ar (JOBIM et al., 2007). O termo de estabilidade aeróbia também pode ser conceituado como o tempo necessário para que ocorram mudanças na temperatura do silo, variando de poucas horas a semanas (SIQUEIRA, 2005). No entanto, Kung Jr et al. (2003), determinaram que o aumento em 2 °C, na temperatura da silagem exposta ao ar, em relação ao ambiente, como medida de rompimento da estabilidade aeróbia.

Após a abertura do silo, estabelece uma fase crítica do processo de ensilagem, pois o material fica exposto novamente ao oxigênio, ou seja, em condição de aerobiose, com isso começa a ocorrer a degradação de alguns compostos, como os açúcares solúveis restantes e ácido lático produzidos no processo de fermentação, afetando negativamente o valor nutritivo do material ensilado. Segundo Phillip e Feller (1992) relatam que os principais parâmetros que mais afetam na estabilidade da silagem são os teores de carboidratos solúveis, temperatura, população de fungos e a concentração de ácidos orgânicos, principalmente com diminuição do ácido lático conseqüentemente do pH. O ácido lático pode ser consumido por micro-organismos deterioradores e alguns ácidos mais fracos, como os ácidos acético e propiônico podem melhorar a estabilidade aeróbia da silagem (MUCK, 2010).

Outro fator que pode influenciar na estabilidade aeróbica é a capacidade de tamponamento da forragem, ou seja, a sua resistência a mudança de pH, afetando negativamente a conservação do material ensilado, com isso após abertura dos silos a deterioração ocorre de forma mais rápida e intensa (PITT et al., 1991). Em relação aos efeitos dos micro-organismos sobre a estabilidade da silagem, ocorre primeiramente a ação de leveduras, em seguida, por bactérias aeróbias e por último, por fungos filamentosos. No entanto, em condições de campo a deterioração da silagem pode ser facilmente identificada pela elevação da temperatura do material ensilado (JOBIM et al., 2007).

A deterioração aeróbia da silagem tem relação direta com a produção de leveduras e

fungos, o qual depende de condições físicas e químicas da silagem, como presença de oxigênio e substrato (MUCK et al., 1991). As leveduras dos gêneros *Cândida e Hansenula*, produzem dióxido de carbono pela degradação dos açúcares, resultando em perdas de matéria seca, ainda podem fermentar o ácido lático, causando o aumento do pH criando condições para o crescimento de fungos e bactérias indesejáveis durante a fase de utilização da silagem. Com o decorrer do tempo a deterioração continua aumentando o valor de pH e outros micro-organismos continuam o processo de degradação da silagem (SÁ NETO et al., 2013). A perda de estabilidade aeróbia nas silagens normalmente ocorre devido ao aumento de temperatura e mudanças nos valores do pH. O acúmulo de temperatura após a abertura do silo é consequência da alta atividade dos fungos filamentosos, leveduras e bactérias aeróbias (BERNARDO et al., 2008). O processo de respiração dos micro-organismos aeróbios pode ser considerado como um dos principais fatores que afetam a qualidade das silagens (GUIM et al., 2002).

De acordo com Junges (2014) avaliando silagem de milho armazenada durante 570 dias, notou que silagens armazenadas por longos períodos são mais estáveis quando são expostas ao ar, em função da diminuição da população de leveduras, e também do aumento no teor de ácido acético ao longo do tempo. Além disso, o mesmo autor relata que ocorreu um aumento de 0,4 h na estabilidade até 110 dias de estocagem, após este período ocorreu à estabilização.

### **2.3.1 Perdas anaeróbicas e aeróbicas nas silagens**

Durante o processo fermentativo da silagem na fase anaeróbica ocorre uma série de processos que podem causar perdas de nutrientes através de efluentes e gases, que são indesejáveis e provocarem a redução na qualidade da silagem, devendo ser minimizado ao máximo. Essas perdas anaeróbicas que são causadas por inadequada conservação dos materiais, podem chegar a 40 % (MCDONALD et al., 1991). Para garantir uma boa eficiência do processo de conservação da silagem é importante que tenhamos um adequado controle de perdas durante o processo de ensilagem (REIS et al., 2014). De acordo com estudos de Muck (2010), relata a faixa de perdas típicas de matéria seca das silagens por fase de armazenamento, onde fase de enchimento estimasse uma perda de 1-2 %, fase fermentação ativa 1-4 %, perdas de efluentes 0-2 %, na fase de armazenamento após o período de fermentação 1-10 %, fase de fornecimento animais 1-10 %.

De acordo com Weimberg e Chen (2013) estudando longos períodos de armazenamento na silagem de milho e trigo verificaram aumento das perdas de MS, atingindo nível máximo após 90 dias de armazenamento, indicando uma provável estabilização do processo. Com isso percebemos que as perdas de MS, como os demais processos bioquímicos e microbiológicos continuam ativos nos períodos prolongados de armazenamento, inferindo atividade microbiana e enzimática, embora em menor intensidade que nos períodos iniciais de armazenamento.

A determinação das perdas ocorrida na ensilagem pode ser realizada através da quantificação do desaparecimento de matéria seca (MS) ou energia durante o processo de ensilagem. Em relação aos períodos de armazenamento mais longos da silagem as maiores perdas estão relacionadas com as fermentações secundárias, normalmente causada por bactérias heteroláticas (MCDONALD et al., 1991). No entanto, Borreani et al. (2018), relatam diferentes perdas observada no processo fermentativo da silagem, de acordo com o tipo de micro-organismo atuante, como as bactérias ácidos lácticas (BAL) do tipo homofermentativa, não apresenta perdas de matéria seca (MS), e 0,7 % de perdas de energia bruta, enquanto que as heterofermentativas, são observadas perdas de 24,80 % MS e 2,70 % de energia. As enterobacterias, clostrídios e leveduras têm 17,00, 51,10 e 48,90 % perdas de MS e 11,10, 18,40 e 0,20 % de perdas energia respectivamente. Essas perdas de matéria seca e dos nutrientes das silagens causam graves prejuízos econômicos aos produtores, diminuindo a palatabilidade do material ensilado além de aumentar o risco de efeitos negativos no desempenho e saúde dos animais (KUNG JR et al., 1998).

Quando o material ensilado entra em contato com o oxigênio os micro-organismos aeróbicos começam a crescer, degradando inicialmente substratos solúveis e depois compostos mais complexos. As leveduras são os primeiros micro-organismos a iniciarem o processo de deterioração aeróbica, através do consumo de açúcares e ácidos da fermentação e aumentando assim temperatura e pH da silagem (PAHLOW et al., 2003). De acordo com Kung Jr et al. (2018), as temperaturas altas das silagens, especialmente após meses de fermentação e durante a alimentação, são possivelmente decorrentes da deterioração aeróbica. O qual é descrita como a penetração de ar na massa ensilada, resultando em crescimento de micro-organismo como as leveduras, os quais degradam os nutrientes principalmente ácido láctico, causando o aumento na temperatura e no pH das silagens. Em última análise resulta no crescimento de bactérias oportunistas e moldes (mofos) que proliferam no oxigênio e causam mais aquecimento e deterioração. Quando a temperatura da ensilagem começa a aumentar

devido à atividade de microrganismos aeróbicos, valores nutritivos poderiam diminuir em até 16 % antes dos moldes se tornarem visível (BORREANI et al., 2018).

Além disso, as perdas de MS, nutricionais e a deterioração do material ensilado causam grande prejuízos econômicos aos agricultores (TABACCO et al., 2011). Além da perda econômica direta de MS e nutrientes, essa deterioração da silagem também pode causar perdas indiretas, por causa da redução no valor nutritivo, palatabilidade e ao risco de efeitos prejudiciais no desempenho animal e na sua saúde (KUNG et al., 1998). Alguns desses efeitos estão relacionados à proliferação de microrganismos potencialmente patogênicos ou indesejáveis (LINDGREN e PAHLOW, 2002) e à síntese de micotoxinas (BOUDRA e MORGAVI, 2008). As perdas podem chegar a 70 % dos materiais estocados nas áreas periféricas e próximas às paredes laterais dos silos e estão relacionados a diminuição das frações de carboidratos solúveis e dos ácidos orgânicos (BOLSEN et al., 1993).

#### 2.4 DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* GÁS NA SILAGEM

A técnica de digestão *in vitro* foi desenvolvida pela primeira vez por Tilley e Terry (1963) e tem sido comumente usada para predizer a digestibilidade *in vivo*. Usando os mesmos princípios metodológicos da técnica *in vitro* Menke et al. (1979), propuseram um método para estimar o valor nutricional dos alimentos através do desaparecimento da amostra. Essa técnica envolve a medida da produção de gases como dióxido de carbono e metano durante a fermentação, sendo medida diretamente, com o uso de seringa de vidro graduada (KHAZAAL e OSRKOV, 1993). O aumento da pressão do gás faz com que o êmbolo da seringa se desloque e as avaliações de degradação medidas através das técnicas de produção de gás fornece importantes informações em relação à fração do alimento que é fermentado no rúmen e à possível fração direcionada ao crescimento microbiano (PEREIRA et al., 2013).

A técnica de produção de gás *in vitro*, consiste na incubação de amostras de alimentos em garrafas com um medidor de gás acoplado. Para determinar o volume do gás pode-se utilizar uma seringa plástica graduada, quando ocorre a fermentação do alimento e a liberação de gás. A quantidade de gás produzido é medida em tempos definidos, para que se obtenha uma curva de degradação (THEODOROU et al., 1994). De acordo com Tagliapietra et al. (2010) o gás liberado a partir de alimentos inoculados com líquido ruminal reflete a atividade microbiana.

O gás que é produzido como produto da fermentação e o perfil acumulado deste gás

podem dar a informação sobre a digestibilidade do alimento e cinética de fermentação (GETACHEW et al., 1998). De acordo com Cabral et al. (2002) a técnica de produção de gases *in vitro* é importante para o estudo dos parâmetros cinéticos das frações que compõe os alimentos. Isto porque os gases produzidos durante a fermentação refletem a taxa e extensão em que os componentes são fermentados pelos micro-organismos ruminais. O método de produção de *in vitro* gás, tem como principal vantagem determinar a cinética de fermentação em uma única amostra. Sendo necessária uma quantidade relativamente pequena de amostra, permitindo avaliar maior número de amostras ao mesmo tempo, também demonstra possuir uma boa correlação com as metodologias *in vivo* e *in situ* (BLÜMMEL e ORSKOV, 1993).

A digestibilidade *in vitro* por produção de gás gera uma curva sigmóide, e pode ser dividida em três fases: 1) a fase lenta, sem produção de gás (fase inicial, onde ocorre a fixação e colonização dos substratos), 2) a fase de produção de gás rápida (fase exponencial) e 3) a fase em que a taxa de produção de gás diminui, chegando à zero (fase assintótica) (BEUVINK e KOGUT, 1993).

A função de crescimento logístico, aplicado à microbiologia, assume que a produção do gás é proporcional tanto ao tamanho da população microbiana, quanto ao substrato digestível (SCHOFIELD et al., 1994). Ao início da fermentação a população microbiana é o fator limitante, e ao final o substrato desempenha este papel. Em função disso, a curva logística é inerentemente sigmoideal, sendo que a taxa máxima ocorre quando metade do substrato foi digerida. De acordo com Schofield (2000) a silagens de milho produzem curvas sigmoidais.

No modelo bicompartimental os volumes de gás obtidos nos diferentes tempos de incubação são ajustados de acordo com a equação proposta por Schofield et al. (1994);  $V(t) = A / (1 + \exp(2 + 4 * B * (C - T))) + D / (1 + \exp(2 + 4 * E * (C - T)))$ , onde o  $V(t)$  é o volume acumulado no tempo  $t$ ;  $A$  é o volume de gás oriundo da fração de rápida digestão;  $B$  ( $h^{-1}$ ) é a taxa de degradação da fração de rápida digestão;  $C$  é o tempo de colonização (horas);  $D$  é o volume de gás oriundo da fração de lenta degradação (fração B2 dos carboidratos); e  $E$  ( $h^{-1}$ ) é a taxa de degradação da fração de lenta degradação.

De acordo com Cone et al. (2008) avaliaram os efeitos dos diferentes períodos de estocagem de até 180 dias nas silagens de milho sobre a característica de fermentação ruminal *in vitro*, determinada por meio da produção de gás, foi observado que a técnica não é influenciada pela duração do período de ensilagem. No entanto Naeini et al. (2014) avaliando silagem de sorgo com até 120 dias de estocagem observaram a produção de gás elevou-se de

forma constante ao longo do tempo de estocagem.

## 2.5 FRACIONAMENTO DO NITROGÊNIO E CARBOIDRATOS DA SILAGEM

As frações de carboidratos e proteínas bem como suas taxas de degradação são utilizadas para computar a quantidade de nutrientes disponíveis para servir como base à fermentação ruminal para cada um dos grupos de micro-organismos, conforme descrito por RUSSELL et al., (1992). Os carboidratos não fibrosos (CNF) correspondem aos carboidratos solúveis em detergente neutro, ou seja, fazem parte do núcleo celular, composto de açúcares como a glicose e frutose, ácidos orgânicos e outros carboidratos de reserva de plantas, tais como amido, sacarose e frutanas (SNIFFEN et al., 1992).

Como uma forma de melhor caracterizar os componentes de um alimento com os teores proteínas e carboidratos, Sniffen et al. (1992) e Licitra et al. (1996) sugeriram que os componentes nitrogenados fossem divididos em diferentes frações A, B1, B2, B3 e C. Sendo que a fração A é basicamente constituída de nitrogênio não proteico (NNP), que é instantaneamente solubilizada e sua taxa de degradação tende ao infinito. Essa fração A, é uma fonte nitrogenada disponível para as bactérias fermentadoras de carboidratos fibrosos, as quais utilizam amônia para atendimento de suas exigências proteicas. As frações B1, B2, e B3 representam a proteína verdadeira potencialmente degradada no rumem, e suas quantidades neste compartimento estomacal dependem de suas taxas de degradação e de passagem.

Uma vez que a fração B1, constituída de proteína solúvel em tampão borato fosfato, mas que precipita em TCA, sendo rapidamente degradável no rúmen; B2, constituída de proteína insolúvel em tampão-borato presente no conteúdo celular e com taxa de degradação intermediária. A fração B3, proteína insolúvel e lentamente degrada no rúmen, com isso propicia maior fluxo de aminoácidos para o intestino; essa fração é representada pelas extensina, prolamina e pela proteína de ligação de parede celular que apresenta lenta taxa de degradação, sendo assim, digerida principalmente no intestino. Fração C é a proteína insolúveis no rúmen e indigestível no trato gastrintestinal. Segundo Licitra et al. (1996) o fracionamento do nitrogênio utiliza as seguintes equação: fração A (concentração de NNP), fração B1 (NNP menos nitrogênio solúveis), fração B2 (nitrogênio insolúveis em TCA menos nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDIN)), fração B3 (NIDIN menos nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA)) e a fração C (concentração de NIDA).

O Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS) considera que os carboidratos são

divididos em não estruturais como os açúcares, amido e pectinas e estruturais tais como celulose, hemicelulose e lignina, ou seja, a fração fibrosa. Segundo Russell et al. (1992), todos os carboidratos não estruturais são fermentados pelas bactérias capazes de utilizar nitrogênio de amônia ou peptídeos para a produção de proteína microbiana.

Lanzas et al. (2007) propôs dois modelos de fracionamento dos carboidratos sendo eles: original e expandido. Na versão original presente no sistema de cálculo do CNCPS, as frações de carboidratos foram categorizadas em quatro frações: A, B1, B2 e C (FOX et al., 2004; LANZAS et al., 2007). As descrições das frações são: fração A (CNF – B1), representa os carboidratos solúveis em água, como os açúcares e que são rapidamente fermentados com taxas de degradação de  $(1 \text{ a } 3 \text{ h}^{-1})$ , Fração B1 (soma dos teores da fibra solúvel e amido), com taxas de degradação entre  $0,05 \text{ e } 0,50 \text{ h}^{-1}$ . A fração B2 (FDN - (NIDIN \* PB) / 1000 – CC), é composta pelos carboidratos fibrosos da parede celular, que possui lenta disponibilidade ruminal, conseqüentemente se torna mais susceptíveis aos efeitos da taxa de passagem (SNIFFEN et al., 1992). A fração C (FDN- Lignina\*2,4 / 1000), constituída de fibra insolúvel, representa a parede celular indisponível, acarretando menor consumo voluntário. Para determina o teor de carboidrato total (CHO=1000 – PB – EE – MM), e para o teor de carboidrato não fibroso (CNF= CHO – B2 – CC).

De acordo com Lanzas et al. (2007), reformularam o fracionamento com o intuito de relatar um esquema de fracionamento de CHO que classifica os carboidratos com base nas características de degradação ruminal e os métodos analíticos disponíveis. Neste fracionamento expandido a fração A é subdivida em 4 frações e B2 que era fibra disponível no método de fracionamento original passa a ser B3, enquanto que B1 é amido e B2 fibra solúvel. Os pools dos carboidratos (CHO) foram expandidos para oito frações: CA1 são os ácidos graxos voláteis (soma dos teores dos ácidos acético, propiônico e butírico, isobutírico), CA2 é a concentração ácido láctico na silagem. A fração CA3 é a soma dos teores outros ácidos orgânicos, CA4 são os açúcares solúveis das silagens, sendo os predominantes são glicose, frutose e sacarose, CB1 é o amido, CB2 é a fibra solúvel, como pectina (CNF – A1 – A2 – A3 – A4 – B1), CB3 é a fibra disponível (FDN - (NIDIN \* PB) / 1000 - CC) e a fração CC a fibra indisponível (FDN- Lignina\*2,4 / 1000). Esse método de fracionamento expandido de carboidrato é mais importante em silagens, por possuir um maior detalhamento nas frações dos carboidratos e considerar a produção de ácidos orgânicos.

Visto que as silagens apresentam considerada produção destes, e uma grande diversidade na composição química em virtude de diversos fatores como o processo

fermentativo, cultivar, aditivos dentre outros. Com isso o fracionamento mais detalhado permite expressar de forma mais verídica o valor nutricional e auxilia no cálculo da formulação de ração. Embora os ácidos orgânicos (CA1, CA2 e CA3) não sejam considerados carboidratos, eles são incluídos nas frações de carboidratos, porque eles são considerados mais próximos dos carboidratos do que gordura ou proteína. Em alimentos fermentados, os ácidos graxos voláteis podem representar até 60 g / kg de MS das silagens, sendo que o ácido láctico é o predominante, que pode estar presente em 50 -150 g / kg/MS, no entanto outros ácidos orgânicos que não sejam os ácidos lácticos e acético são quase indetectáveis em silagens (MCDONALD et al., 1991). No entanto poucos estudos têm avaliado os efeitos do tempo de estocagem sobre o fracionamento proteico e dos carboidratos, mas Ferraretto et al. (2015), relataram que os dados de pesquisa encontrados sugerem que a resposta nas frações do nitrogênio (N) em silagens com longos períodos de estocagem, variam por causa do tipo de híbrido utilizado e isso pode resultar na variação na digestibilidade do amido.

### **3 ARTIGO 1- Composição química, parâmetros cinéticos e frações proteicas e de carboidratos de silagens de milho submetidas a diferentes tempos de estocagem.**

#### **Resumo**

Objetivou-se avaliar os efeitos sobre a composição química, fermentação, parâmetros cinéticos, frações proteicas e de carboidratos de silagens de milho, abertas com distintos tempos de estocagem 45, 90, 180 e 360 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (tempo de estocagem) e quatro repetições. As variáveis de MO, MM, hemicelulose, DIVFDN, estimativa de produção de leite e não foram afetadas, enquanto que os constituintes da parede celular aumentaram com o aumento do tempo de estocagem. Os teores amido e a digestibilidade da MS, apresentaram efeito quadrático, assim como os valores dos ácidos lático e acético, enquanto que o ácido propiônico aumentou com o maior tempo de estocagem. Observamos a ocorrência de proteólise da PB o que resultou em aumento da concentração do N-amoniaco, NS e NNP e redução da proteína verdadeira, enquanto que o NIDA não foi afetado pelos tratamentos. Para os parâmetros cinéticos de degradação das silagens obtidas pela metodologia *in vitro* gás observou-se o aumento na produção de gás e na taxa de degradação (B), enquanto que a fração (A) reduziu e os demais parâmetros não foram afetados com o aumento do tempo de estocagem. Com o fracionamento dos carboidratos observamos redução das frações solúveis e aumento da fibra digestível e indigestível. A medida que aumenta o tempo de estocagem, observa-se redução na qualidade das silagens, devido à elevação dos teores de N-amoniaco, NNP, parede celular e a perda de proteína verdadeira e carboidratos solúveis.

**Palavras-chave:** Ácidos Orgânicos, Composição química; Digestibilidade da MS; Técnica *In vitro* gás; Tempo de armazenamento.

**Chemical composition, kinetic parameters and protein and carbohydrate fractions of corn silages submitted to different storage times**

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects on the chemical composition, fermentation, kinetic parameters, protein and carbohydrate fractions of silage maize, opened with different times of storage 45, 90, 180 and 360 days. The experimental design was a completely randomized block design, with four treatments (storage time) and four replications. The variables of MO, MM, hemicellulose, DIVFDN, estimate of milk production and were not affected, while the constituents of the cell wall increased with the increase of storage time. The starch contents and digestibility of DM, showed a quadratic effect, as well as the values of lactic and acetic acids, while the propionic acid increased with the greatest time of storage. We observed the occurrence of proteolysis of PB, which resulted in an increase in the concentration of N-ammoniacal nitrogen, NS and nnh and reduction of true protein, while the NIDA was not affected by treatments. For the kinetic parameters of degradation of silage obtained by *in vitro* gas methodology we observed the increase in the production of gas and the degradation rate of (B), while the fraction (A) reduced and the other parameters were not affected with the increase of storage time. With the fractionation of carbohydrates we observed reduction of soluble fractions and increase of digestible fiber and indigestible. The measure that increases the storage time, we observed a reduction in quality of silages, due to the elevation of the levels of N-ammoniacal NNH, cell wall and the loss of true protein and soluble carbohydrates.

**Keywords:** Organic acids; chemical composition; Digestibility of MS; Digestibility of MS; *In vitro* gas technique; Storage time.

## Introdução

Para obter o melhor desempenho dos animais, devemos utilizar na sua dieta alimentos de alta qualidade. Neste sentido a forragem conservada na forma de silagem destaca-se como uma das principais fontes de volumoso na nutrição de ruminantes (Saricicek et al., 2007). De

acordo com Wilkinson e Davies (2012) o processo de ensilagem pode ser descrito em quatro fases, sendo (1) a fase aeróbica que se inicia no momento do corte até o estabelecimento da anaerobiose no silo, (2) a fase de fermentação, (3) a fase da estabilidade (4) e a fase de abertura de silo, exposição ao oxigênio e de fornecimento aos animais.

Embora a literatura cite uma fase estável do processo de ensilagem, ou seja, que a maioria dos processos metabólicos ativos nos silos cessam entre 2 a 6 semanas de fermentação (Pahlow et al., 2003), estudos demonstraram que certos componentes químicos e os parâmetros fermentativos das silagens apresentaram alterações, mesmo após o início da fase estável (Der Bedrosian et al., 2012; Arcari et al., 2016). De acordo com Kleinschmit e Kung (2006) verificaram que o *Lactobacillus buchneri* permaneceu razoavelmente ativo por períodos prolongados de tempo (até um ano) na silagem, sob condições anaeróbicas e pH baixo. Isso foi amparado pelo fato que o 1,2-propanodiol, um produto decorrente da transformação do ácido láctico em ácido acético, por este organismo, continuar aumentando ao longo do tempo de armazenamento.

Outros processos também parecem continuar após cessar a fermentação ativa, como relataram os estudos de Hoffman et al. (2011) e Ferraretto et al. (2015), que avaliando a silagem de milho com tempo de estocagem de até 240 dias em ambos os trabalhos, observaram que N-amoniaco e nitrogênio solúvel aumentaram à medida em que se prolonga o tempo de estocagem. Embora não diretamente fermentadas pelas bactérias ácidas lácticas, as frações fibrosas das silagens também podem ser alteradas com o tempo de estocagem, conforme Der Bedrosian et al. (2012), que observaram haver hidrólise parcial da hemicelulose durante a ensilagem e Young et al. (2012) e Ferraretto et al. (2015) relataram que as digestibilidade da FDN nas silagens decresceram substancialmente com o avanço do tempo de estocagem. Não foram encontrados estudos em que se avalia os efeitos do tempo de

estocagem sobre a cinética de degradação, frações proteicas e dos carboidratos em silagens de milho.

Por isso, a compreensão das alterações decorrentes do período de estocagem na composição da silagem é uma importante ferramenta para realizar uma dieta equilibrada permitindo com isso maiores ganhos na produtividade. Neste sentido, o trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos na fermentação, qualidade nutricional, parâmetros cinéticos, frações proteicas e de carboidratos das silagens de milho submetidas a diferentes tempos de estocagem.

### **Material e métodos**

O experimento foi conduzido no Grupo de Estudos em Aditivos na Produção Animal (GEAPA) da universidade Federal de Santa Maria (UFSM), localizado na região fisiográfica da Depressão Central, Rio Grande do Sul, Brasil, no período de outubro de 2016 a junho de 2018. O clima da região é do tipo Cfa, subtropical úmido, segundo a classificação de Köppen (1928). O solo é classificado como Argissolo vermelho distrófico arênico (Embrapa, 2006). Foi utilizado o híbrido de milho comercial Agrocere AG 8690, e a sua composição bromatológica foi apresentada na Tabela 1.

A área experimental de 1.500 m<sup>2</sup> foi semeada em outubro de 2016, em linhas com espaçamento de 0,45 m e densidade de 3,6 sementes/m linear, conforme recomendações da empresa sementes Agrocere. Na ocasião da semeadura foi realizada a adubação conforme a necessidade expressa pelo Manual de Adubação e Calagem (Rolas, 2004).

As plantas de milho foram colhidas a uma altura média do solo de 0,20 m, quando continham a maior parte dos grãos no estágio de 50 % da linha leite, sendo fragmentadas em um triturador com tamanho médio de partículas de 0,02 m. Foram colhidas três plantas da

área experimental, de cada repetição, realizando a separação manual dos componentes estruturais colmo, folha, material senescente, palha e grão mais espiga. As amostras dos componentes estruturais foram secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C, até atingir o peso constante, para obtenção da estimativa da matéria parcialmente seca e determinação da produção e dos componentes morfológicos em Kg MS ha<sup>-1</sup>.

Os tratamentos avaliados foram os diferentes tempos de estocagem das silagens com 45, 90, 180 e 360 dias após a elaboração das silagens. As silagens foram realizadas no dia 08 de abril de 2017, com 128 dias após o cultivo, sendo o material ensilado em mini silos experimentais, adequadamente compactados, e hermeticamente fechados em quatro sacos plásticos para proteção contra a entrada de ar e luminosidade. A densidade média das silagens foi da ordem de 716 kg/ha<sup>-1</sup>.

A sequência dos sacos plásticos respeitou a seguinte ordem: o primeiro saco com furos no fundo tinha por finalidade a saída dos efluentes e acomodação do material ensilado; o segundo saco continha areia lavada e seca em estufa para absorção dos efluentes; o terceiro saco para melhor vedação dos demais; o quarto saco, escuro para proteção contra luminosidade. Os silos experimentais continham 6 kg de silagem e 2 kg de areia. Para avaliação da capacidade tamponante (CT), utilizou-se metodologia descrita por Playne & McDonald (1966), aproximadamente 0,015 kg de amostra de silagem foram diluídas em 250 mL de água destilada e realizada titulação para pH 3,0 com HCl (0,1 N) e, posteriormente, titulado com NaOH (0,1 N).

Na abertura dos silos experimentais, foi retirada uma amostra de silagem de cada silo para determinação do pH conforme Silva e Queiroz (2002), e outra para a extração por meio de prensagem do líquido da silagem (prensa Carver), utilizado para análise do nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total (N-NH<sub>3</sub>/NT) pelo método de calorimetria de acordo

com Weatherburn (1967). Posteriormente, outra amostra de silagem foi retirada, levada à estufa com circulação forçada de ar com temperatura média de 55 °C, até atingir peso constante e pesada para determinação da matéria parcialmente seca (MPS), sendo moída posteriormente, em moinho do tipo “Willey” com peneira de malha de 1 mm (análises químicas) e 2 mm (estimativa de digestibilidade). A matéria seca total (MS) foi determinada em estufa a 105 °C durante um período mínimo de 8 horas, a matéria mineral (MM) através de incineração em mufla a 550 °C durante 4 horas. A determinação de proteína bruta (PB) foi realizada pelo método micro Kjeldhal, segundo AOAC (1995), e extrato etéreo (EE) de acordo AOCS (2005).

Os níveis de fibra em detergente neutro (FDN) foram obtidos com o uso de  $\alpha$ -amilase termoestável (Termamyl 120L, Novozimes Latin America, LTDA), com auxílio de autoclave, conforme técnica descrita por Van Soest et al., (1991) e adaptada por Senger et al. (2008) e o conteúdo de fibra em detergente ácido (FDA) e o teor de lignina (LDA), realizadas de acordo com a metodologia de Van Soest et al. (1991), sendo a LDA extraída com o uso de ácido sulfúrico 72 %. Os teores de hemicelulose (HEM) e celulose foram obtidos por diferenças entre os teores (FDN e FDA) e (FDA e lignina), respectivamente. O ensaio de digestibilidade *in vitro* matéria seca (DIVMS), foi conduzida segundo metodologias de Tilley e Terry (1963), adaptado por Goering e Van Soest (1970), com inóculo de bovinos fistulados, os quais foram adaptados com silagem de boa qualidade.

Os níveis de nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), nitrogênio solúvel (NS), determinação de nitrogênio não proteico (NNP), assim como as equações utilizadas para calcular o fracionamento do nitrogênio (N) foram analisados de acordo com Licitra et al. (1996). Tendo como descrições das frações, A= nitrogênio não proteico, as frações B1, B2, e B3 representam a proteína

verdadeira potencialmente degradada no rúmen, e suas quantidades neste compartimento estomacal dependem de suas taxas de degradação e de passagem, sendo a B1= constituída de proteína solúvel em tampão borato fosfato, mas que precipita em TCA, sendo rapidamente degradável no rúmen; B2= constituída de proteína insolúvel em tampão-borato presente no conteúdo celular e com taxa de degradação intermediária; B3= proteína insolúvel e lentamente degrada no rúmen, C= é a proteína insolúvel no rúmen e indigestível no trato gastrintestinal.

O fracionamento dos carboidratos (CHO) realizado segundo a metodologia de Lanzas et al. (2007). As frações possuem as seguintes descrições: CHO= carboidrato total, CNF= carboidrato não fibroso, A1= ácidos graxos voláteis (acético, propiônico, butírico e isobutírico), A2= ácido láctico, A3= ácidos orgânicos, A4= açúcares, B1= amido, B2= fibra solúvel, B3= fibra digestível e C= fibra indigestível.

Para estimar os impactos do tempo de estocagem das silagens sobre o ganho de energia, proteína e do peso dos animais, foi realizada uma simulação de dieta utilizando o programa Large Ruminant Nutrition System – LRNS, o qual tem por base o fracionamento de carboidrato (Sniffen et al. 1992). Para realizar a dieta base foi considerada uma vaca da raça Holandesa, com produção de leite anual de 5.750 kg/ano, obtendo 3,5 % de gordura e 3,2 % de proteína e o animal apresentava as seguintes características: 550 kg de peso vivo; 50 meses de idade; estava na segunda lactação; 100 dias após o parto; intervalo entre partos de 12 meses; idade da primeira cria 24 meses e escore corporal de 2,5. A base do cálculo considerou o sistema free-stall e demais características ambientais como temperatura e umidade não foram alteradas. A ração base continha: 10 kg de silagem de milho com 30 % de grãos médios; 4 kg de milho moído médio e 3 kg de farelo de soja fino de 44 %. Para a realização do cálculo da dieta, foram alterados os seguintes constituintes da composição da silagem de

acordo com cada tratamento de tempo de estocagem: MS (%); FDN (% MS); LDA (%FDN); PB (%MS), amido (% CNF); EE (%MS), MM (%), NS (%PB), NNP (% PB), PIDN (%), PIDA (%), açúcar solúveis (%MS), amido (%), ácidos orgânicos (g/kg de MS) e ácido lático (g/Kg de MS) para cada amostra testada.

O açúcar solúvel (AS) foi determinado pelo método colorimétrico fenol-sulfúrico conforme Hall (2000), e os ácidos orgânicos, a parte de preparação das amostras dos ácidos, acético, propiônico e butírico foram realizadas de acordo com Tangerman e Nagengast (1996), com adaptações, enquanto que o ácido lático foi submetido ao processo de derivatização com auxílio N-terc-butilmetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) de acordo com Oms-Oliu et al. (2011). Depois as concentrações de todos os ácidos foram analisados em cromatografia gasosa equipada com detector de ionização de chama (GC-FID), Varian Star 3400CX (CA, EUA), a separação foi adquirida em uma coluna capilar polar (Chrompack, CP-WAX 52 CB, EUA) de 50 m × 0,25 mm d. × 0,25 µm de espessura de filme, usando hidrogênio como gás de arraste a uma pressão constante de 15 psi, no entanto o ácido lático foi usada a coluna SGE-BPX 5 de 30 m x 0,22 mm d.i. × 0,25 mm de espessura de filme.

A determinação do amido foi realizada usando o método proposto Walter et al. (2005). Essa determinação inclui digestões enzimáticas sequenciais com amilase (Termamyl 120L), amiloglicosidase (AMG 300L) e protease (Flavourzyme 500L) para hidrólise do amido e da proteína. Os açúcares resultantes dessa digestão foram quantificados em espectrofotômetro a  $\lambda = 505$  nm de absorbância, utilizando o kit glicose oxidase-peroxidase (GOP) como reativo de cor.

As análises de digestibilidade “*in vitro*” gás, foram realizadas de acordo com técnicas adaptadas de Shofield et al. (1994) e Theodorou et al. (1994), nas quais a produção de gás foi

medida nos tempos 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 72, 96 horas, e os cálculos dos parâmetros da cinética de produção de gases, foram realizados com auxílio do programa estatístico SAS. E os dados se ajustaram ao modelo logístico bicompartimental, onde:  $V(t) = \frac{A}{1 + \exp(2 + 4 * B * (C - T))} + \frac{D}{1 + \exp(2 + 4 * E * (C - T))}$ , em que: V (t): volume de gases no tempo (t); A= volume de gases originado da fração de rápida degradação (ml); B= taxa de degradação (% h) da fração de rápida degradação, C= tempo de colonização (lag time) em horas; D= volume de gases originado na fração lenta degradação (ml); E= taxa de degradação (% h) da fração de lenta degradação. Para a realização das análises, os animais foram adaptados com silagem de milho de boa qualidade, durante 5 dias antes da coleta do inóculo ruminal.

A estimativa da produção de leite foi realizada com auxílio da planilha MILK2006, desenvolvido por Shaver & Lauser (2006), a qual considera a produção de massa de forragem, os teores de amido, PB, NDT, EE, FDN e DIVFDN nas 48h, para fins do cálculo. Foram geradas estimativas da energia líquida para lactação (ELI), nutrientes digestíveis totais (NDT), produtividade de leite/t silagem e produtividade de leite/há. A digestibilidade *in vitro* do FDN (DIVFDN\_48 h) foi determinada usando a seguinte equação:  $\text{DIVFDN} = 100 - (\text{FDN remanescente em } t = 48 \text{ h} / \text{FDN no } t = 0 \text{ h}) \times 100$ .

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e 4 repetições cada. O modelo experimental foi:  $y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$ , onde  $y_{ij}$  = valor observado na unidade experimental que recebeu o tratamento  $i$ , repetição  $j$ ;  $\mu$  = efeito geral da média;  $t_i$  = efeito do tratamento  $i$ ;  $e_{ij}$  = erro aleatório (resíduo). Foi realizada análise de variação e regressão, e a escolha dos modelos foi baseada no valor de significância ( $P > 0,05$ ), e na significância dos coeficientes linear e quadrático, com auxílio do programa estatístico SAS, versão SAS<sup>®</sup> University Edition.

## Resultados e discussão

Não foi observado efeito do tempo de estocagem na matéria orgânica e matéria mineral das silagens de milho, que apresentaram teores médios de 95,12 e 4,88 %, enquanto que a MS apresentou decréscimo linear em função do tempo de estocagem (Tabela 2). De acordo com Weinberg e Chen (2013), essa queda nos teores de MS das silagens de milho ao longo do tempo de armazenamento, é decorrente dos efeitos secundários da fermentação, os quais causam o rompimento de células e promovem o extravasamento do conteúdo intracelular para o meio externo. Também pode ser atribuída ao processo de oxidação das hexoses, o qual resultam na produção de ácidos orgânicos, CO<sub>2</sub> e água (MUCK, 2010).

No presente trabalho, o teor de extrato etéreo aumentou linearmente com o tempo de estocagem (Tabela 2). Herrmann et al. (2011), avaliando diferentes tempos de estocagem (0, 10, 90, 180 e 360 dias), também observaram o acréscimo no conteúdo do extrato etéreo com o passar do tempo. Isso pode ser explicado, devido à lixiviação dos carboidratos solúveis do meio, acarretando na concentração dos demais componentes.

A concentração de N-amoniaco aumentou linearmente e o NS apresentou efeito quadrático, atingindo um valor máximo de 67,20 % aos 278 dias de estocagem. Enquanto que a proteína bruta reduziu linearmente com o avanço do tempo de estocagem. Isso ocorre devido ao processo de proteólise, o qual provoca a hidrólise das ligações peptídicas das proteínas através da ação de enzimas presentes nas células da planta, gerando compostos nitrogenados não-protéicos, como amônia, nitratos, nitritos, aminoácidos livres e peptídeos (McDonald et al 1991). Sendo o NS e N-NH<sub>3</sub>, produtos de degradação de proteínas, geralmente aumentam com o passar do tempo de estocagem. Esta situação já foi demonstrada em outros trabalhos que avaliaram diferentes períodos de estocagem nas silagens de milho como Ferraretto et al. (2015) até 240 dias, Young et al. (2012), 45 e 150 de fermentação dos

silos, indicando que os mecanismos proteolíticos estavam ativos no decorrer do tempo de armazenamento.

O N-amoniaco é descrito na literatura como um produto exclusivo de desaminação das proteínas, apesar das maiores concentrações de N-NH<sub>3</sub>, observado em nosso estudo, os valores não afetaram a qualidade das silagens. Estando de acordo com Kung Jr. et al. (2018) que relataram teores de 55 a 60 % de NS e concentrações menores que 10-15 % N-amoniaco, como resultante de um adequado processo fermentativo. Pode-se sugerir que esse aumento de N-NH<sub>3</sub>, é causado pela atividade bacteriana da proteína que envolve o grão de milho (Windle et al., 2014). Essa atividade bacteriana sobre as prolaminas ao redor do grânulo de amido pode alterar a integridade da matriz proteica, facilitando a exposição do amido à fermentação bacteriana, possibilitando assim a maior digestibilidade do amido (Hoffman et al., 2011).

Baseado neste fato, os estudos como de Ferraretto et al. (2014) e Ferraretto et al. (2015), estimaram equações para prever a digestão do amido correlacionando com os teores de NS, N-amoniaco, PB, pH e MS das silagens. Demonstraram relações positivas entre digestibilidade do amido com N-NH<sub>3</sub> e NS, à medida que aumenta o tempo de estocagem. Isso acontece devido à solubilização das proteínas (Hoffman et al., 2011), conforme relatado anteriormente.

Os teores de FDN, FDA, celulose e LDA (Figura 1), também apresentaram comportamento linear positivo, ou seja, aumentaram com o passar do tempo. O incremento destes constituintes nas silagens, ocorre em virtude das perdas de componentes não estruturais, ou seja, da fração solúvel acarretando na concentração da fração fibrosa das silagens. Os resultados estão de acordo com Leão et al. (2017), que estudaram os efeitos do tempo de estocagem em silagens de cereais. Visto que esse aumento do FDN tem efeito negativo sobre o consumo como relatado no estudo de meta-análise de Detmann et al. (2014),

o qual observaram que a ingestão de matéria seca reduziu linearmente, conforme a fração FDN da dieta aumentou, visto que o consumo voluntário foi regulado pelas limitações físicas e metabólicas dos animais.

Em relação à hemicelulose não observamos diferença estatística ( $P > 0,05$ ), a qual apresentou valores médios de 17,86 % MS. Em contraste, Der Berdrosian et al. (2012) avaliando a silagem de milho com diferente tempo de estocagem, não encontraram efeitos sobre os teores FDN, FDA, e amido das silagens, contudo observaram a solubilização parcial da hemicelulose, propiciando maiores concentrações dos carboidratos solúveis.

O processo fermentativo ocorreu adequadamente em todas as silagens (Figura 2). O pH apresentou comportamento quadrático, atingindo seu maior valor de 4,0 aos 264 dias de fermentação, sendo este valor inferior a 4,2 estando dentro do recomendado para obtenção de uma boa silagem (McDonald et al. 1991). Os ácidos lático e acético demonstraram comportamento quadrático, com valores máximos de 4,18 e 1,96 % aos 233 e 162 dias de fermentação respectivamente, com posterior redução. Esses resultados corroboram com Arcari et al. (2016) que avaliando silagem de milho com até 202 dias de fermentação, observaram pico de ácido lático aos 174 dias, reduzindo posteriormente.

Essas reduções da concentração de ácido lático em silagens armazenadas por longos períodos podem ser atribuídas à capacidade de certas estirpes de bactérias em aproveitar ácido lático em condições anaeróbicas e com falta de glicose (Lindgren et al. 1990). Em contrapartida, observamos um aumento linear (Figura 2) da concentração do ácido propiônico com avanço do tempo de estocagem, isso pode ser justificado com a redução do ácido lático, pois as bactérias podem utilizar este ácido na rota do acrilato, produzindo propionato como subproduto de fermentação (Kozloski, 2017). Além disso, este maior aporte de ácido propiônico pode ser importante, pois este é um precursor de glicose, entrando no ciclo da

gliconeogênese hepática (Huntington, 1990).

A redução na concentração do ácido acético pode ser causada por uma disponibilidade limitada de carboidratos solúveis em água em condições prolongadas de estocagem (Lindgren et al. 1990). Os resultados deste estudo são diferentes daqueles relatados por outros autores que estudaram diferentes tempos de estocagem como Herrmann et al. (2011); Weinberg e Chen (2013) e Arcari et al. (2016), que descreveram concentrações de ácido láctico e ácido acético superiores ao presente trabalho. Com aumentos constantes em silagens de milho de planta inteira, armazenadas por longos períodos em comparação com silagens armazenadas por período mais curto. Os teores de ácido butírico não se ajustaram à análise de regressão, apresentando valor médio de 0,10 % da MS. Altos níveis de ácido butírico indicam a ocorrência de deterioração do material, no entanto, em concentrações menores que 0,10 % da MS não comprometem a qualidade nutricional da silagem de milho (McDonald, 1991).

A produção de gás e os parâmetros cinéticos de degradação das silagens (Tabela 3), determinados pela digestibilidade *in vitro* gás, demonstraram uma redução linear no volume de gás produzido e na fração de rápida digestão (A) na medida em que aumentou o tempo de estocagem, devido, provavelmente, ao aumento da fração fibrosa (FDN) e reduzem dos CNF (Tabela 5). Esse aumento da fibra nas silagens, podem ter limitado o acesso das bactérias do rúmen ao conteúdo de células fermentáveis (Van Soest, 1994). Em contraste, menores teores de FDN e maiores valores de CNF foram observados por De Boever et al. (2005) em diferentes híbridos das silagens de milho, o que resultou em maiores taxas de degradação e volumes de gás produzido.

A taxa de produção de gás da fração de rápida fermentação (B) aumentou constantemente, visto que a mesma varia de acordo com a composição da fração A, enquanto que os demais parâmetros cinéticos de degradação das silagens não se ajustaram à análise de

regressão, ou seja, não foram afetados pelo tempo de armazenamento. Foram observados teores médios para LAG time (C), de 5,5 h, que representa o tempo que as bactérias ruminais levam para se ‘aderir’ as partículas da silagem, ou seja, o tempo que leva para iniciar a degradação da fração de lenta degradação, uma vez que o volume de gás produzido pela fração lentamente degradável (D) é de 97,64 ml, e a taxa de produção de gás obtida pela fração de lenta degradação foi de 2,58 %/h. De acordo com estudos de Senger et al. (2007) avaliando silagem de milho com 28 % MS e alta compactação observaram produção de gás de 203,6 ml e valores para as fração A, B, C, D, E de 61,4 ml, 1,3 %/h, 8,1 h, 133,7 ml, 2,4 %/h, respectivamente.

Analisando-se o fracionamento do nitrogênio (Tabela 4), podemos observar que a fração A que corresponde ao NNP das silagens estudadas apresentaram comportamento quadrático, atingindo seu maior nível de 65,27 % aos 277 dias, significando haver suprimento de compostos nitrogenados não proteicos para micro-organismos que fermentam carboidratos estruturais, já que estes utilizam a amônia presente no rúmen como a principal fonte de N para síntese de proteína (Ribeiro et al., 2001). Visto que o N-amoniaco está contido no NNP, e foi observado um aumento de 0,006 unidades percentuais deste para cada dia a mais de estocagem dos silos.

Contudo, as frações B1, B2 e B3, são as proteínas verdadeiras com diferentes taxas de degradação, sendo que as frações B1 e B2 são linearmente negativas, ou seja, a concentração dessas reduziram com avanço no tempo de estocagem das silagens. Em conjunto esses dados demonstram a ocorrência de proteólise ao longo do tempo, visto que durante o processo fermentativo da silagem, as enzimas das plantas, como proteases e peptidases, degradam proteínas verdadeiras em NNP (Medeiros e Marino, 2015). Isso afeta negativamente o valor nutritivo da silagem, uma vez que, Russell et al. (1992) relata que a fração B1 consiste em

proteínas totalmente degradáveis, sendo que estas disponíveis em níveis adequados, estimulam o aumento da biomassa bacteriana fermentadoras de carboidratos. Enquanto que o excesso de NNP pode ser prejudicial para a formulação das dietas, devido ao fato de dificultar a sincronização ruminal da taxa de degradação de carboidratos e proteínas, na síntese de proteína microbiana (Yang, 2010).

De acordo com Carvalho et al. (2008), a avaliação da fração B2 é importante, devido a sua degradação obter relação direta com a taxa de passagem, e com a extensão com que a proteína é degradada no rúmen constitui parâmetro importante para determinação do fornecimento de nitrogênio aos microrganismos e da quantidade de aminoácidos que pode ser absorvida no intestino. A fração B3 apresentou efeito quadrático, com valor mínimo de 4,03 % NT aos 213 dias. O valor da fração B3 encontrado neste trabalho são menores que os descritos por Sniffen et al. (1992) de 16,2 % para silagem com 25 a 40 % de grãos. A fração C, consiste na proteína associada à lignina (NIDA), sendo insolúvel no rúmen e indigestível no trato gastrintestinal, e para a qual não foram observadas diferenças entre os tratamentos, sendo o teor médio de 4,27 % do NT.

Em relação ao fracionamento de carboidratos (Tabela 5) proposto por Lanzas et al. (2007) a fração A, foi subdivida em quatro frações para melhor predizer o valor nutritivo das silagens, sendo obtidos na fração A1, com a soma dos ácidos graxos voláteis como acético, propiônico e butírico, e A2 os ácidos lácticos, ambas as frações apresentaram efeito quadrático, atingindo seus maiores níveis de 24,98, 41,85 g/kg aos 169 e 233 dias de fermentação, respectivamente. A fração A3, não foi detectada nas silagens, pois os ácidos orgânicos que não sejam os ácidos láctico e acético são quase que indetectáveis em silagens (McDonald et al. 1991). O teor de açúcares solúveis, fração A4, não se ajustou ao modelo de regressão, apresentando teor médio de 29,11 g/Kg ou 2,91 % da MS. Hentz et al. (2017), observaram

teor médio de 0,18 (% MS) de açúcares solúveis nas silagens de milho, no entanto Hall (2000) relata valores de 0,3 a 4,7 % como sendo a faixa ideal e uma média de 2 % da MS de açúcares solúveis nas silagens de milho, condizendo como resultados obtidos neste estudo.

No fracionamento pode-se verificar que a fração amido B1, apresentou efeito quadrático atingindo seu máximo de 205,20 g/Kg aos 167 dias de estocagem, enquanto que as fibras solúveis B2, reduziram ao longo do tempo de armazenamento. No entanto, o teor de amido observado foi considerado baixo (18,97 %), quando comparado ao valor médio de amido em silagens de milho (25,6 % na MS) apontado por Valadares Filho et al. (2006). Esta menor concentração de amido se deve provavelmente ao estágio mais precoce da planta, no momento da colheita, como podemos observar pelo teor de matéria seca (27,79 %).

No entanto, os valores de fibras solúveis foram considerados elevados, possivelmente pelo estágio ainda precoce e com pouco teor de MS em que a planta se encontrava no momento do corte. De acordo com Sorieul et al. (2016) planta em fase de crescimento tem mais parede primária, com isso, possui maior proporção de fibras solúveis como pectinas, hemiceluloses e B-glucanas. Enquanto que, as frações fibrosas como a fibra indigestível B3 e fibra indigerível C, aumentaram constantemente ao longo do tempo de estocagem, possivelmente em decorrência da redução ( $P < .0001$ ) dos carboidratos não fibrosos.

Portanto, pelo fracionamento podemos observar que ocorreu redução das frações solúveis e conseqüente incremento das frações fibrosas na medida em que aumentou o tempo de estocagem. Esta situação pode impactar no fluxo do trato gastrointestinal, podendo implicar na limitação do consumo de MS, restringindo o desempenho dos animais (Ahmed et al. 2014). A redução da fração solúvel dos carboidratos demonstra ter ocorrido atividade microbiana, degradando essas frações prontamente disponíveis que, possivelmente, tenham sido utilizadas para produção de ácido lático, visto que aos 233 dias de estocagem foi o

momento de máxima produção deste ácido, reduzindo posteriormente.

No entanto os carboidratos solúveis reduziram, provavelmente em decorrência das perdas oriundas do processo fermentativo como as perdas de MS por meio de efluentes e gases (McDonald, 1991). Essas produções de ácidos orgânicos e láctico nas silagens são importantes, pois são responsáveis pela conservação do material ensilado inibindo vários micro-organismos aeróbios (Muck, 2010), além de serem utilizados como fonte de energia para os ruminantes, sendo incorporado no leite ou depositado no tecido adiposo. Enquanto que ácido propiônico das silagens é absorvido pelo rúmen, transformando-se em glicose no fígado (Kung Jr. et al. 2018).

Os fracionamentos de carboidrato e proteína são importantes ferramentas, utilizadas em sistemas de formulações de dietas, por isso realizamos uma simulação de dieta com o sistema CNCPS (Tabela 6). Observamos a redução nas concentrações de energia, proteína metabolizável estimada para produção de leite, assim como no ganho médio diário dos animais à medida que se prolonga o tempo de estocagem das silagens. Conseqüentemente, o número de dias necessários para os animais adquirirem uma unidade de condição corporal é maior ao utilizar silagens que foram estocadas por mais tempo.

Apesar da redução da energia metabolizável estimada para produção de leite com o aumento do tempo de estocagem, todas as silagens testadas são capazes de suprir a necessidade de energia para a vaca produzir 25 Kg de leite/ dia, considerando uma participação da silagem de 10,03 % da MS. Entretanto, a proteína metabolizável estimada para produção de leite, não atendeu às necessidades mínimas para produzir 25 kg leite/dia nas silagens estocadas durante 360 dias, sendo que a proteína metabolizável é representada pelos aminoácidos provenientes da digestão intestinal e da proteína microbiana, proteína não degradada no rúmen e proteína endógena (NRC, 2011). Esta situação está, provavelmente,

relacionada à redução das proteínas verdadeiras (Tabela 4) das silagens com avanço do tempo de estocagem.

Observamos um efeito quadrático na digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) atingindo seu maior nível de 73,50 % aos 221 dias, com posteriormente redução (Tabela 6). Essa redução na digestibilidade pode ser justificada pelo aumento das frações insolúveis (Tabela 4) das silagens. Os nutrientes digestíveis totais (NDT) apresentou um aumento de 0,001 pontos percentuais a cada dia a mais de estocagem, enquanto que a energia líquida de lactação (ELI) e estimativa de produção de leite não se ajustaram a análise de regressão, no entanto observamos uma tendência de aumento nessas variáveis com prolongar do tempo. De acordo com Zabeli et al. (2012) às exigências nutricionais da lactação para vacas leiteiras requerem alta ingestão de energia para amparar a produção de leite e condição corporal.

A digestibilidade *in vitro* do FDN (DIVFDN) não foi afetada pelo tempo de estocagem (Tabela 6). No entanto, Der Berdrosian et al. (2012) e Young et al. 2012 observaram redução na DIVFDN, o que foi relacionado à solubilização da fibra no início da fermentação. Contudo, nenhum efeito foi observado nas pesquisas Ferraretto et al. (2015). As razões para as diferenças entre os estudos são desconhecidos, mas pode ser atribuída as diferenças nas estações do ano, aos híbridos avaliados, ou técnicas usadas para estimar a DIVFDN.

Em relação à estimativa de produção de leite, observamos que os dados não se ajustaram à análise de regressão, não sofrendo influência pelo tempo de estocagem, apresentando valores médios de 1258 kg/t/MS e 14714,02 Kg/ha<sup>-1</sup>. Resultados semelhantes foram relatados por Oliveira et al. (2011), avaliando a influência da altura de corte da planta de milho na ensilagem, observaram teores médios da produtividade de leite de 1226 kg/t/MS e 17956 kg/ha<sup>-1</sup>, quando o milho foi cortado a 15 cm do solo.

## Conclusão

O aumento no tempo de estocagem reduz a qualidade das silagens, devido à elevação dos teores de N-amoniaco, NNP, parede celular e às perdas de proteína verdadeira e carboidratos solúveis.

As silagens de milho devem ser monitoradas regularmente durante todo o ano e devem ser realizadas as mudanças apropriadas nas formulações das dietas, devido às alterações sofridas no valor nutritivo deste alimento.

## Referências bibliográficas

Ahmed, S., Jabbar, M.A., Khaliq, A., Javed, k., Saima, N.A, Shahzad. F e Fiaz. M. (2014). Effect of varying NDF levels on productive performance in lactating Nili Ravi Buffaloes. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, 24, 1008-1011.

American Oil Chemists' Society -AOCS. (2005). Office Procedure, Approved Procedure Am 5-04, **Rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction**, Urbana, IL.

Arcari, M.A., Martins, C.M.M.R., Tomazi T. e Santos M.V. (2016). Effect of the ensiling time of hydrated ground corn on silage composition and *in situ* starch degradability. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 53, 60-71. doi: 10.11606/issn.1678-4456.v53i1p60-71.

Association of Official Analytical Chemists- AOAC. (1995). **Official methods of analysis**. 16th ed. AOAC International, Arlington.

Carvalho, G.G.P.D., Garcia, R., Pires A.J.V., Pereira, O.G., Fernandes, F.E.P., Cecon, P.R. e Azevêdo, J.A.G. (2008). Fracionamento de proteínas de silagem de capim-elefante emurhecido ou com farelo de cacau. **Ciência Animal Brasileira**, 9, 648-656.

Cornell Net Carbohydrate and Protein System- **CNCPS**. (2002), Ithaca: Cornell University, Software, version 5.0.

De Boever, J.L., Aerts, J.M., Vanacker, D.L., De Brabander, D.L. (2005). Evaluation of the nutritive value of maize silages using a gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 255-265. doi:10.1016/j.anifeedsci.2005.04.019.

Der Bedrosian, M.C., Nestor, K.E., e Kung Jr, L., (2012). The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**, 95, 5115-5126. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4833>.

Detmann, E., Gionbelli, M.P., Huhtanen, P. (2014). A meta-analytical evaluation of the regulation of voluntary intake in cattle fed tropical forage-based diets. **Journal of Dairy Science**, 92, 4632–4641. doi: 10.2527/jas.2014-7717

Embrapa-CNPS. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Embrapa- Produção de informação. 412p, 2006.

Ferraretto, L.F., Taysom, K., Taysom D.M., Shaver, R.D., Hoffmaman, P.C., (2014). Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia nitrogen and ruminal *in vitro* starch digestibility in high-moisture corn samples. **Journal of Dairy Science**, 97, 3221-3227. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7680>.

Ferraretto, L.F., Shaver, R.D., Massie, S., Singo, R., Taysom, D.M., e Brouillette, J.P. (2015). Effect of ensiling time and hybrid type on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal *in vitro* starch and neutral detergent fiber digestibility in whole-plant corn silage. **The Professional Animal Scientist (PAS)**, 31, 146–152. <http://dx.doi.org/10.15232/pas.2014-01371>

Goering, H.k., Van Soest, P.J. (1970). Forage fiber analysis: apparatus reagents, procedures and some application. **Agricultural Handbook**, 379. Washington, D.C.

Hall, M.B, (2000). **Neutral detergent-soluble carbohydrates, nutritional relevance and analysis. A laboratory manual**. Florida: University of Florida, 42p. (Bolletín 339).

Hentz, F., Velho, J.P., Nörnberg, J.L., Harygert-Velho, I.M.P., Henz, E.L., Henn, J.D., ... Zardin, P.B. (2017). Fractionation of carbohydrates and nitrogenous constituents of late-crop corn silages ensiled with different specific masses. **Semina: Ciências Agrárias**, 38, 491-502. DOI: 10.5433/1679-0359.2017v38n1p491

Herrmann, C., Heiermann, M., and Idler, C. (2011). Effects of ensiling, silage additives and storage period on methane formation of biogas crops. **Bioresource Technology**, 102, 5153–5161. doi:10.1016/j.biortech.2011.01.012.

Hoffman, P.C., Esser, N.M., Shaser, R.D., Coblenz, W.K., Scott, M.P., Bodnar, A.L.... Charley, R.C. (2011). Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, 94, 2465–2474. doi: 10.3168/jds.2010-3562.

Huntington, G.B. (1990). Energy metabolism in the digestive tract and liver of cattle: influence of physiological state and nutrition. **Reproduction and Nutrition**, 30, 35-47. DOI: 10.1051/rnd:19900103.

Kleinschmit, D.H. & Kung Jr. L. (2006). The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage during various stages of

ensiling. **Journal of Dairy Science**, 89, 3999–4004. DOI: 10.3168/jds.S00220302(06)72443-2.

Köppen, W. & Geiger, R. (1928). ‘**Klimate der Erde. Gotha: Verlag Justus Perthes**’, Wall-map 150cmx200cm.

Kozloski, G.V. (2017). **Bioquímica dos ruminantes**. 2. ed. Santa Maria: UFSM.

Kung, Jr. L., Shaver, R.D., Grant, R.J. e Schmidt, R.J. (2018). Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. **Journal of Dairy Science**, 101, 4020–4033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>

Lanzas, C., Tedeschi, L.O., Seo, S. e Fox, D.G. (2007). Evaluation of protein fractionation systems used in formulating rations for dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, 90, 507–521. doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.08.025.

Leão, G.F.M., Jobim, C.C., Neumann, M., Horst, E.H., Santos, S.K., Venancio, B.J., Santos L.C. (2017). Nutritional composition and aerobic stability of winter cereal silage at different storage times. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, 39, 131-136. Doi: 10.4025/actascianimsci.v39i2.34270

Licitra, G., Hernandez, T.M., Van Soest, P.J. (1996). Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, 57, 347-358.

Lindgren, S.E., Axelsson, L.T. and Mcfeeters, R.F. (1990). Anaerobic *L-lactate* degradation by *Lactobacillus plantarum*. **FEMS Microbiology Letters**, 66, 209-214.

McDonald, P.; Henderson, A. R. e Heron, S. J. E. (1991). **The biochemistry of silage**. 2nd ed. Chalcombe Publications.

Medeiros, S.R., Gomes, R.C.; Bungenstab, D.J. (2015). **Nutrição de bovinos de corte: fundamentos e aplicações**. Brasília, DF: Embrapa, 18 p.

Muck, R.E. (2010). Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39, 183-191.

NRC, **Exigências nutricionais de peixe e camarão** (2011). National Academies Press, Washington DC, EUA.

Oliveira, F.C.L., Jobim, C.C., Silva, M.S., Calicto Junior, M., Bumbieris Junior, V.H., Roman, J. (2011). Produtividade e valor nutricional da silagem de híbridos de milho em diferentes alturas de colheita, **Revista Brasileira de Zootecnia**, 40, 720-727.

Oms-Oliu, G., Hertog, M.L.A.T.M., Van de Poel, B., Ampofo-Asiama, J., Geeraerd, A.H., Nicolai, B.M. (2011). Metabolic characterization of tomato fruit during preharvest development, ripening, and postharvest shelf-life. **Postharvest Biology and Technology**, 62, 7–16. Doi:10.1016/j.postharvbio.2011.04.010.

Pahlow, G.; Muck, R.E.; Driehuis, F. Microbiology of ensiling. **In: Silage Science and Technology**. D.R. Buxton, R. E. Muck, and J. H Harrison, ed. American Society of Agronomy. Madison, WI. p. 31-93, 2003.

Playne, M.J. & McDonald, P. (1966). The buffering constituents of herbage and of silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 17, 264-268.

Ribeiro, K.G.; Garcia, R.; Pereira, O.G.; Valadares Filho, S.C.; Cecon, P.R. (2001). Eficiência microbiana, fluxo de compostos nitrogenados no abomaso, amônia e pH ruminais, em bovinos recebendo dietas contendo feno de Capim- Tifton 85 de diferentes idades. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 30, 581-588.

Rolas, Rede Oficial de Laboratórios de Análise de Solo e de Tecido Vegetal (2004). ‘Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina’, **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, ed.10, p. 400.

Russell, J. B. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluation cattle diets: Ruminant fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3551-3581, 1992.

Saricicek, B.Z. (2007). **Livestock Nutrition**. Ondokuz Mayıs University Agricultural. Fuc Publ:37, 435p, Samsun.

Schofield, P., Pitt, R.E., e Pell, A.N. (1994). Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. **Journal Animal Science**, 72, 2980-2991.

Shaver, R.D.; Lauser, J.G. (2006). Review of Wisconsin corn silage milk per ton models. **Journal of Dairy Science**, 89, p.282.

Senger, C.C.D., Kozloski, G.V., Sanchez, L.M.B., Mesquita, F.R., Alves, T.P & Castagnino D.S. (2008). Short communication: Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, 146, 169-174. Doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.12.008.

Senger, C.C.D., Mühlbach, P.R.F., Sanchez, L.M.B., Kosloski, G.V., Kist, G.P., Lima, L.D., Netto, D.P.N. (2007). Comparação entre os métodos químico, *in situ* e *in vitro* para estimativa do valor nutritivo de silagens de milho. **Ciência Rural**, 37, 835-840.

Silva, D.J & Queiroz, A.C. (2002). ‘**Análise de alimentos: Métodos químicos e biológicos**’, Universidade Federal de Viçosa, MG: Editora UFV, 3ª ed, p.165.

Sniffen, C.J., O’Connor, J., Van Soest, P.J., Fox, D.J., Russell, J.B. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, 70, 3562-3577.

Sorieul, M., Dickson, A.J., Hill, S., e Pearson, H. (2016). Plant fibre: Molecular structure and biomechanical properties, of a complex living material, influencing its deconstruction towards a biobased composite. **Materials- MDPI**, Review, 9, 1-36. Doi:10.3390/ma9080618.

Statistical analysis system- SAS, **Statistical analysis system user's guide**. Cary: Statistics Cary SAS Institute.

Tangerman, A. & Nagengast, F.M. (1996). A gas chromatographic analysis of fecal short-chain fatty acids, using the direct injection method. **Analytical Bioanalytical**, 236, 1–8. DOI: 10.1006/abio.1996.0123

Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllen, A.B. e France, J. (1994). A simple gas production using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, 48, 185-197.

Tilley, J.M.A. & Terry, R.A. (1993). A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crop. **Journal British Grassland Society**, 18, 104-111.

Valadares Filho, S.C., Machado, P.A.S., Furtado, T., Chizzotti, M.L., Amaral, H.F. (2006). **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos**. Viçosa, MG: UFV, 329p.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B. e Lewis, B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharide in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, 74, 3583- 3597.

Van Soest, P.J. (1994). **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. Ithaca: Cornell University Press, p. 476.

Weatherburn, M.W. (1967). **Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia**. **Analytical Chemistry**. Analytical Chemistry, 39, 971-974.

Walter, M., Silva, L.P., Perdomo, D.M.X. (2005). Amido disponível e resistente em alimentos: adaptação do método da AOAC 996.11, **Alimentos e Nutrição**, 16, 39-43.

Weinberg, Z.G and Chen, Y. (2013). Effects of storage period on the composition of whole crop wheat and corn silages. **Animal Feed Science and Technology**, 185, 196-200. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.08.009>.

Wilkinson, J. M.; Davies, D. R. (2012).The aerobic stability of silage: key findings and recent developments. **Grass and Forage Science**, 68, 1-19. doi: 10.1111/j.1365-2494.2012.00891.x

Windle, M.C., Walker, N. e Kung, Jr. L. (2014). The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, 97, 1707-1712. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7586>.

Yang, J.Y., Seo, J., Kim, H.J., Seo, S., Jong-K, Ha. (2010). Nutrient Synchronization: Is it a suitable strategy to improve nitrogen utilization and animal performance?. **Asian Australasian Journal Animal Sciences**, 23, 972- 979. DOI: 10.5713/ajas.2010.r.04

Young, K.M., Lim, J.M., Der Bedrosian, M.C., & Kung, Jr. L. (2012). Effect of exogenous 2protease enzymes on the fermentation on nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**, 95, 6687-6694. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5628>.

Zebeli, Q., Aschenbach, J.R., Tafaj, M., Ametaj, B.N e Drochner, W. (2012). Role of physically effective fiber and estimation of dietary fiber adequacy in high-producing dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Invited review, 95, 1041-1056. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4421>

Tabela 1- Composição nutricional, proteica e estrutural da planta de milho do híbrido AG 8690, utilizada na elaboração das silagens.

Composição Nutricional (% MS)						
Variáveis	MS	MM	FDN	FDA	LDA	CT**
	27,97	5,47	45,16	22,52	3,72	10,12
Variáveis	DIVMS	DIVMO	NDT	Amido	EE	AS
	66,89	68,69	66,85	17,43	2,28	6,19
Composição Proteica (% PB)						
Variáveis	PB	NIDN	NS	NNP	NIDA	
	8,51	24,60	36,32	34,93	11,51	
Composição Estrutural (%)*						
Variáveis	Folha	Colmo	Material Senescente	Palha	Espiga	Produção***
	13,69	31,11	3,19	5,6	47,76	12487,01

MS= Matéria seca; MM = Matéria mineral; FDN = Fibra detergente neutro; FDA = Fibra detergente ácida; LDA= lignina, AS= Açúcares solúveis, CT = \*\*Capacidade tamponante (meq.HCl/100g de MS); DIVMS= Digestibilidade *in vitro* da matéria seca; DIVMO = Digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica; NDT= Nutrientes digestíveis totais; EE= Extrato etéreo; PB= Proteína bruta; NIDN= Nitrogênio insolúvel em detergente neutro; NS= Nitrogênio solúvel; NNP= Nitrogênio não proteico; NIDA= Nitrogênio insolúvel em detergente ácido;. \* Participação (%) de cada componente com base na matéria seca da foragem a ser ensilada. \*\*\* Produção em Kg MS/ha.

Tabela 2- Valor nutritivo da silagem de milho AG 8690 com distintos tempos de estocagem.

Variáveis (% MS)	Dias de estocagem				EPM	Equações	R <sup>2</sup>	P
	45	90	180	360				
MS	29,08	28,64	26,59	26,87	0,81	$y = 29,00 - 0,00713984x$	0,24	0,05
MM	4,80	4,78	5,02	4,89	0,05	$y = 4,87$	-	0,50
MO	95,20	95,21	94,97	95,09	0,05	$y = 95,12$	-	0,34
HEMI	17,90	17,22	17,56	18,8	0,33	$y = 17,87$	-	0,06
EE	3,02	2,40	3,25	3,48	0,17	$y = 2,59 + 0,002355556x$	0,49	0,05
PB	8,76	8,42	8,47	8,20	0,21	$y = 8,70 - 0,001450725x$	0,42	0,02
NS	50,49	57,47	64,21	64,72	1,88	$y = 43,74 + 0,17326147x - 0,00031989x^2$	0,99	<,0001
N-NH <sub>3</sub> /NT	4,32	4,76	5,53	6,32	0,31	$y = 4,18 + 0,006193237x$	0,62	0,0003

MS= matéria seca, DIVMO= digestibilidade 'in vitro' da matéria orgânica, PB= proteína bruta, NS= nitrogênio solúvel, EE= extrato etéreo, N-NH<sub>3</sub>= N-amoniaco em nitrogênio total.

Tabela 3- Volume de produção de gás e dos parâmetros cinéticos de degradação das silagens de milho AG 8690 com distintos tempos de estocagem.

Variáveis (% MS)	Dias de estocagem					EPM	Equações	R <sup>2</sup>	P
	0*	45	90	180	360				
PG (ml)	175,47	172,39	162,81	162,63	157,90	2,87	$y = 170,07 - 0,0362266x$	0,48	0,003
A (ml)	60,13	68,24	58,88	64,61	55,74	2,76	$y = 66,78 - 0,02912657x$	0,32	0,02
B (%/h)	10,81	11,84	12,21	12,39	13,64	0,37	$y = 11,58 + 0,0055018x$	0,48	0,002
C (h)	5,94	5,85	5,94	5,95	5,65	0,25	$y = 5,85$	-	0,47
D (ml)	111,00	99,75	99,33	93,71	97,78	2,52	$y = 97,64$	-	0,11
E (%/h)	2,48	2,58	2,57	2,65	2,53	0,05	$y = 2,58$	-	0,56

PG: produção total de gás após 96 horas de incubação (ml); A: volume de gás originado da fração de rápida digestão (ml); B: taxa de degradação da fração de rápida digestão (%/h); C: tempo de colonização (horas); D: volume de gás originado da fração de lenta degradação (ml); E: taxa de degradação da fração de lenta degradação (%/h). \* O tratamento zero não foi considerado na análise estatística.

Figura 1- Efeito do tempo da estocagem nas frações fibrosas de silagens de milho AG 8690.

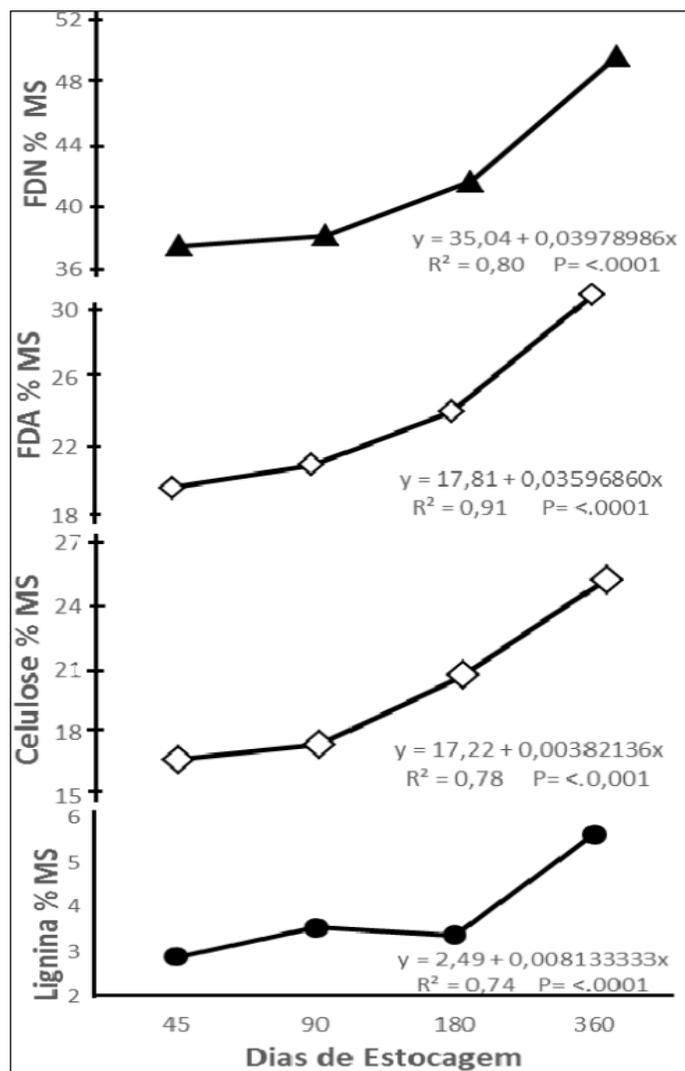


Figura 2- Efeito do tempo de estocagem nas concentrações dos ácidos orgânicos e do pH de silagens de milho AG 8690.

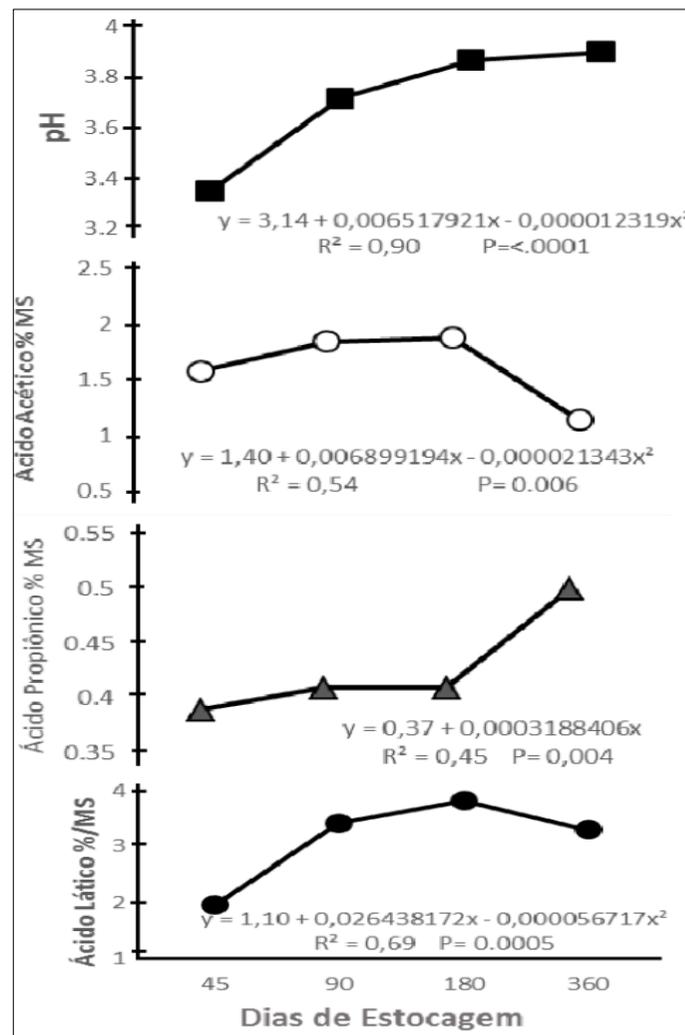


Tabela 4- Nitrogênio total (NT) e composição das frações proteicas de silagens de milho AG 8690 com diferentes tempos de estocagem.

Fração proteica (% NT)	Dias de estocagem				EPM	Equações	R <sup>2</sup>	P
	45	90	180	360				
NT	1,40	1,33	1,44	1,31	0,03	y= 1,39	-	-
A	47,73	55,28	61,80	63,16	1,90	y = 41,09 + 0,17466756x - 0,00031547x <sup>2</sup>	0,98	<.0001
B1	2,74	2,19	2,40	1,55	15,72	y = 2,77 - 0,003241546x	0,62	0,01
B2	39,96	32,62	27,15	25,27	4,00	y = 38,13 - 0,04080676x	0,97	0,0002
B3	6,05	5,25	4,06	5,64	7,78	y = 7,37 - 0,031408065x + 0,000073815x <sup>2</sup>	0,84	0,01
C	3,49	4,65	4,57	4,36	8,40	y= 4,27	0,63	0,08

NT= Nitrogênio total, A= Nitrogênio não proteico, B= proteína verdadeira potencialmente degradada no rúmen, sendo que B1= rapidamente degrada, B2= degradação intermediária, B3= lentamente degradada, C= proteínas insolúvel e indigestível no trato gastrointestinal (NIDA)

Tabela 5- Carboidratos totais (CHO), carboidratos não fibrosos (CNF) e frações dos carboidratos, proposto por Lanzas et al. (2007), de silagens de milho AG 8690 com diferentes períodos de estocagem.

Frações (g/Kg MS)	Dias de estocagem				EPM	Equações	R <sup>2</sup>	P
	45	90	180	360				
CHO	834,15	845,12	829,15	834,25	4,14	y=835,66	-	0,52
CNF	468,70	471,34	420,33	332,47	5,78	y = 500,91 - 0,4604435x	0,97	<.0001
A1	20,85	23,68	24,15	17,40	0,95	y = 19,00 + 0,07088710x - 0,0002121x <sup>2</sup>	0,79	0,02
A2	19,50	34,25	38,25	33,00	2,59	y = 1,104 + 0,02643172x - 0,000056717x <sup>2</sup>	0,72	0,04
A3	0	0	0	0	-	-	-	-
A4	28,63	32,41	25,41	30,00	1,90	y= 29,11	-	0,38
B1	187,90	189,25	205,06	178,75	2,88	y = 173,88 + 0,3715523x - 0,0011018x <sup>2</sup>	0,92	0,001
B2	211,83	198,80	118,34	63,36	7,77	Y= 216,36 - 0,3827720x	0,92	0.0002
B3	286,56	295,02	327,56	362,95	4,09	y = 276,29 + 0,2473314x	0,94	<.0001
C	78,85	78,76	81,24	138,83	3,27	y = 61,07 + 0,19761932x	0,83	0,001

A1=soma dos AGV (acético+propiónico+butírico e isobutírico), A2= ácido láctico, A3= outros ácidos orgânicos, A4= açúcares solúveis, B1=amido, B2= fibra solúvel, B3= fibra digestível, C= fibra indigestível.

Tabela 6- Parâmetros utilizados para a simulação da dieta e os teores de digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) e da FDN (DIVFDN), nutrientes digestíveis totais (NDT) e energia líquida para lactação(EL<sub>1</sub>) das silagens com diferentes tempos de estocagem e a estimativa da produtividade de leite.

Variáveis	Dias				EPM	Equações	R <sup>2</sup>	P
	45	90	180	360				
Parâmetros de simulação de dieta								
PM estimada Leite (Kg/d)	27,40	26,45	26,13	24,10	0,23	Y= 27,68 - 0,00979710x	0,89	0,0004
EM estimada Leite (Kg/d)	32,20	31,50	31,15	29,15	0,27	Y= 32,56 - 0,00927536x	0,85	0,001
Dias para ganhar 1 ECC	85,00	94,50	100,00	159,50	1,15	Y= 70,13 + 0,23478261x	0,77	0,004
GMD (kg/d)	1,10	0,95	0,90	0,60	0,01	Y= 1,14 - 0,001478261x	0,88	0,0005
Digestibilidade e energia								
DIVMS_48 h	64,59	71,33	72,04	68,86	2,12	Y=61,33+0,11006075x-0,00024883x <sup>2</sup>	0,40	0,02
DIVFDN_48h	63,55	62,27	61,69	62,99	4,07	Y=62,70	-	0,95
NDT (%)	66,10	65,11	69,94	69,79	1,23	Y=65,33 + 0,01420870x	0,50	0,05
EL <sub>1</sub> (Mcal/kg)	1,33	1,31	1,44	1,41	0,02	Y=1,31	-	0,08
Produção de leite								
kg/t MS	1245	1213	1385	1349	55,69	Y=1228,44	-	0,09
Kg/ha	15408	14331	15750	15404	529,0	Y=14968,37	-	0,64

PM estimada para Leite= proteína metabolizável para produção de leite, EM estimada para Leite= energia metabolizável estimada para produção de leite, Dias para ganhar1 ECC= dias necessários para que os animais ganhem uma unidade de condição corporal, GMD= ganho médio diário,

## **Artigo 2- AVALIAÇÃO DAS PERDAS E ESTABILIDADE DA SILAGEM DE MILHO AO LONGO DO TEMPO DE ESTOCAGEM E DE EXPOSIÇÃO AO AR**

### **Resumo**

Objetivou-se investigar os efeitos do tempo de estocagem e de exposição ao ar das silagens de milho sobre as perdas anaeróbicas, MS e a estabilidade aeróbica. Os silos foram abertos com distintos tempos de estocagem 45, 90, 180 e 360 dias e permaneceram expostos ao ambiente com temperatura controlada de 25 °C durante 96 horas. As medições de temperatura, pH, N-NH<sub>3</sub> e MS foram realizadas uma vez ao dia e a avaliação nutricional das silagens foi realizada na abertura e após as 96 horas de exposição ao ar. Os teores de MS e MM não foram afetados e a PB, FDN, FDA, celulose aumentaram independente dos tratamentos avaliados, enquanto que a lignina aumentou na abertura e nas 96 horas obtendo sua maior concentração com 224 dias. Os teores de digestibilidade, NDT e amido aumentaram no momento da abertura com avanço do tempo de estocagem, e não foram afetadas após as 96 horas de exposição ao ar, enquanto que a concentração dos ácidos orgânicos aumentou ao longo do tempo de estocagem. Não observamos diferença nas perdas e RMS, enquanto que a produção de efluentes aumentou com o decorrer do tempo de armazenamento. N-amoniaco reduziu, enquanto que a temperatura, pH e MS aumentaram com o tempo de exposição ao ar, independente dos tratamentos avaliados. A perda de estabilidade ocorreu antes das 24 horas de exposição ao ar, em todos os tempos de estocagem avaliados. Os resultados demonstram que ocorreu alteração na composição química, e na produção de efluentes, o qual acarretou no aumento da fração fibrosa das silagens ao longo do tempo de exposição ao ar e de estocagem.

**Palavras-chave:** Deterioração aeróbica, Efluentes, Ensilagem, Perdas de MS, Temperatura.

## **EVALUATION OF LOSSES AND STABILITY OF CORN SILAGE THROUGH TIME OF STORAGE AND AIR EXPOSURE**

### **Abstract**

This study aimed to investigate the effects of storage time and exposure to air of silage of

maize on the losses, MS anaerobic and aerobic stability. The silos were opened with different times of storage 45, 90, 180 and 360 days and remained exposed to the environment with controlled temperature of 25 °C during 96 hours. The measurements of temperature, pH, N-NH<sub>3</sub> and MS were performed once a day and the nutritional assessment of the silages was performed at the opening and after 96 hours of exposure to the air. The levels of MS and MM were not affected and the CP, NDF, ADF, pulp increased regardless of the treatments evaluated, while the lignin increased openness and in 96 hours getting its highest concentration with 224 days. The levels of digestibility, NDT and starch increased in the moment of opening with advancement of storage time, and were not affected after 96 hours of exposure to air, while the concentration of organic acids increased over the time of storage. We did not find any difference in losses and RMS, while the production of effluent increased with the passage of time of storage. N-ammoniacal nitrogen reduced, while the temperature, pH and MS increased with the time of exposure to air, regardless of the treatments evaluated. The loss of stability occurred before the 24 hours of exposure to air, at all times of storage evaluated. The results demonstrate that occurred change in chemical composition, and the production of effluents, which has resulted in the increase of fiber fraction of silages over time from exposure to air and storage.

**Keywords:** Aerobic deterioration, Effluents, Silage, Losses of DM, Temperature.

## INTRODUÇÃO

Durante o processo fermentativo da silagem na fase anaeróbica ocorre uma série de processos que podem causar perdas de nutrientes pela produção de efluentes e gases, que são indesejáveis e resultam na redução da qualidade da silagem, perdas estas que devem ser minimizadas ao máximo. Essas perdas anaeróbicas que são causadas por inadequada conservação dos materiais, podem representar até 40 % do material ensilado (MCDONALD et al., 1991). Enquanto que as perdas aeróbicas, em silagem de milho, podem causar redução de até 20 % da matéria seca da silagem (TABACCO et al., 2009).

Na fase de exposição ao ar, ao se abrir o silo, todas as silagens se deterioram, devido à atividade da microbiota aeróbica, que pode influenciar negativamente a qualidade do material e com isso afetar a rentabilidade da atividade, causando graves prejuízos econômicos aos

produtores (WEINBERG et al., 2009). O ar é uma das principais causas de deterioração da silagem, uma vez que permite a atividade de microrganismos indesejáveis, tais como leveduras e mofos, que resultam na alteração da composição nutricional e de fermentação da mesma (WOOLFORD, 1990).

A estabilidade aeróbia da silagem é avaliada como a resistência da massa de forragem à deterioração após a abertura do silo, ou seja, a velocidade com que a massa deteriora após exposta ao ar (JOBIM et al., 2007). A perda de estabilidade aeróbia das silagens geralmente é manifestada por aumento de temperatura e alteração do pH. É indesejável que a silagem tenha a sua qualidade comprometida em razão da exposição ao ar, pois as alterações sobre a composição podem impactar negativamente no desempenho dos animais (KUNG et al., 1998).

Essas perdas no valor nutritivo das silagens estão relacionadas ao desenvolvimento de agentes patogênicos e na composição microbiológica (Weinberg et al., 2011) e das perdas de MS (Tabacco et al., 2011), visto que essas perdas resultam frequentemente em redução no teor de energia e na qualidade nutricional das silagens. A exposição prolongada ao oxigênio (até 14 d) do material ensilado pode ocorrer antes mesmo da remoção da silagem, pois o oxigênio pode penetrar a massa da silagem e com isso causar a deterioração aeróbia do material (TABACCO et al., 2011).

Apesar de algumas perdas serem inevitáveis, uma boa gestão e compreensão dos efeitos relacionados à deterioração aeróbica da silagem, parece ser importante para quantificar as perdas de MS e nutricional que ocorrem durante a exposição ao ar e no período de armazenamento das silagens, para minimizar os prejuízos econômicos. Portanto, com o objetivo de investigar os efeitos do tempo prolongado de estocagem e da exposição ao ar após a abertura do silo em silagens de milho sobre as perdas inerentes aos processos fermentativo da matéria seca e a qualidade das silagens foi desenvolvido o presente trabalho.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi conduzido no Grupo de Estudos em Aditivos na Produção Animal (GEAPA) UFSM, localizado na região fisiográfica da Depressão Central, Rio Grande Sul, Brasil, no período de outubro de 2016 a junho de 2018. Foi utilizado o híbrido de milho comercial (Agrocere AG 8690), em uma área experimental de 1.500 m<sup>2</sup>, semeada em outubro de 2016, em linhas com espaçamento de 45 cm e densidade de 3,6 sementes/m linear. Na

ocasião da semeadura foi realizada a adubação conforme a necessidade expressa pelo Manual de Adubação e Calagem (ROLAS, 2004). As plantas de milho foram colhidas a uma altura média do solo de 20 cm, quando apresentavam a maior parte dos grãos no estágio de 50 % da linha leite, sendo fragmentada em triturador com tamanho médio de partículas de 2 cm.

A elaboração das silagens foi realizada no dia 08 de abril de 2017, em mini silos experimentais. As silagens foram adequadamente compactadas em baldes de 30 litros e hermeticamente fechadas com o uso de quatro sacos plásticos para proteção contra a entrada de ar e luminosidade. A sequência dos sacos plásticos repetiu a seguinte ordem: o 1º saco com furos no fundo tinha por finalidade a saída dos efluentes e acomodação do material ensilado, o 2º saco, continha uma camada de TNT mais areia lavada e seca em estufa que foi utilizada para absorção dos efluentes; o 3º saco para melhor vedação dos demais e o 4º saco, escuro para proteção contra luminosidade. Os silos experimentais continham 6 kg de silagem e 2 kg de areia.

Os tratamentos foram os tempos de estocagem de 45, 90, 180 e 360 dias, contados a partir do fechamento das silagens experimentais, sendo utilizadas, quatro repetições por tratamento. Foram realizadas as pesagens dos silos antes e após a coleta das amostras, para a avaliação das perdas. Para determinação da estabilidade foram avaliadas a temperatura, pH, nitrogênio amoniacal em percentagem do nitrogênio total (N-NH<sub>3</sub>) e a matéria seca (MS) no momento da abertura considerada hora zero e posteriormente nas 24, 48, 72 e 96 horas após a exposição das silagens ao ar.

Para avaliação da estabilidade aeróbica das silagens, cerca 5 kg de silagem ficaram expostas ao ar de acordo com a metodologia descrita por Keady e Kiel (1996), os silos foram mantidos em um ambiente climatizado com temperatura constante em 25 °C. Os silos foram levados a este ambiente um dia antes da abertura para climatização dos mesmos. As temperaturas das silagens expostas foram monitoradas utilizando-se termômetro de mercúrio inseridos no centro dos silos antes da retirada das amostras. O rompimento da estabilidade aeróbica, foi definido como o número de horas para a temperatura do silo subir 2 °C acima da temperatura inicial.

Foram coletados 200g de amostra de cada silagem, sendo levadas à estufa com circulação forçada de ar e temperatura média de 55 °C, até atingir peso constante, para a determinação da matéria parcialmente seca. Somente as amostras coletadas no momento de abertura dos silos (hora 0) e nas 96 horas de exposição ao ar, foram moídas para posterior análise da composição química em um moinho do tipo “Willey” com peneira de malha de 1

mm (análise química) de 2 mm (estimativa de DIVMO). Imediatamente após a obtenção das amostras procedeu-se a determinação do pH conforme metodologia de Silva e Queiroz, (2002). Em outra amostra foi realizada a extração do líquido da silagem por meio de prensagem (prensa Carver), sendo nove ml filtrados em papel filtro de 0,5 micras e posteriormente adicionado um ml de ácido sulfúrico 7,2 N, para conservação da amostra e posterior análise do nitrogênio amoniacal pelo método de calorimetria de acordo com WEATHERBURN (1967).

Foram realizadas as seguintes análises, matéria seca total (MS) determinada em estufa a 105 °C durante um período mínimo de 8 horas, matéria mineral (MM) pela incineração em mufla a 550 °C durante 4 horas e para determinação de proteína bruta (PB) pelo método micro Kjeldhal, segundo AOAC (1995) e extrato etéreo (EE) de acordo com AOCS (2005). Os níveis de fibra em detergente neutro (FDN) foram obtidos com o uso de  $\alpha$ -amilase termoestável (Termamyl 120L, Novozimes Latin America, LTDA) com auxílio de autoclave, conforme técnica adaptada por Senger et al. (2008) e o conteúdo de fibra em detergente ácido (FDA) e o teor de lignina (LDA), de acordo a metodologia de Van Soest et al. (1991), sendo a LDA extraída com a uso de ácido sulfúrico 72 %. Os teores de hemicelulose (HEM) e celulose foram obtidos por diferenças entre os teores (FDN e FDA) e (FDA e lignina), respectivamente. O ensaio de digestibilidade “*in vitro*” da matéria orgânica (DIVMO), foi conduzido segundo as metodologias de Tilley e Terry (1963) e Goering e Van Soest (1970), com inóculo de bovinos fistulados, os quais foram adaptados com silagem de boa qualidade. O NDT foi inferido através da digestibilidade da matéria orgânica e pelo valor de FDN proposto por Cappelle et al. (2001), pela fórmula  $NDT=3,71095-0,129014FDN+1,02278DMO$ .

As perdas oriundas do processo fermentativo foram calculadas de acordo com fórmulas citadas por Jobim et al. (2007), sendo que os silos e o conjunto areia+TNT+saco foram pesados no momento da confecção e na abertura das silagens e os cálculos foram realizados através das seguintes equações:

$$E = (Pab - Pen) / (MVfe) \times 1000 \quad (1)$$

E = Produção de efluente (kg/t de massa verde);

Pab = Peso do conjunto (silo+areia+ TNT) na abertura (kg);

Pen = Peso do conjunto (silo+areia+TNT) na ensilagem (kg);

MVfe = Massa verde de forragem ensilada (kg).

$$G = [(PCen - Pen) * MSen] - [(PCab - Pen) * MSab] \times 100 [(PCen - Pen) * MSen] \quad (2)$$

G = Perdas por gases em % da MS;

PCen = Peso do silo cheio na ensilagem (kg);

Pen = Peso do conjunto (silo + areia + TNT) na ensilagem (kg);

MSen = Teor de MS da forragem na ensilagem (%);

PCab = Peso do silo cheio na abertura (kg);

MSab = Teor de MS da forragem na abertura (%).

$$RMS = (MFab \times MSab) / (MFfe \times MSfe) * 100 \text{ Onde:} \quad (3)$$

RMS = índice de recuperação de matéria seca;

MFab= massa de forragem na abertura;

MSab= teor de MS na abertura;

MFfe = massa de forragem no fechamento;

MSfe = teor de MS da forragem no fechamento.

Enquanto que, as perdas de matéria seca foram adaptadas de JOBIM et al. (2007), sendo realizadas de acordo com a seguinte equação:

$$PMS = [(MSi - MSf)] / MSi \times 100 \quad (4)$$

PMS= Perda total de MS;

MSi = Quantidade de MS inicial, peso do silo após enchimento – peso do conjunto vazio, sem a forragem, antes do enchimento (tara seca) x teor de MS da forragem na ensilagem.

MSf = Quantidade de MS final. Peso do silo cheio antes da abertura – peso do conjunto vazio, sem a forragem, após a abertura dos silos (tara úmida) x teor de MS da forragem na abertura.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e quatro repetições cada. O modelo experimental foi:  $y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$ , onde  $y_{ij}$  = valor observado na unidade experimental que recebeu o tratamento  $i$ , repetição  $j$ ;  $\mu$  = efeito geral da média;  $t_i$

= efeito do tratamento  $i$ ;  $e_{ij}$  = erro aleatório (resíduo). As análises estatísticas foram divididas em duas etapas a primeira avaliando o tempo e estocagem e a segunda considerando as horas de exposição das silagens ao ar, sendo realizadas análises de regressão em ambos tratamentos. A escolha dos modelos foi baseada no valor de significância ( $P > 0,05$ ), e na significância dos coeficientes linear e quadrático, com auxílio do programa estatístico SAS, versão SAS<sup>®</sup> University Edition.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliando os efeitos dos tempos de estocagem das silagens de milho sobre a composição química no momento da abertura (0 horas) e após 96 horas de exposição ao ar (Tabela 1), foi observado que a matéria mineral não se ajustou aos modelos de regressão ( $P < 0,05$ ). Em contraste, na hora zero a matéria seca apresentou decréscimo linear, enquanto que com 96 horas não foi observada diferença estatística em função do tempo de estocagem. Essa redução do teor de MS pode ser justificada no processo de oxidação da glicose que produz dependendo da rota metabólica distintos ácidos orgânicos, água e gás carbono (MUCK, 2010).

A proteína bruta das silagens apresentou comportamento quadrático para ambos os horários, com os maiores níveis de 8,08 % aos 186 dias de estocagem na hora zero e de 8,69 % aos 177 dias de estocagem nas 96 horas de exposição ao ar. A FDN, FDA e celulose, apresentaram efeito linear positivo (Tabela 1), ou seja, aumentaram com o prolongar do tempo de estocagem, independente das horas que as silagens permaneceram expostas ao ambiente. No entanto, na abertura dos silos a lignina apresentou efeito linear positivo para o tempo de estocagem, mas com 96 horas observou-se comportamento quadrático com maior concentração aos 224 dias de estocagem. A hemicelulose não se ajustou à análise de regressão na hora zero, mas demonstrou efeito quadrático com estimativa de valor máximo de 20,75 % com 237 dias, após 96 horas de exposição ao ar. Esse aumento da fração fibrosa em percentual da MS das silagens é justificado de acordo com Loures et al. (2005), pela produção de efluentes, visto que os componentes solúveis em água são lixiviados. Com isso proporciona o incremento da fração menos fermentável e insolúvel, principalmente os constituintes da parede celular, causando a concentração destes na silagem.

Com relação à digestibilidade da matéria orgânica, NDT e amido (Tabela 1), apresentaram equações polinomiais de segunda ordem, com estimativas de valores máximos

de 77,09, 73,25 e 20,45 % aos 179, 178 e 166 dias, respectivamente. No momento da abertura dos silos (0 horas), enquanto que com 96 horas não apresentaram efeito significativo ( $P>0,05$ ), sendo observados valores médios de 72,66, 68,95 e 19,70 % MS, respectivamente. De acordo com Tabacco et al. (2011), estudando as perdas de MS e nutricionais das silagens de milho e sorgo durante a deterioração aeróbia, observaram que os teores de MM, PB, FDN, FDA, LDA e hemiceluloses aumentaram, enquanto que as concentrações de amido decresceram após 14 dias de exposição ao ar. Os mesmo autores relatam existir duas fases na deterioração aeróbia das silagens, sendo que a primeira ocorre em média após 40 horas de exposição ao ar, onde são degradadas as frações mais solúveis, com isso os carboidratos estruturais mais complexos, proteína bruta, e a matéria mineral tendem a aumentar em proporção na MS.

Em fases mais avançadas da deterioração aeróbica, ocorre o desenvolvimento de mofos, que são capazes de utilizar os carboidratos, como o amido e hemiceluloses. Isso pode explica o aumento nas 96 horas da hemicelulose no presente trabalho, mas não evidenciamos a mudança na fração do amido que pode ser justificado pela diferença das pesquisas em virtude do tempo de exposição das silagens ao ambiente. Essa maior produção de hemicelulose e amido permite maior disponibilidade de carboidratos solúveis, resultando na proliferação de micro-organismos aeróbicos oportunistas, agravando ainda mais a degradação do material ensilado (PAHLOW et al., 2003).

As silagens de milho são mais suscetíveis à deterioração aeróbica por possuírem teores satisfatório de carboidratos solúveis e amido (CASTRO et al., 2006). Apesar disso, Lima et al. (2017) avaliando a composição química e a qualidade das silagens de milho expostas ao ambiente por períodos de 0, 12, 24 e 48 horas, evidenciaram apenas uma pequena mudança nos teores de lignina e pH, não alterando os demais parâmetros analisados.

Tabela 1- Composição química e valor nutritivo de silagens de milho AG 8690 com diferentes períodos de estocagem no momento da abertura (0 horas) e com 96 horas de exposição ao ar.

Parâmetros	Estatística	0 horas				CV	96 horas				CV
		Dias de estocagem					Dias de estocagem				
		45	90	180	360		45	90	180	360	
Matéria Seca	Média	29,08	28,64	26,59	26,87	5,56	30,93	30,66	31,23	31,29	4,35
	Regressão	Y=29,00-0,00713984x (P=0.28; R <sup>2</sup> =0,05)					Y=30,76 (P=0.57; R <sup>2</sup> =0,02)				
MM	Média	4,80	4,78	5,02	4,89	5,75	4,93	5,23	5,33	5,25	4,96
	Regressão	Y= 4,81 (P=0.58; R <sup>2</sup> =0,02)					Y= 5,07 (P=0.20; R <sup>2</sup> =0,11)				
Proteína	Média	8,76	8,42	9,08	8,20	4,88	9,33	9,23	9,68	8,72	6,29
	Regressão	Y=8,11 + 0,010477509x - 0,000028239x <sup>2</sup> (P=0.01; R <sup>2</sup> =0,42)					Y=8,79 + 0,010113889x - 0,000028498x <sup>2</sup> (P=0.04; R <sup>2</sup> =0,36)				
FDN	Média	37,52	38,18	41,65	49,66	6,18	36,75	43,21	46,66	46,99	8,09
	Regressão	Y=35,04 + 0,03978986x (P=<.0001; R <sup>2</sup> =0,80)					Y=38,87 + 0,02681868x (P=0,009; R <sup>2</sup> =0,50)				
FDA	Média	19,62	20,96	24,10	30,86	6,06	20,48	23,58	26,79	27,76	9,82
	Regressão	Y=17,82 + 0,03596860x (P=<.0001; R <sup>2</sup> =0,80)					Y=21,12 + 0,02093205x (P=0,004; R <sup>2</sup> =0,56)				
Lignina	Média	2,91	3,54	3,38	5,62	16,24	2,12	3,91	3,71	3,24	18,23
	Regressão	Y=2,49 + 0,008133333x (P=<.0001; R <sup>2</sup> =0,80)					Y=1,58 + 0,022952210x - 0,000051374x <sup>2</sup> (P=0.01; R <sup>2</sup> =0,53)				

Tabela 1- Composição química e valor nutritivo de silagens de milho AG 8690 com diferentes períodos de estocagem no momento da abertura (0 horas) e com 96 horas de exposição ao ar.

(Continuação)										
Hemicelulose	Média	16,97	17,17	17,13	18,47		16,27	19,62	19,87	19,23
	Regressão	Y= 17,22 (P=0.35; R <sup>2</sup> =0,06)				10,77	Y=14,88 + 0,04966093x - 0,00010504x <sup>2</sup>			7,64
(P=0.03; R <sup>2</sup> =0,50)										
Celulose	Média	16,71	17,42	20,72	25,24		18,35	19,67	23,08	24,52
	Regressão	Y=15,32 + 0,02783527x (P=<.0001;				7,77	Y=18,13 + 0,01938937x (P=0,004;			10,30
R <sup>2</sup> =0,84) R <sup>2</sup> =0,57)										
DIVMO	Média	70,11	75,04	75,10	68,77		72,35	75,63	70,60	69,06
	Regressão	Y=68,69 + 0,09396048x - 0,00026267x <sup>2</sup>				5,11	Y= 75,98 (P=0.08; R <sup>2</sup> =0,20)			6,95
(P=0.01; R <sup>2</sup> =0,48)										
NDT	Média	66,74	72,25	75,10	68,77		68,89	74,74	66,84	65,34
	Regressão	Y=65,54 + 0,08685520x - 0,00024451x <sup>2</sup>				5,11	Y= 72,32 (P=0.06; R <sup>2</sup> =0,23)			6,90
(P=0.01; R <sup>2</sup> =0,48)										
Amido	Média	18,96	19,92	20,41	16,60		19,11	19,55	20,44	19,69
	Regressão	Y= 17,68 + 0,03359176x - 0,00010164x <sup>2</sup>				3,15	Y= 19,40 (P=0.68; R <sup>2</sup> =0,01)			10,24
(P=<,0001; R <sup>2</sup> =0,88)										

MM= Matéria Mineral, FDN= Fibra em detergente ácido, FDA= Fibra em detergente ácido, DIVMO= degradabilidade da matéria orgânica, NDT= nutrientes digestíveis totais.

As perdas de gases e a RMS (Tabela 2) não se ajustaram aos modelos de regressão ( $P > 0,05$ ), sendo observaram valores médios de 5,97 % e 94,03 % da MS, respectivamente. Estando de acordo Junges et al. (2013) avaliando diferente períodos de estocagem (30 a 120 dias) não observaram diferenças nas perdas por gases tendo valor médio de 5,51 %, no entanto encontraram um aumento na produção de efluentes e nas perdas de matéria seca com prolongar do tempo da estocagem.

Em contraste, as perdas de efluentes demonstraram comportamento linear positivo (Tabela 2), sendo observado um aumento de 0,007 unidades percentuais a cada dia a mais de estocagem dos silos. Isso corrobora com o fato de ocorrer a maior concentração da fração fibrosa das silagens (Tabela 1). Possivelmente, isso tenha ocorrido em virtude da produção de efluentes que carrearam as frações solúveis. Outro fator pode ter influenciado o aumento da produção de efluentes foi a redução no teor de MS ao longo do tempo de estocagem, visto que de acordo com Vilela et al. (2008) verificaram que a silagens com menos de 30 % de MS pode apresentar elevadas quantidades de efluentes. De acordo com Ferreira et al. (2013), silagens com altas produção de efluentes possuem baixa qualidade, evidenciado pelo fato de ocorrer perdas de nutrientes através da lixiviação, com isso acarretando em grandes prejuízos econômicos aos produtores (TABACCO et al., 2011). Segundo McDonald et al. (1991) as perdas estimadas devido a produção de efluente podem ser da ordem de 2,36 kg MS t<sup>-1</sup> em silagem ou 0,8% da matéria seca do material original.

Analisando a concentração dos ácidos orgânicos das silagens (Tabela 2), o ácido láctico que é o principal ácido responsável pela queda do pH e conservação da silagem se ajustou a análise de regressão de segunda ordem, apresentando a máxima 4,18 % concentração com 233 dias. Enquanto que o ácido acético aumentou na ordem de 0,006 pontos percentuais e seu maior pico foi estimado de 1,96 % aos 162 dias, e o ácido propiônico aumentou de forma linear, ou seja, ocorreu o acréscimo de 0,0003 pontos percentuais a cada dia a mais de estocagem. O ácido acético e propiônico possuem ação contra leveduras, melhorando assim a estabilidade aeróbia das silagens, isso ocorre pelo fato dos ácidos serem capazes restringir o desenvolvimento ou até mesmo causar a morte das leveduras (MOON, 1983). Além disso esses ácidos são usados para gerar ATP no metabolismo intermediário, e o ácido propiônico é um precursor de glicose, entrando no ciclo da gliconeogênese hepática (HUNTINGTON, 1990).

Tabela 2 - Perdas devidas à fermentação e concentração de ácidos orgânicos em silagens de milho AG 8690, submetidas a diferentes tempos estocagem.

Parâmetros	Estatística	Dias de estocagem				CV
		45	90	180	360	
Efluentes (kg/ton MV)	Média	0,94	1,11	2,25	3,18	15,76
	Regressão	Y=0,71+0,0071990x (P=<.0001; R <sup>2</sup> =0,89)				
Perdas por Gases (% MS)	Média	3,60	5,04	7,10	8,13	2,51
	Regressão	Y=4,15 (P=0,09; R <sup>2</sup> = 0,26)				
RMS (%)	Média	96,40	94,96	92,90	91,87	2,52
	Regressão	Y=94,75 (P=0,09; R <sup>2</sup> = 0,25)				
Ácido Lático (g/Kg)	Média	1,95	3,42	3,82	3,3	15,78
	Regressão	Y= 1,10+0,026438172x-0,000056717x <sup>2</sup> (P=0.0005; R <sup>2</sup> =0,69)				
Ácido Acético (g/Kg)	Média	1,57	1,84	1,87	1,13	20,12
	Regressão	Y=1,40+0,006899194x-0,000021343x <sup>2</sup> (P=0.006; R <sup>2</sup> =0,54)				
Ácido Propiônico (g/Kg)	Média	0,39	0,41	0,41	0,50	10,60
	Regressão	Y= 0,37+0,0003188406x (P=0.006; R <sup>2</sup> =0,54)				
Ácido Butírico (g/Kg)	Média	0,13	0,11	0,11	0,10	25,07
	Regressão	Y=0,12 (P=0.33; R <sup>2</sup> =0,31)				

RMS= recuperação de matéria seca

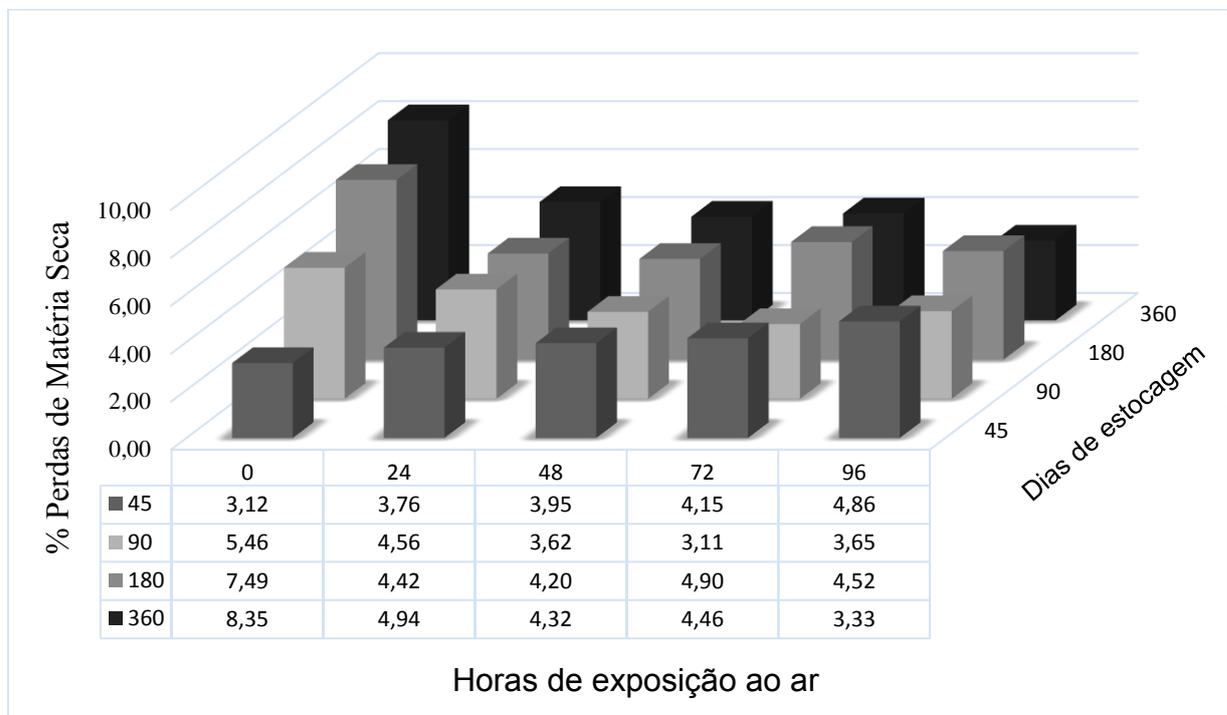
Visto que foi observado uma razão ácido láctico:ácido acético menores que 3, parâmetro usado como indicador de fermentação homolática adequado. Razões de 1,80 entre ácido láctico:ácido acético também foram observadas Saricicek et al. (2016) após 202 dias de armazenamento. Contudo, concentração de ácido acético inferior a 2 % da MS, antes classificada como excelente conforme Dulphy e Demarquilly (1981), pois era um indicativo de fermentação indesejada, podendo não ser mais verdade absoluta, principalmente pelo fato do ácido acético apresentar benefícios após a abertura dos silos, como por exemplo, aumento da estabilidade aeróbia.

As perdas de matéria seca das silagens de milho estocadas por distintos tempos de

estocagem não se ajustaram a análise de regressão ( $P>0,05$ ) quando permaneceram exposta ao ar por até 96 horas (Figura 1). Sendo encontrado as seguintes equações  $y= 2,28$ ,  $P=0,08$ ;  $y=6,23$ ,  $P=0,11$ ;  $y= 6,47$ ,  $P=0,20$  e  $Y= 6,47$ ,  $P=0,20$  para os 45, 90, 180 e 360 dias de estocagem respectivamente. As perdas de nutrientes são frequentemente mais prejudiciais do que as perdas de MS, uma vez que a carboidratos solúveis em água são metabolizados.

De acordo com Weinberg e Chen (2013), o qual verificaram aumento das perdas de MS ao longo do tempo de estocagem, atingindo nível máximo após 90 dias de armazenamento. De acordo Ruppel et al. (1995) relataram que as perdas de MS variando de 3-25 %, mas notaram o potencial com até 70 % de perdas dos carboidratos e até 50 % das proteínas solúveis. Essas atividades também aumentaram a temperatura e o pH, causando as perdas de MS que reduzem a qualidade e digestibilidade das silagens (WOOLFORD, 1990). Durante a fermentação bactérias ácidos lácticas, os carboidratos solúveis são convertidos em ácido láctico, ácido acético, etanol,  $CO_2$  e água, e isso provoca pequenas perdas de MS e energia (MCDONALD et al., 1991)

Figura 1- Perdas de matéria seca em silagens de milho submetidas a diferentes tempos estocagem e expostas ao ambiente por 96 horas.



Os resultados obtidos da estabilidade aeróbica, pH, MS e N-amoniaco das silagens são demonstrados nas figuras 2, 3, 4 e 5. Assim sendo, a estabilidade aeróbica é descrita como

o tempo decorrente para que a temperatura da silagem exceda a temperatura do ambiente em 2°C, isto é o tempo que procedem antes que a silagem mostre evidências claras de aquecimento (RANJIT e KUNG, 2000). Sendo que os resultados obtidos demonstraram que as temperaturas das silagens possuem comportamento linear positivo, aumentando com o prolongar do tempo de estocagem e das horas em que as silagens ficaram exposta ao ar.

Esse aumento na temperatura das silagens ocorre devido à atividade de micro-organismos aeróbio, o qual pode ocasionar perdas nos valores nutritivos em até 16 % antes dos moldes se tornarem visível (BORREANI et al., 2018). De acordo com Kung Jr. et al. (2018), as temperaturas altas das silagens, especialmente após longos períodos de fermentação e durante a alimentação, são possivelmente decorrentes da deterioração aeróbica. Enquanto que Rees (1982) relatou que quando ocorre o aumento de 10 °C na temperatura dos silos de escala laboratorial, ocasiona perdas superiores a 1,7 %. O acúmulo de temperatura após a abertura do silo é reflexo da intensidade de reações promovidas por fungos filamentosos, leveduras e bactérias aeróbias (AMARAL et al., 2008).

Os resultados obtidos nas concentrações de N-amoniaco foram decrescentes, isto é, reduz a sua concentração à medida que ocorre o aumento das horas de exposição ao ar, independentemente, do tempo de estocagem em que as silagens se encontravam. A concentração de N-amoniaco está relacionada com a quantidade de proteína degradada durante a fermentação e, portanto, indica a proteína perdida durante o processo de fermentação (MCDONALD et al., 1991). Presumidamente, essa redução é ocasionada em parte pelo fato de acontecer volatilização da amônia, visto que este é um gás em que se perde para a atmosfera, e também pode ter sido utilizada como fonte de substrato para desenvolvimento das bactérias.

Na Figura 2, podemos avaliar os efeitos das horas de exposição ao ambiente das silagens estocadas por 45 dias, no qual a estabilidade foi perdida segundo a equação de regressão com 12,5 horas. Enquanto que o pH aumentou de forma linear, estimando-se através da equação de regressão que houve um ganho de 0,13 unidades percentuais no pH a cada 24 horas após a exposição das silagens ao ar. A matéria seca não foi afetada pelo tempo de exposição ao ambiente dos silos, tendo valor médio 30,67 %. Segundo Kleinschmit e Kung (2006), avaliando a estabilidade aeróbia em silagem de milho observaram 25 horas, para o tratamento controle. Enquanto que a pesquisa de Weinberg et al. (2011) estudando os produtos da fermentação e a estabilidade das silagens de milho com exposição de 7 dias ao ar após abertura não observaram diferenças significativas nos teores de pH e MS das silagens.

Figura 2- a) Temperatura (barras) e pH (linha); b) Teores de matéria seca (barras) e N-amoniaco (linha), de silagens de milho estocadas por 45 dias e expostas ao ar por um período de até 96 horas.

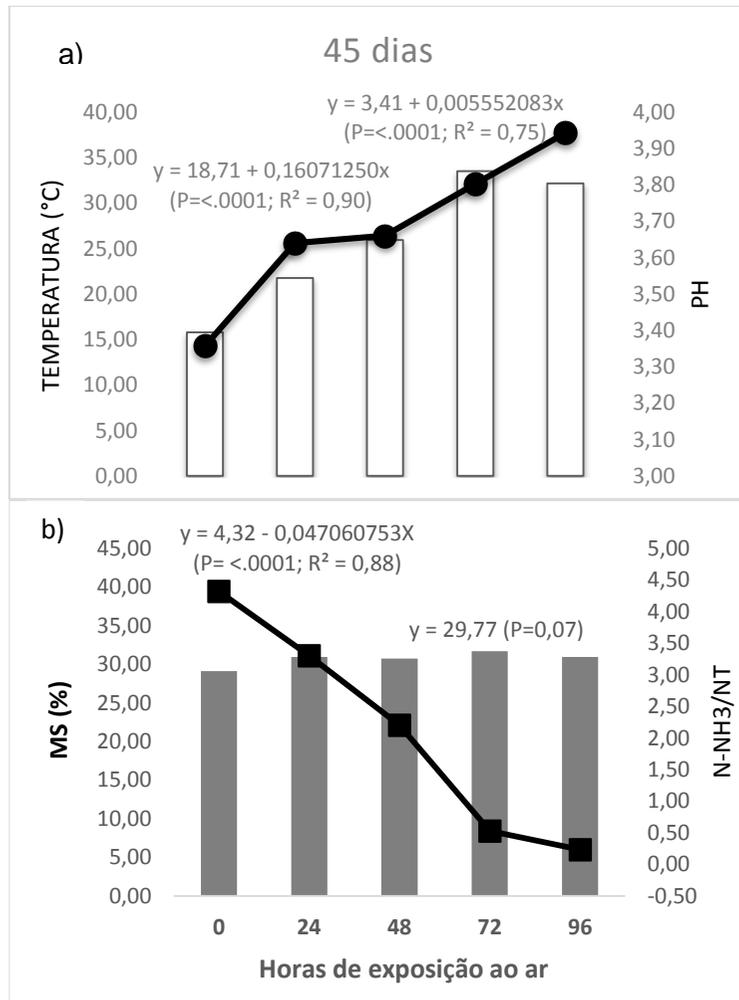


Figura 3- a) Temperatura (barra) e pH (linha); b) Teores de matéria seca (barras) e N-amoniaco (linha), de silagens de milho estocadas por 90 dias e expostas ao ar por um período de até 96 horas.

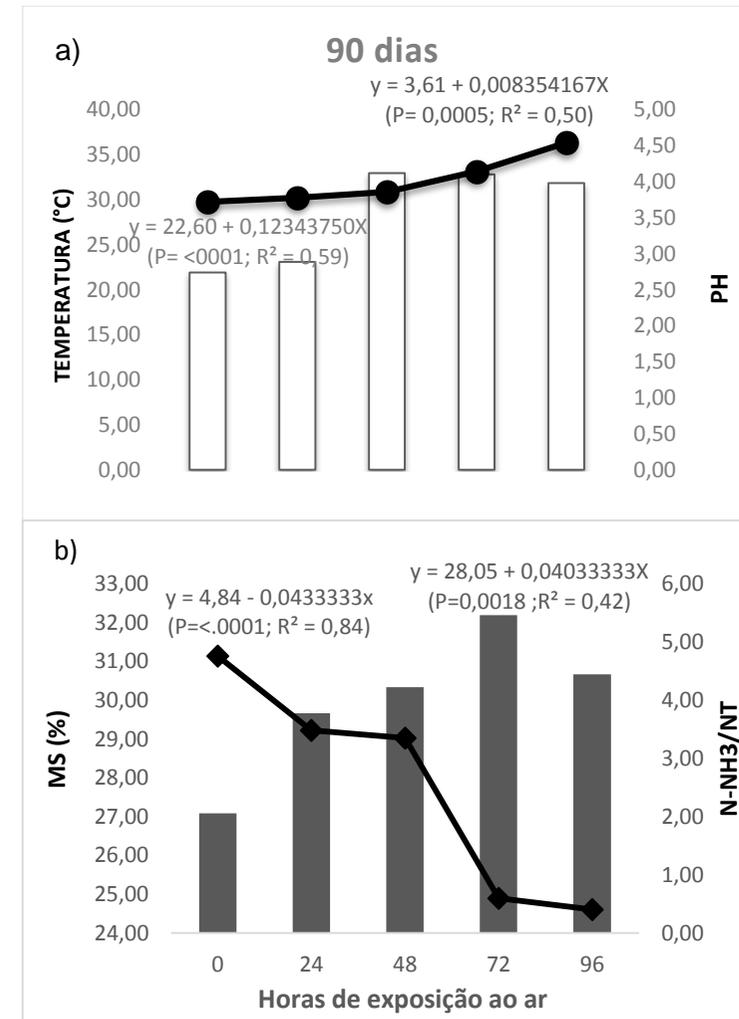


Figura 4- a) Temperatura (barras) e pH (linha); b) Teores de matéria seca (barras) e N-amoniaco (linha), de silagens de milho estocadas por 180 dias e exposta ao ar por um período de até 96 horas.

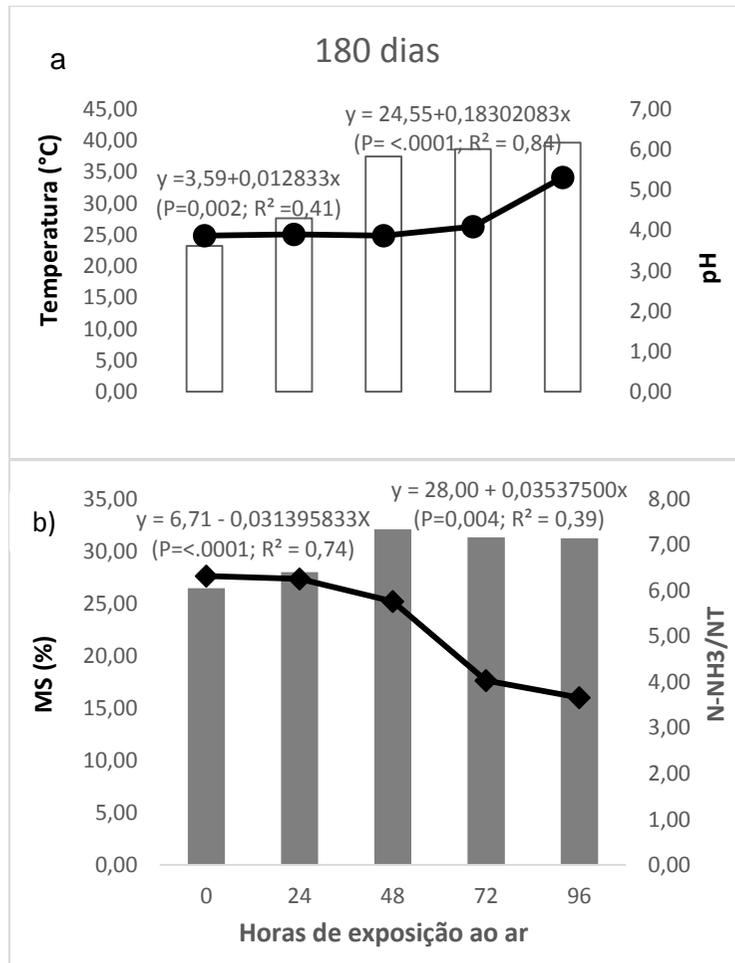
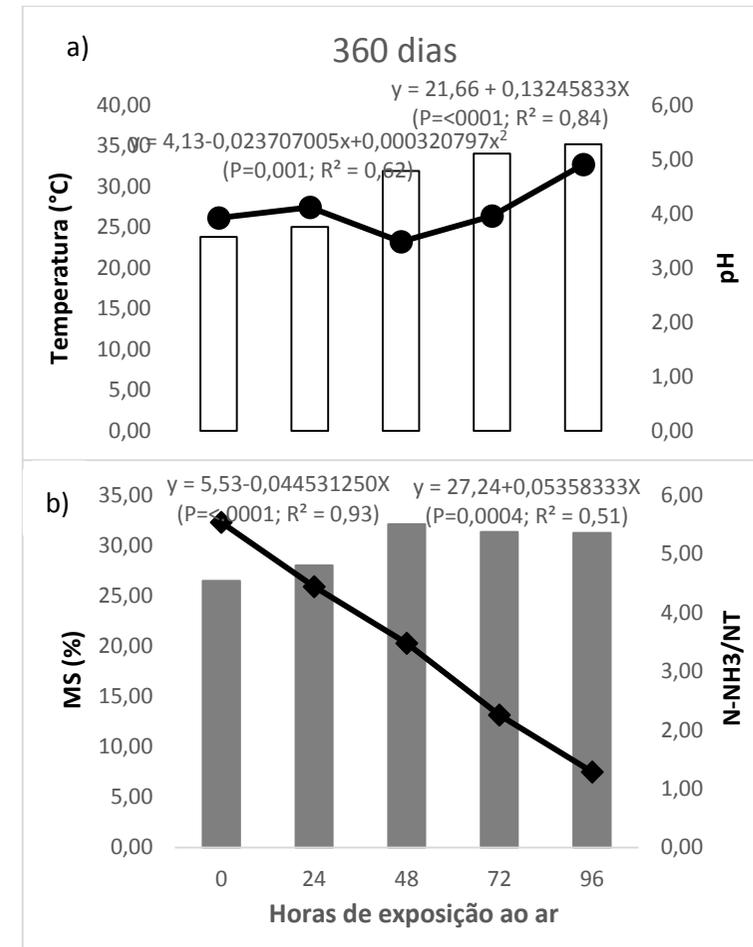


Figura 5- a) Temperatura (barras) e pH (linha); b) Teores de matéria seca (barras) e N-amoniaco (linha), de silagens de milho estocadas por 360 dias e exposta ao ar por um período de até 96 horas.



Silagens com 90 dias de estocagem (Figura 3) perderam a estabilidade aeróbia com 18,9 horas, dos tempos de estocagem estudados, este foi o que levou mais tempo para perder a estabilidade aeróbia, sendo justificado pela concentração de ácido acético que ainda estava aumentando nesta fase. Em contraste, Sá Neto et al. (2013), avaliando as silagens de milho que permaneceram durante 5 dias expostas ao ambiente, relataram perdas de estabilidade com 65,25 h. O pH e MS do presente estudo, aumentaram de forma linear positiva, durante o tempo em que as silagens ficaram expostas ao ambiente. Esse aumento do pH após a exposição das silagens ao ar é um importante indicador da deterioração, uma vez que a fermentação aeróbica que ocorre nas silagens, após a abertura dos silos são realizadas pelos micro-organismos que utilizam principalmente ácido lático como fonte de substratos, sendo que este é principal ácido responsável pela queda do pH e na conservação das silagens (KUNG & RANJIT, 2001). Quando esses micro-organismos, principalmente leveduras, entram em contato com o ar, eles utilizam este ácido lático provocando um aumento no pH.

No período de 180 dias de fermentação das silagens (Figura 4), a perda da estabilidade aeróbia de acordo com a equação de regressão, ocorreu com 4 horas, sendo que a temperatura média observada de 0 para 24 horas foi de 23,25 e 27,63 °C respectivamente. Enquanto que a MS apresentou um comportamento linear positivo assim como pH, visto que de acordo com as equações de regressões obtidas, estima-se que houve um acréscimo de 0,0012 na MS e 0,053 do pH, por unidades percentuais a cada hora decorrente após abertura dos silos. O aumento na concentração da matéria seca deste trabalho, estão de acordo com Hu et al. (2009) que avaliaram a influência dos teores de MS das silagens após 240 dias de armazenamento, e observaram que com o aumento dos teores de matéria seca, houve acréscimo nos valores de pH, nas concentrações de etanol e nas contagens de leveduras de todos tratamentos.

No momento em que as silagens apresentavam 360 dias de fermentação (Figura 5), a perda de estabilidade aeróbica foi observada segundo a equação de regressão com 16,4 horas, esse aumento no tempo decorrente para que ocorra a perda de estabilidade das silagens em relação aos silos estocados por 180 dias pode ser justificada pelo aumento nas concentrações do ácido propiônico das silagens. Enquanto que a MS aumentou de forma linear positiva, apresentando um acréscimo de 0,04 unidade percentuais de MS a cada hora decorrente após abertura dos silos. O pH oscilou mais que nos tratamentos anterior, se ajustando a análise de regressão quadrática. De acordo com Basso et al. (2012), estudando silagem de milho armazenada por 130 dias, que permaneceram expostas ao ar durante 0, 4, 8 e 12 dias, após a abertura dos silos, observaram a perda na estabilidade com 47 horas. Enquanto que o pH

aumentou do momento da abertura até 4 dias após a exposição ar, posteriormente manteve-se constante, sendo observados os valores médios de 3,90 para 5,43, respectivamente.

Como podemos observar na presente pesquisa que independente do tempo de estocagem as silagens perderam a estabilidade aeróbia antes 24 horas. Indicando que o processo de deterioração da silagem se inicia rapidamente, no qual os produtores devem evitar deixar os silos expostos ou silagem em excesso no cocho, uma vez que a silagem perdendo a estabilidade, interfere negativamente no seu valor nutritivo.

## CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa mostram que ocorre alteração na composição química, e maior produção de efluentes, acarretando na concentração da fração fibrosa da silagem ao longo do tempo de estocagem e da exposição ao ar.

As exposições das silagens ao ambiente devem ser evitadas ao máximo, pois a deterioração aeróbia aumenta com o passar das horas de exposição e a perda estabilidade ocorre antes das 24 horas.

## REFERÊNCIAS

AMARAL, R.C.; BERNARDES, T.F.; SIQUEIRA, G.R.; REIS, R.A. Estabilidade aeróbia de silagens do capim-marandu submetidas a diferentes intensidades de compactação na ensilagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 6, p. 977-983, 2008.

AMERICAN OIL CHEMISTE´S SOCIETY-AOCS, **Office Procedure, Am 5-04**, Rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction, Urbana, IL, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16th ed. AOAC International, Arlington, 1995.

BASSO, F.C. et al. Fermentation and aerobic stability of corn silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 41, n. 7, p. 1789-1794, 2012.

BORREANI, G. et al. *Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages* **Journal Dairy Science**, v. 101, p. 3952–3979, 2018.

CAPPELLE, E. R. et al. Estimativas do valor energético partir de características químicas e bromatológicas dos alimentos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 6, p.1837-1856, 2001.

CASTRO, F.G.G. et al. Perfil microbiológico, parâmetros físicos e estabilidade aero´bia de silagens de capim-tifton 85 (*Cynodon sp.*) confeccionadas com distintas concentrações de

matéria seca e aplicação de aditivos. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 35, n.2, p. 358–371, 2006.

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

FERREIRA, D.J. et al. Silage fermentation and chemical composition of elephant grass inoculated with rumen strains of *Streptococcus bovis*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 183, n. 1, p.22-28, 2013.

GOERING, H.K., VAN SOEST, P.J. Forage fiber analysis: apparatus reagents, procedures and some application. **Agricultural Handbook**, 379. Washington, D.C. 1970.

HU, W. et al. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD-1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents. **Journal Dairy Science**, v. 92, p. 3907–3914, 2009.

HUNTINGTON, G. B. Energy metabolism in the digestive tract and liver of cattle: influence of physiological state and nutrition. **Reproduction and Nutrition**, v. 30, p. 35-47, 1990.

JOBIM, C.C. et al. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.36, p.101-119, 2007.

JUNGES, D. et al. Additive containing homo and heterolactic bacteria on the fermentation quality of maize silage. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 35, n. 4, p. 371-377, 2013.

KEADY, T.W.J.; O'KIELY, P. An evaluation of the effects of rate of nitrogen fertilization of grassland on silage fermentation, in-silo losses, effluent production and aerobic stability. **Grass and Forage Science**, v. 51, p. 350-362, 1996.

KLEINSCHMIT, D.H.; KUNG, JR. L. The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage during various stages of ensiling. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 10, p. 3999-4004, 2006.

KUNG, JR. L. et al. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 4020-4033, 2018.

KUNG, JR. L.; RANJIT, N.K. O efeito de *Lactobacillus buchneri* e outros aditivos na fermentação e estabilidade aeróbia da silagem de cevada. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 5, p. 1149-1155, 2001.

KUNG, JR. L. et al. The effect of preservatives based on propionic acid on the fermentation and aerobic stability of corn silage and a total mixed ration. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1322–1330, 1998.

LIMA, E.M. et al. Re-ensiling and its effects on chemical composition, *in vitro* digestibility, and quality of corn silage after different lengths of exposure to air. **Canadian Journal Animal Science**, v. 97, p. 250-257, 2017.

- LOURES, D.R.S. et al. Composição bromatológica e produção de efluente de silagens de capim tanzânia sob efeitos do emurchecimento, do tamanho de partícula e do uso de aditivos biológicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 726-735, 2005.
- MCDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2nd ed. Chalcombe Publications. Marlow, UK, 1991, p. 340.
- MOON, N.J. Inibição do crescimento de leveduras tolerantes a ácidos por acetato, lactato e propionato e suas misturas sinérgicas. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 55, n. 3, p. 453-460, 1983.
- MUCK, R. E. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 183-191, 2010.
- PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F. Microbiology of ensiling. **In: Silage Science and Technology**. D.R. Buxton, R. E. Muck, and J. H Harrison, ed. American Society of Agronomy. Madison, WI. p. 31-93, 2003.
- RANJIT, N.K.; KUNG, JR. L. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 526–535, 2000.
- REES, D.V.H. The aerobic deterioration of grass silages and its effects on water-soluble carbohydrates and the associated heat production. **Journal Science Food Agriculture**, v. 33, p. 499–508, 1982.
- ROLAS, Rede Oficial de Laboratórios de Análise de Solo e de Tecido Vegeta. ‘Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina’, **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, ed.10, p. 400, 2004.
- RUPPEL, K. A. et al. Bunker silo management and its relationship to forage preservation. **Journal Dairy Science**, v. 78, p.141-153, 1995.
- SÁ NETO, A. et al. Silagem de milho ou de cana-de-açúcar com *Lactobacillus buchneri* exclusivamente ou em associação com *L. plantarum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 5, p. 528-535, 2013.
- SARICICEK, B. Z. et al. Effect of storage time on nutrient composition and quality parameters of corn silage. **Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology**, v. 4, n. 11, p. 934-939, 2016.
- SENGER, C. C. D. et al. Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 146, n. 1, p. 169-17, 2008.
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: Métodos químicos e biológicos**, Universidade Federal de Viçosa, MG: Editora UFV, 3ª ed, p.165, 2002.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM – SAS. Statistical analysis system user’s guide. Cary: Statistics Cary SAS Institute.

TABACCO, E. et al. Dry matter and nutritional losses during aerobic deterioration of corn and sorghum silages as influenced by different lactic acid bacteria inocula. **Journal Dairy Science**, v. 94, p. 1409-1419, 2011.

TABACCO, E. et al. Clostridia spore formation during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* inoculants. **Journal Applied Microbiology**, v. 107, p. 1632–1641, 2009.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crop. **Journal British Grassland Society**, v. 18, n. 2, p. 104-111, 1963.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharide in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3583- 3597, 1991.

VILELA, H.H. et al. Valor nutritivo de silagens de milho colhido em diversos estádios de maturação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 7, p. 1192-1199, 2008.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, **Analytical Chemistry**, v. 39, p. 971-974, 1967.

WEINBERG, Z. G.; CHEN, Y. Effects of storage period on the composition of whole crop wheat and corn silages. **Animal Feed Science and Technology**, v. 185, n. 3-4, p. 196-200, 2013.

WEINBERG, Z. G. et al. Ensiling fermentation products and aerobic stability of corn and sorghum silages. **Grassland Science**, v. 57 p. 46-50, 2011.

WEINBER, Z.G., CHEN, Y., SOLOMON, R. The quality of commercial wheat silages in Israel. **Journal of Dairy Science**. v. 92, p. 638–644, 2009.

WOOLFORD, M. K. The detrimental effect of air on silage. **Journal of applied bacteriology**. v. 68, p. 101–116, 1990.

## 5 DISCUSSÃO GERAL

Foi observado neste trabalho que ocorreram alterações importantes na composição química e nos parâmetros fermentativos das silagens de milho ao longo tempo de estocagem, como o aumento da fração fibrosa, PB, NNP, N-amoniacal, ácidos orgânicos, pH e da produção de efluentes, enquanto que carboidratos solúveis, teores de energia, proteína verdadeira decresceram. Pesquisas mais recentes têm demonstrado que diversos mecanismos continuam ativos, na fase chamada estável das silagem. Como é relatado pelos autores Kleinschmit e Kung (2006) avaliando silagem de milho e Santos et al. (2016) estudando a silagem de alfafa, ambos trabalhos com até 360 dias de estocagem, verificaram que o *Lactobacillus buchneri* permaneceu razoavelmente ativo por períodos prolongados de tempo nas silagens, sob condições anaeróbicas e com o pH baixo. Isso foi amparado pelo fato de que o 1,2-propanodiol, um produto decorrente da transformação do ácido láctico em ácido acético por este organismo, continuar aumentando ao longo do tempo de estocagem.

Outro indício de que os mecanismos continuam ativos é a atividade proteolítica, conforme observado por Hoffman et al. (2011) que avaliaram silagens estocadas de 0 até 240 dias, Young et al. (2012) com 45 e 150 dias de estocagem e Der Bedrosian et al. (2012) silagem milho de 0 até 360 dias de estocagem, que notaram o aumento do N-amoniacal e proteína solúvel. Em relação à composição química Saricicek et al. (2016), trabalhando com silagens de milho estocadas de 90 até 202 dias observaram que a composição química e o valor nutritivo da silagem foram alterados após longo período de estocagem. Por sua vez, Arcari et al. (2016), avaliando silagem de milho de 3 até 330 dias de estocagem, também observaram o aumento das concentrações dos ácidos orgânicos.

No entanto, a influência do longo período de estocagem das silagens sobre outros parâmetros como as perdas, produção de efluentes, fracionamento proteico e dos carboidratos assim como a cinética de degradação das silagens têm sido pouco relatadas na literatura. Junges (2014) estudando silagem de milho de 3 até 570 dias de estocagem observou aumento das perdas por gases e a redução da recuperação da matéria seca (RMS) de forma constante. Weinberg e Chen (2013) estudando silagem de milho e trigo estocadas de 1 semana até 12 meses, verificaram aumento das perdas de MS ao longo do armazenamento, atingindo o nível máximo após 90 dias de armazenamento, sugerindo uma provável estabilização do processo. Enquanto que Naeini et al. (2014), avaliando silagem de sorgo de 30 até 120 dias notaram que o prolongamento da estocagem reduziu linearmente a produção de gás nas 24 horas.

Observamos também que longos períodos de exposição da silagem ao ambiente

aumenta o pH e a temperatura causando a deterioração aeróbia do material ensilado, comprometendo a estabilidade das silagens avaliadas que foi rompida antes das 24 horas de exposição. De acordo com Kung Jr et al. (2018), as temperaturas altas das silagens, especialmente após longos períodos de fermentação e durante a alimentação, são possivelmente decorrentes da deterioração aeróbica. Segundo Basso et al. (2012), estudando os efeitos do tempo de exposição ao ar (0 até 12 dias) na silagem de milho armazenada por 130 dias notaram a perda da estabilidade com 47 h, e que o pH aumentou do momento da abertura até 4 dias após a exposição ao ambiente, depois manteve-se constante, sendo observados os valores de 3,90 para 5,43 respectivamente. Enquanto que Weinberg et al. (2011) avaliando tempos de exposição ao ar das silagens de milho e sorgo não encontraram diferença significativa para pH.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho demonstram que ocorrem alterações na composição química com o prolongar do tempo de estocagem. O aumento nas concentrações de fibras, amido, N-amoniaco, N-solúvel, pH, ácidos orgânicos e produção de efluentes, sugerem uma atividade microbiana e/ou enzimática constante no silo. Também foi evidenciada a redução dos teores de proteínas verdadeiras, carboidratos solúveis e de energia das silagens, ficando evidente que o aumento no tempo de estocagem é prejudicial à qualidade das silagens de milho.

Por sua vez, a exposição da silagem ao ambiente deve ser evitada ao máximo, pois foi observado o aumento da temperatura, pH e MS sendo evidenciado com isso a deterioração do material ensilado com o passar das horas de exposição ao ambiente em tempo inferior a 24 horas.

## 7 REFERÊNCIAS

- ARCARI, M. A. et al. Effect of the ensiling time of hydrated ground corn on silage composition and *in situ* starch degradability. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 1, p. 60-71, 2016.
- BASSO, F. C. et al. Fermentation and aerobic stability of corn silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 41, n. 7, p. 1789-1794, 2012.
- BERNARDO, T. F. et al. Perfil Fermentativo, estabilidade aeróbia e valor nutritivo de silagens de capim-Marandu ensilado com aditivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 10, p. 1728-1736, 2008.
- BERNARDES, T. F.; RÊGO, C. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1852-1861, 2014.
- BEUVINK, J. M. W.; KOGUT, J. Modelling gas production kinetics of grass silages incubated with buffered rumen fluid. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 1041-1046, 1993.
- BLÜMMEL, M.; ORSKOV, E. R. Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v. 40, n. 3-4, p. 109-119, 1993.
- BOLSEN, K. K. et al. Rate and extent of top spoilage losses in horizontal silos. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 2940-2962. 1993.
- BORREANI, G. et al. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 3952-3979, 2018.
- BOUDRA, H.; MORGAVI, D. P. Reduction in *Fusarium* toxin levels in corn Silage with low dry matter and storage time. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 56, p. 4523-4528. 2008.
- CABRAL, L. S. et al. Cinética ruminal das frações de carboidratos, produção de gás, digestibilidade *In vitro* da matéria seca e NDT estimado da silagem de milho com diferentes proporções de grãos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 6, p. 2332-2339, 2002.
- CONE, J. W. et al. Effects of chop length and ensiling period of forage maize on *in vitro* rumen fermentation characteristics. **Wageningen Journal of Life Sciences (NJAS)**, v. 55, n. 2, p. 155-166, 2008.
- CORNELL NET CARBOHYDRATE AND PROTEIN SYSTEM, CNCPS. Ithaca: Cornell University, Software, version 5.0.18, 2002.
- DER BEDROSIAN, M. C.; NESTOR, K. E.; KUNG Jr, L. The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 9, p. 5115-5126, 2012.

FERRARETTO, L. et al. Effect of ensiling time and hybrid type on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal *in vitro* starch and neutral detergent fiber digestibility in whole-plant corn silage. **The Professional Animal Scientist (PAS)**, v. 31, p. 146–152, 2015.

FERRARETTO, L. F. et al. Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia nitrogen and ruminal *in vitro* starch digestibility in high-moisture corn samples. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 5, p. 3221-3227, 2014.

FOX, D. G. et al. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System Model for evaluation herd nutrition and nutrient excretion. **Animal Feed Science and Technology**, v. 112, n. 3-4, p. 29-78, 2004.

GETACHEW, M. G. et al. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 72, n. 3-4, p. 261-281, 1998.

GUAN, H. et al. Microbial communities and natural fermentation of corn silages prepared with farm bunker-silo in Southwest China. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 282–290, 2018.

GUIM, A. et al. Estabilidade Aeróbica de Silagens de Capim-Elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum) Emurcheado e Tratado com Inoculante Microbiano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 6, p. 2176-2185, 2002.

HALLADA, C. M.; SAPIENZA, D. A.; TAYSOM, D. Effect of length of time ensiled on dry matter, starch and fiber digestibility in whole plant corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 1, p. 30, 2008.

HERON, S. J. E.; EDWARDS, R. A.; PHILIPS, P. Effect of pH on the activity of ryegrass *Lolium multiflorum* proteases. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 46, n. 3, p. 267–277, 1989.

HERRMANN, C.; HEIERMANN, M.; IDLER, C. Effects of ensiling, silage additives and storage period on methane formation of biogas crops. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 8, p. 5153–5161, 2011.

HOFFMAN, P. C. et al. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2465–2474, 2011.

HU, W. et al. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD-1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 8, p. 3907–3914, 2009.

JOBIM, C. C. et al. Avanços metodológicos nas avaliações da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, Supl. Esp., p. 101-120, 2007.

JUNGES, D. Tempo de armazenamento e manejo do painel no valor nutritivo de silagens de milho. 2014, 150 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, ESALq, Piracicaba, Brasil.

JUNGES, D. et al. Additive containing homo and heterolactic bacteria on the fermentation quality of maize silage. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 35, n. 4, p. 371-377, 2013.

KHAZAAL, K.; ØRSKOV, E. R. The *in vitro* gas production technique: an investigation on its potential use with insoluble *polyvinylpyrrolidone* for the assessment of phenolics-related antinutritive factors in browse species. **Animal Feed Science and Technology**, v. 47, n. 3-4, p. 305-320, 1993.

KLEINSCHMIT, D. H.; KUNG Jr, L. The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage during various stages of ensiling. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 10, p. 3999–4004, 2006.

KUNG Jr, L. et al. *Silage review*: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. **Journal of Dairy Science**. v. 101, n. 5, p. 4020–4033, 2018.

KUNG, Jr. L. The effects of length of storage on the nutritive value and aerobic stability of silages. In: DANIEL, J.L.P.; SANTOS, M.C.; NUSSIO, L.G. (Ed.). **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION**, 3. July 22-23, 2013. Campinas. Proceeding. Campinas, 2013. p. 7-19.

KUNG Jr., L.; STOKES, M. R.; LIN, C. J. Silage additives. **In: Silage Science and Technology**. Agronomy Monograph 42 (Eds Buxton D. R., Muck R. E, Harrison J. H.), America Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, p. 305–360. 2003.

KUNG, Jr. L. et al. The effect of preservatives based on propionic acid on the fermentation and aerobic stability of corn silage and a total mixed ration. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 5, p.1322-1330, 1998.

LANZAS, C. et al. Evaluation of protein fractionation systems used in formulating rations for dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 1, p. 507–521, 2007.

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T. M.; VAN SOEST, P. J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 57, n. 4, p. 347-358, 1996.

Lindgre, S. e Pahlow, G. Influência de micróbios e os seus metabolites em comida e qualidade de comida Proc. 19º Gen. Meet. EGF, La Rochelle, França , fr. Grassl. Soc., Reading, UK, pp. 503 – 511. 2002

MACÊDO, A. J da S. Microbiologia de silagens: revisão de literatura. **Revista electrónica de Veterinária**, v. 18, n. 9, p. 1-11, 2017.

MASON, P. M.; STUCKEY, D. C. Biofilms, bubbles and boundary layers- A new approach to understanding cellulolysis in anaerobic and ruminant digestion. **Water Research**, Review, v. 104, p. 93-100, 2016.

MENKE, K. H. et al. The estimation of the digestibility and metabolisable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor.

**Journal of Agricultural Science**, v. 93, n. 1, p. 217-222, 1979.

MUCK, R. E. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, Supl. Espec., p. 183-191, 2010.

MUCK, R. E.; PITT, R. E.; LEIBENSPERGER, R. Y. A model of aerobic fungal growth in silage. Microbial characteristics. **Grass Forage Science**, v. 46, n. 3, p. 283-290, 1991.

MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. 2ed. Marlow, Chalcombe Publications, 1991, 483 p.

NAEINI, S. Z. et al. Influence of ensiling time on chemical composition, fermentation characteristics, gas production and protein fractions of sweet sorghum silage. **Research Opinions in Animal and Veterinary Sciences**, v. 4, n. 6, p. 286-293, 2014.

NUSSIO, L. G.; CAMPOS, F. P.; DIAS, F. N. Importância da qualidade da porção vegetativa no valor alimentício da silagem de milho. p. 127-145. **In: Simpósio Sobre Produção e Utilização de Forragens Conservadas**. Jobim, C. C.; Cecato, U.; Damasceno, J. C. e Santos, G. T. Maringá, Brasil, 2001.

OLIVEIRA, J. S.; SOBRINHO, F. S. Avaliação de cultivares de milho para silagem: resultados do ano agrícola 2006-2007. Juiz de Fora - MG: Embrapa Gado de Leite, **Circular Técnica**, n. 91, 2007.

OLIVEIRA, L. B. et al. Perdas e valor nutritivo de silagens de milho, sorgo-sudão, sorgo forrageiro e girassol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 1, p. 61-67, 2010.

PAHLOW, G., MUCK, R. E., DRIEHUIS, F. Microbiology of ensiling. **In: Silage Science and Technology**. D.R. Buxton, R. E. Muck, and J. H Harrison, ed. American Society of Agronomy. Madison, WI. p. 31-93, 2003.

PAZIANI, S.F. et al. Características agronômicas e bromatológicas de híbridos de milho para produção de silagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 3, p. 4141-417, 2009.

PEREIRA, E. S. et al. Estimative of the nutritional value of agroindustrial byproducts by using in vitro gas production technique. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 391-398, 2013.

PHILLIP, L. E.; FELLNER, V. Effects of bacterial inoculation of high-moisture ear corn on its aerobic stability, digestion, and utilization for growth by beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 10, p. 3178-3187, 1992.

PITT, R. E.; MUCK, R. E.; PICKERING, N. B. A model of aerobic fungal growth in silage. 2. Aerobic stability. **Grass and Forage Science**, v. 46, n. 3, p. 301-312, 1991.

REIS, R. A.; BERNARDES, T. F.; SIQUEIRA, G. R. **Forragicultura: Ciência, Tecnologia e gestão de recursos forrageiros**. Jaboticabal: FUNEP, 2014, p. 714.

RUSSELL, J. B. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluation cattle diets: Ruminant fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3551-3581, 1992.

- SÁ NETO, A. et al. Silagem de milho ou de cana-de-açúcar com *Lactobacillus buchneri* exclusivamente ou em associação com *L. plantarum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 5, p. 528-535, 2013.
- SANTOS, M. C.; KUNG Jr, L. *Short communication*: The effects of dry matter and length of storage on the composition and nutritive value of alfalfa silage. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 5466-5469, 2016.
- SANTOS, E. M.; ZANINE, A. M. Silagem de gramíneas tropicais. **Colloquium Agrariae**, v. 2, n. 1, p. 32-45, 2006.
- SARICICEK, B. Z. et al. Effect of storage time on nutrient composition and quality parameters of corn silage. **Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology**, v. 4, n. 11, p. 934-939, 2016.
- SHOFIELD, P. Gas production methods. In: D”Mello, Jabolism and .P.F. (ed), **Farm Animal Metabolism and Nutrition**. Cab International, p. 209-232, 2000.
- SCHOFIELD, P.; PITT, R. E.; PELL, A. N. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. **Journal Animal Science**, v. 72, n. 11, p. 2980-2991, 1994.
- SIMPSON, D. J. Proteolytic degradation of cereal prolamins, the problem with proline. **Plant Science**, v. 161, n. 5, p. 825–838, 2001.
- SIQUEIRA, G. R. **Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) ensilada com aditivos químicos e bacterianos**, 2005, 91 p. Dissertação (Mestrado). Jaboticabal: UNESP/FCAV, Brasil.
- SNIFFEN, C. J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3562-3577, 1992.
- STORM, I. M. L. D. et al. Dynamics in the microbiology of maize silage during whole-season storage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 1017-1026, 2010
- TABACCO, E. et al. Dry matter and nutritional losses during aerobic deterioration of corn and sorghum silages as influenced by different lactic acid bacteria inocula. **Journal Dairy Science**, v. 94, p. 1409-1419, 2011.
- TAGLIAPIETRA, F. et al. *In vitro* rumen fermentation: Effect of headspace pressure on the gas production kinetics of corn meal and meadow hay. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, n. 3-4, p. 197-201, 2010.
- TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **Grassland research Institute**, v. 18, n. 2, p. 104-111, 1963.
- THEODOROU, M. K. et al. A simple gas production using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, n. 3-4, p. 185-197, 1994.

WEINBERG, Z. G.; CHEN, Y. Effects of storage period on the composition of whole crop wheat and corn silages. **Animal Feed Science and Technology**, v. 185, n. 3-4, p. 196-200, 2013.

WEINBERG, Z. G. et al. Ensiling fermentation products and aerobic stability of corn and sorghum silages. **Grassland Science**, v. 57 p. 46-50, 2011.

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

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

YOUNG, K. M. et al. Effect of exogenous protease enzymes on the fermentation on nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 11, p. 6687-6694, 2012.)