

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL

CARACTERÍSTICAS DAS SILAGENS DE GRÃOS DE MILHO
INFLUENCIADAS PELA REIDRATAÇÃO E PELA
INOCULAÇÃO COM *L. buchneri* SOBRE O DESEMPENHO DE
BOVINOS DE CORTE CONFINADOS

Naiara Caixeta da Silva
Zootecnista

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL

CARACTERÍSTICAS DAS SILAGENS DE GRÃOS DE MILHO
INFLUENCIADAS PELA REIDRATAÇÃO E PELA
INOCULAÇÃO COM *L. buchneri* SOBRE O DESEMPENHO DE
BOVINOS DE CORTE CONFINADOS

Naiara Caixeta da Silva

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Rezende Siqueira

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Silva, Naiara Caixeta da
S586c Características das silagens de grãos de milho influenciadas pela reidratação e pela inoculação com *L. buchneri* sobre o desempenho de bovinos de corte confinados / Naiara Caixeta da Silva. -- Jaboticabal, 2016
xv, 114 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Gustavo Rezende Siqueira
Banca examinadora: João Luiz Pratti Daniel, Otavio Rodrigues Machado Neto, Rafael da Costa Cervieri, Thiago Fernandes Bernardes

Bibliografia

1. Degradabilidade *in situ*. 2. Eficiência alimentar. 3. Prolamina. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.085:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

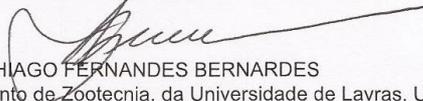
TÍTULO: CARACTERÍSTICAS DAS SILAGENS DE GRÃOS DE MILHO INFLUENCIADAS PELA REIDRATAÇÃO E PELA INOCULAÇÃO COM *L. buchneri* SOBRE O DESEMPENHO DE BOVINOS DE CORTE CONFINADOS.

AUTORA: NAIARA CAIXETA DA SILVA

ORIENTADOR: GUSTAVO REZENDE SIQUEIRA

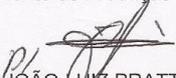
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:


Pesquisador Dr. GUSTAVO REZENDE SIQUEIRA
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios / APTA - Colina/SP


Prof. Dr. THIAGO FERNANDES BERNARDES
Departamento de Zootecnia, da Universidade de Lavras, UFLA, Câmpus de Lavras


Prof. Dr. RAFAEL DA COSTA CERVIERI
Universidade São Marcos/UNIMARCO - São Paulo/SP


Prof. Dr. OTAVIO RODRIGUES MACHADO NETO
Departamento de Produção Animal / FMVZ / UNESP - Botucatu/SP


Prof. Dr. JOÃO LUIZ PRATTI DANIEL
Departamento de Zootecnia / UEM - Universidade Estadual de Maringá
Participação por Videoconferência

Jaboticabal, 28 de outubro de 2016.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Naiara Caixeta da Silva, nascida em 09 de junho de 1988, em Patos de Minas, Minas Gerais, filha de José Carlos Caixeta e Sebastiana Maria Caixeta Silva.

Graduanda pelo Centro Universitário de Patos de Minas – Unipam, nos anos de 2007 a 2010. Mestranda pela Universidade Federal de Lavras, nos anos de 2011 a 2013.

“Combati o bom combate, completei a corrida, guardei a fé.”

II Timóteo 4, 7

Ao meu amado pai, José Carlos Caixeta (*in memoriam*), por todo amor e pelo exemplo que me fez seguir esta profissão. À minha mãezinha, Sebastiana Maria Caixeta Silva, por todo carinho e por me acolher em todos os momentos.

DEDICO

A todos os membros do Grupo de Estudos em Produção e Nutrição de Ruminantes – Gepror, pela amizade e companheirismo neste trabalho e aos “*Os Aptos*”, meus irmãos nessa caminhada.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por conceder a graça de completar mais essa etapa dos meus estudos e ter me levado mais longe que um dia eu pude imaginar.

Aos meus amados pais, José Carlos e Sebastiana, pelo ensinamento, pela formação moral, por todo amor, incentivo, carinho e por estarem ao meu lado em todas as dificuldades.

Ao meu irmão querido Carlos Henrique, pela amizade, incentivo e companheirismo.

Ao meu orientador, Prof. Gustavo Rezende Siqueira, pela contribuição na realização deste sonho, por acreditar no meu potencial, pela oportunidade de estar neste grupo de pesquisa e me ensinar a buscar conhecimento e lutar pelos meus sonhos.

Ao professor Flavio Dutra de Resende pelos valerosos conselhos e pela luta constante para trazer melhorias ao nosso centro de pesquisa e às nossas vidas.

Aos amigos do grupo de estudos Gepror, por todo o aprendizado de suplementação a pasto, pela ajuda na condução do experimento e pela amizade.

Aos velhos amigos que sempre rezavam pela realização deste sonho; pelo carinho e palavras de consolo.

Aos meus irmãos de casa “Hospedaria” e da vida: Verônica (Brow), Aline, Ivanna, João Alexandrino (Paraíba), Randerson (Juca), João Marcus (Jhony), Cleisy, Valquiria, Flávio, Ana Paula, Felipe, Renan, Letícia, Danubia, Alexandre. Ao agregado, nas não menos importante, Rodolfo (Dorfo). A vocês minha eterna amizade por serem, além de companheiros de trabalhos, de estudos e de farra os melhores amigos que tive nesses últimos anos. Em especial ao Felipe por todo o carinho e ajuda. Aos ex-moradores e eternos Beatriz (Bia), Matheus, Andressa, Marco. Seremos sempre “Os Aptos”.

À nossa flor Cleisy, por ser uma grande amiga, por cuidar dos “Filhos” e dividir comigo grande parte desses experimentos, além de ser minha parceira nas discussões sobre metodologias e estatística.

Aos meus TT3 Ana Cassia, Paulinha, Vinicius e Michele, por dividirem essa responsabilidade comigo. Em especial ao Vinicius, por dividir talvez a parte mais

cansativa e pesada que foi o experimento de metabolismo, por me apoiar e cuidar de mim até quando torci o pé, mas principalmente pela amizade.

À FCAV/Unesp/Jaboticabal, pela oportunidade de cursar o doutorado. Agradeço aos professores Ricardo Reis e Izabelle em nome de todos os professores da Unesp, pela oportunidade de conhecimento nas disciplinas cursadas.

À Apta/Alta Mogiana, pelas oportunidade do espaço para a realização deste trabalho.

O TODOS os funcionários da Apta, mas TODOS mesmo, porque meu experimento exigiu a ajuda de cada um em pelo menos uma etapa. Em especial aos que eu mais precisei e que prontamente me ajudaram: Antônio (Tozinho), Suely, Sidiney (Subio), Miltinho, Luizinho, Chico, Adenillsom, Lore, Seu João, Seu Alcino, Flora, Rodolfo (Toga) e Regina.

Aos meus padrinhos, Sinval e Neli, por todas as orações e pelo enorme carinho.

Ao professor Alexandre Vaz Pires e ao Marcus, por fistularem os bois do experimento de desempenho.

Aos “Filhos” nossos fistulados que serviram tão bem ao grande propósito da ciência, que é gerar conhecimento.

À Fapesp, pelo financiamento do projeto e ao CNPq, pela bolsa.

Neste doutorado, aprendi muito mais que melhorar a digestibilidade do amido, ou como suplementar bovinos, ou como é ser do berço do boi 777. Aprendi a respeitar e conviver com o diferente, não porque sou obrigada, mas porque é bom conhecer o outro sem preconceito.

SUMÁRIO

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	1
1 Introdução.....	1
2 Revisão de Literatura	3
2.1 Caracterização do grão de milho	3
2.2 Processamento do grão de milho.....	4
2.2.1 Efeito da ensilagem sobre a digestibilidade do amido	5
2.2.2 Ensilagem de milho reidratado.....	7
2.3 Uso de inoculantes na ensilagem de grãos de milho.....	8
2.4 Desempenho de animais confinados consumindo silagem de milho com alta umidade	11
Referências	13
CAPÍTULO 2 - Perfil fermentativo, características microbiológicas e estabilidade aeróbia de silagens de milho reidratado com diferentes doses de <i>Lactobacillus buchneri</i> ou <i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> e <i>Pediococcus acidilactici</i>	22
Resumo.....	22
1. Introdução	23
2. Material e Métodos	25
3. Resultados	30
4. Discussão.....	39
5. Conclusão.....	44
Referências.....	44
CAPÍTULO 3 - Influência dos tempos de armazenamento e do uso do inoculante <i>L. buchneri</i> na matriz proteica, perfil fermentativo, estabilidade aeróbia e degradabilidade de silagens de milho grão úmido ou reidratado	49
RESUMO	49
INTRODUÇÃO	50
MATERIAL E MÉTODOS	52
RESULTADOS.....	58
DISCUSSÃO.....	72

CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	78
CAPÍTULO 4 – Desempenho e metabolismo de bovinos Nelore confinados consumindo silagens de milho grão úmido ou reidratado com e sem o uso de <i>L. buchneri</i>	
INTRODUÇÃO	84
MATERIAL E MÉTODOS	85
RESULTADOS	86
DISCUSSÃO.....	95
CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS	109
CONCLUSÃO	110
REFERÊNCIAS	110



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 20858/13 do trabalho de pesquisa intitulado "**Influência da ensilagem do milho úmido ou reidratado e da inoculação com *L. buchneri* sobre as características do amido e o desempenho de bovinos de corte confinados**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Gustavo Rezende Siqueira está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 07 de julho de 2014.

Jaboticabal, 07 de julho de 2014.


Prof.^a Dr.^a Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

CARACTERÍSTICAS DAS SILAGENS DE GRÃOS DE MILHO INFLUENCIADAS
PELA REIDRATAÇÃO E PELA INOCULAÇÃO COM *L. buchneri* SOBRE O
DESEMPENHO DE BOVINOS DE CORTE CONFINADOS

RESUMO – Foram conduzidos três experimentos com os objetivos de determinar 1) a melhor dose e tipo de inoculante, homo ou heterofermentativo, para grão de milho reidratado; 2) os efeitos do tempo de estocagem e do uso de inoculante sobre o perfil fermentativo, estabilidade aeróbia e degradabilidade *in situ* de silagem de milho grão úmido e silagem de grão de milho reidratado; 3) as alterações nos parâmetros ruminais, digestibilidade e desempenho de bovinos Nelore, consumindo dietas contendo milho seco moído ou silagem de milho grão úmido ou silagem de grão de milho reidratado sem e com o uso de inoculante. No experimento 1 foi avaliado silagem de grão de milho reidratado sem inoculante (C), com *L. plantarum* + *P. acidilactici* (LPPA) e com *L. buchneri* (LB), ambos nas doses de 1×10^5 , 5×10^5 e 1×10^6 ufc/g, estocadas por 124 dias. As silagens inoculadas com LB em relação ao C apresentaram maior ($P < 0,01$) contagem de bactérias ácido lácticas (BAL), concentração de ácido acético, ácido propiônico e 1,2-propanodiol e menor ($P < 0,01$) pH, leveduras e fungos filamentosos nos 12 dias de exposição ao ar e maior ($P < 0,01$) estabilidade aeróbica, isso ocorreu já na primeira dose (1×10^5 ufc/g). O uso de LB também aumentou ($P < 0,05$) a quebra de prolamina e a degradabilidade *in situ* das silagens. Uso de LPPA não apresentou melhorias na fermentação e piorou a deterioração aeróbia em comparação ao controle. No experimento 2 foi avaliado um esquema fatorial 2×2 , sendo o primeiro fator dois tipos de ensilagem, silagem de milho úmido (MU) e silagem de milho reidratado (MR); e o segundo fator o uso de inoculante, sem (Controle) e com *L. buchneri* (LB; 1×10^5 ufc/g), com aberturas aos 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 e 300 dias de estocagem. A MR apresentou maior concentração total de ácidos, enquanto as silagens com LB apresentaram maior concentração de ácido acético e 1,2-propanodiol e menor de ácido láctico e ácido butírico. Ao longo dos tempos de estocagem, MU LB e MR LB apresentaram menor contagem de leveduras e maior contagem de BAL e estabilidade aeróbia. A MR com tamanho de partícula original apresentou maior degradabilidade *in situ* que a MU. O tempo mínimo para atingir ganhos altos de degradabilidade foi entre 30 e 70 dias de estocagem. No experimento 3 foram avaliadas cinco dietas contendo: silagem de milho grão úmido (MU), silagem de milho grão úmido com *L. buchneri* (MUB), silagem

de grão de milho reidratado (MR; 1×10^5 ufc/g), silagem de grão de milho reidratado com *L. buchneri* (MRB; 1×10^5 ufc/g) e milho seco moído (MSC). No experimento de metabolismo foram utilizados 10 animais fistulados, agrupados em dois quadrados latinos (5×5), enquanto no experimento de desempenho foram utilizados 180 animais Nelore (310 ± 17 kg), sendo 6 animais por baia e 6 baias por tratamento. Os animais que consumiam silagens apresentaram maior ($P < 0,05$) digestibilidade da MS, MO e PB; maior concentração de propionato e ácidos graxos de cadeia curta totais; menor ($P < 0,01$) CMS e pH ruminal; e maior ($P < 0,01$) eficiência alimentar, ELM e ELG da dieta em relação aos animais consumindo MSC. O uso de *L. buchneri* aumentou a estabilidade aeróbia, e o tempo de estocagem aumentou a degradabilidade das silagens. Recomenda-se o uso de silagens de grãos de milho por propiciar melhor digestibilidade e eficiência alimentar. A silagem de grão de milho reidratado é uma alternativa à silagem de milho grão úmido.

Palavras-chave: degradabilidade *in situ*, prolamina, eficiência alimentar

CHARACTERISTICS OF CORN GRAIN SILAGES INFLUENCED BY REHYDRATION AND INOCULATION WITH *L. buchneri* ON THE PERFORMANCE OF FEEDLOT CATTLE

ABSTRACT - Three trials were conducted with the objective to determine 1) the best dose and type of inoculant, homo or hetero fermentative, for reconstituted corn grain silages; 2) the effects of storage time and the use of inoculant on the fermentation profile, aerobic stability and *in situ* degradability of high moisture and reconstituted corn grain silages; 3) changes in ruminal fermentation, digestibility and performance of Nellore steers fed diets containing dry ground corn or high moisture or reconstituted corn grain silages without and with inoculant. In trial 1, treatments were: reconstituted corn grain silages without inoculant (C), *L. plantarum* + *P. acidilactici* (LPPA) and *L. buchneri* (LB), both at doses of 1×10^5 , 5×10^5 or 1×10^6 cfu/g, stored for 124 days. Silages inoculated with LB compared to C had greater ($P < 0.01$) count of lactic acid bacterial (LAB), acetic acid, propionic acid and 1,2-propanediol concentrations and lower ($P < 0.01$) pH, yeasts and molds for 12 days of exposure to air and higher ($P < 0.01$) aerobic stability, this occurs already at the first dose (1×10^5 cfu/g). The use of LB also increased ($P < 0.05$) proteolysis and *in situ* degradability of silages. The LPPA showed no improvements in fermentation and increased mold counts during the aerobic stability. The trial 2 was designed in a 2×2 factorial arrangement: two types of silage, high moisture corn (HMC) or reconstituted corn grain silages (RCS); and without (control) or with *L. buchneri* (LB; 1×10^5). Silos were opened after 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 and 300 days of storage. The RCS showed higher overall concentration of acids, while silages inoculated with LB had greater concentrations of acetic acid and 1,2-propanediol and lower content of lactic and butyric acids. Along the storage time, HMC LB and RCS LB showed lower yeast count and higher BAL count and aerobic stability. The RCS with original particle size showed higher *in situ* degradability than HMC. The minimum length of storage to reach high degradability of gains is between 30 and 70 days of storage. In trial 3 were evaluated five diets: high moisture corn (HMC), HMC with *L. buchneri* (HMCLB), reconstituted corn grain silages (RCS), RCS with *L. buchneri* (RCSLB) and dry ground corn (DGC). We used 10 cannulated bulls in a metabolism experiment, assigned in two latin squares (5×5), and 180 Nellore bullocks (310 ± 17 kg) in the performance experiment, with 6 animals per pen and 6 pens per treatment. Animals fed silages had higher ($P < 0.05$) DM, OM

and CP digestibility, greater concentrations of propionate and total short-chain fatty acids, and lower ($P < 0.01$) DMI, rumen pH and higher ($P < 0.01$) feed efficiency, NEm and NEg for the diet for the animals consuming DGC. The use of *L. buchneri* increases aerobic stability and storage time increases the degradability of silages. It is recommended the use of corn grain silages by providing better digestibility and utilization of diet. Reconstituted corn grain silages is an alternative to the high moisture corn silage.

Keywords: feed efficiency, *in situ* degradability, prolamin

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1 Introdução

O Brasil se destaca no cenário internacional como um dos maiores produtores e exportadores de carne bovina, com grande potencial de crescimento. O sistema de produção brasileiro tem grande demanda por tecnologias que permitam aumentar a produção de carne bovina e reduzir o tempo de abate. Dentre essas tecnologias se destaca o uso da terminação de animais em confinamento.

O milho tem sido a principal fonte energética utilizada em dietas de confinamento, sendo utilizado por 79,3% dos nutricionistas brasileiros, comportamento semelhante ao que ocorre nos confinamentos dos Estados Unidos onde é utilizado por 87,5% dos nutricionistas. Níveis de inclusão de grãos acima de 50% são praticados por 91,2% dos nutricionistas americanos e por apenas 58,1% dos brasileiros (VASCONCELOS; GALYEAN, 2007; MILLEN et al., 2009). Embora o nível de inclusão de grãos nas dietas brasileiras seja ainda bem inferior às dietas americanas, há um crescente interesse no Brasil por dietas com menor inclusão de volumosos (SANTOS et al., 2013), o que coincide com um aumento na área total plantada de milho nos últimos anos (CONAB, 2016).

O tipo de milho predominante no Brasil é o de textura dura do endosperma, que possui menor digestibilidade do amido, denominado *flint*. Suas características permitem um amplo incremento na digestibilidade do amido do milho e, conseqüentemente, na eficiência alimentar e no desempenho de bovinos consumindo dietas com milho. Técnicas de processamento do milho, como a ensilagem do grão com alto teor de umidade, têm por objetivo aumentar a digestibilidade do amido (FERRARETTO; CRUMP; SHAVER, 2013).

Na ensilagem ocorre proteólise por enzimas dos microrganismos presentes na silagem, que leva à degradação da matriz proteica que envolve os grânulos de amido (HOFFMAN et al., 2011). Essa ação explica o aumento da degradabilidade ruminal do amido pelo possível aumento do acesso por parte dos microrganismos do rúmen aos grânulos de amido (HOFFMAN et al., 2011), o que tem levado ao aumento da eficiência alimentar de vacas leiteiras (FERRARETTO; CRUMP; SHAVER, 2013) e

bovinos de corte em terminação (LADELY et al., 1995; HUCK et al., 1998; HENRIQUE et al., 2007; CORRIGAN et al., 2009).

A ensilagem de grão úmido possui resultados consolidados, que justificam sua adoção, porém o curto tempo de colheita, na umidade ideal (30 a 35%), podem dificultar sua utilização. A prática da reconstituição dos grãos de milho com água pode ser uma alternativa por flexibilizar o sistema (PEREIRA; PEREIRA, 2013). Isso representa uma vantagem diante da impossibilidade de plantar áreas para a produção de grão úmido ou de baixa disponibilidade de terras da propriedade, permitindo a aquisição do milho fora da propriedade.

Um fator limitante para a ensilagem de milho com alta umidade é a sua alta suscetibilidade à deterioração aeróbia (SEBASTIAN et al., 1995). O uso de inoculantes contendo cepas de bactérias heterofermentativas obrigatórias, particularmente o *L. buchneri*, tem aumentado a estabilidade aeróbia de silagens de planta inteira de milho (RANJIT; KUNG, 2000; TABACCO et al., 2011) e silagem de grão milho com alta umidade (TAYLOR; KUNG, 2002), por ocasionarem aumento na concentração de ácido acético, que é um importante componente antifúngico, levando a um decréscimo no número de leveduras (KLEINSCHMIT; KUNG, 2006), que são os principais microrganismos iniciadores do processo de deterioração (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Entretanto dispõe-se de poucas informações na literatura a respeito do efeito de inoculantes no processo fermentativo e na estabilidade aeróbia de silagem de milho reidratado, bem como ausência de informações sobre a resposta de bovinos Nelore a esse processamento de grãos.

Portanto os objetivos deste trabalho foram: 1) verificar a necessidade do uso de inoculantes para silagens de milho reidratado; 2) avaliar as características químicas, nutritivas e perdas por deterioração aeróbia das silagens de milho úmido ou reidratado, ambos sem e com o uso de *L. buchneri*; 3) verificar os benefícios do processo da ensilagem sobre a digestibilidade ruminal do amido através da avaliação do desempenho e de parâmetros ruminais de bovinos confinados alimentados com silagens de milho úmido ou reidratado sem e com o uso de *L. buchneri* em comparação com o uso de milho seco moído.

2 Revisão de Literatura

2.1 Caracterização do grão de milho

O grão de milho é composto por uma camada fibrosa chamada de pericarpo (5% do grão), pelo gérmen ou embrião (11% do grão), rico em proteína, e pelo endosperma (75 a 80% do grão), constituído de proteínas e amido. A prolamina do milho, denominada zeína, tem grande importância na nutrição animal e representa de 30 a 60% de toda a proteína do grão. A zeína é constituída de quatro subclasses: α , β , γ e δ . Com o avanço da maturidade do grão, as zeínas do tipo α e β formam ligações, enquanto γ e δ se ligam à α e β zeína, formando uma matriz proteica hidrofóbica que encapsula os grânulos de amido (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000). Os dados de Hoffman et al. (2011) sugerem que a γ -zeína é altamente degradada no processo fermentativo da silagem de grão úmido de milho.

No milho que possui endosperma farináceo, os grânulos de amido são esferas dispersas pelo endosperma, que é mole, poroso e de baixa densidade e a matriz proteica é esparsa e fragmentada. No milho de endosperma vítreo, os grânulos de amido são helicoidais e adensados, possuindo fortes ligações entre os grânulos e a matriz proteica, que é densa e bem desenvolvida, o que dificulta a penetração de água no grânulo, a hidrólise enzimática e a colonização por parte das bactérias do rúmen, resultando em menor digestibilidade do amido (SANTOS; CARARETO; MARQUES, 2011; PEREIRA; PEREIRA, 2013). O milho duro (ou *flint*) apresenta maior proporção de vitreosidade do endosperma (73,1%) que o milho dentado (48,2%) que, por sua vez, apresenta maior proporção de endosperma farináceo (CORREA et al., 2002).

A degradação ruminal do amido pode ser influenciada pela textura do endosperma. Correia et al. (2002), comparando híbridos brasileiros e híbridos cultivados nos Estados Unidos, observaram que a vitreosidade dos híbridos duros brasileiros foi em média 73,1% (variando de 64,2 a 80,0%), enquanto a vitreosidade dos híbridos dentados americanos foi em média de 48,2% (variando de 34,9 a 62,3%). Além disso, a degradação ruminal do amido foi 77,4% nos híbridos norte-americanos e 48,5% nos brasileiros (PEREIRA, PEREIRA, 2013). O aumento da vitreosidade do

milho reduz a disponibilidade *in situ* do amido (CORREIA et al., 2002), a degradação ruminal e a digestibilidade no trato digestivo total (CORONA; OWENS; ZINN, 2006).

Portando, é possível que o valor energético dos cultivares de milho duro brasileiros seja inferior aos tabulados pelo NRC (1996), pois esses cálculos são baseados em estudos com milho dentado nos Estados Unidos (SANTOS; CARARETO; MARQUES, 2011). Também é esperado que o milho tipo *flint*, predominante no Brasil, apresente respostas positivas maiores aos métodos de processamento, como pode ser observado em uma compilação de dados realizada por Santos, Carareto e Marques (2011), onde relataram maior acréscimo na eficiência alimentar de animais consumindo silagens de milho grão úmido nos trabalhos nacionais (13,72%) que nos trabalhos americanos (8,6%), quando comparados ao milho finamente moído. Em virtude disso, há grande necessidade de buscar técnicas que melhorem a disponibilidade do amido do milho tipo *flint*.

2.2 Processamento do grão de milho

O processamento do grão de milho, seja por aumento da umidade, temperatura e/ou pressão, apresenta efeitos positivos sobre a digestibilidade ruminal, pós-ruminal e total do amido (THEURER et al., 1999; ZINN; OWENS; WARE, 2002; FERRARETTO; CRUMP; SHAVER, 2013). Essas melhorias estão relacionadas a distúrbios na matriz proteica que circunda os grânulos de amido e à desorganização dos mesmos (THEURER et al., 1999), o que aumenta o acesso das bactérias do rúmen ao amido. A magnitude da alteração promovida pelo processamento é inversamente proporcional à digestibilidade do grão seco. Portanto os grãos que mais respondem ao processamento são sorgo e milho e entre os grãos de milho o tipo *flint* em comparação aos dentados (SANTOS; CARARETO; MARQUES, 2011).

Em uma compilação de dados feita por Owens e Soderlund (2007) foram observadas diferenças na digestibilidade do amido em diferentes compartimentos do trato digestivo de garrotes em função do processamento realizado nos grãos. Métodos mais intensos de processamento, como ensilagem de grão com alta umidade e floculação, apresentaram aumento na proporção do amido total que era digerido no rúmen e no intestino delgado e baixa digestibilidade do amido no intestino grosso, em

virtude de quase todo o amido digestível ter sido digerido nos compartimentos anteriores, quando comparado aos tratamentos menos intensos, como milho laminado seco.

O aumento da digestibilidade ruminal do amido é apontado como uma explicação para a melhoria no desempenho de bovinos de corte, em virtude do aumento do aporte energético para o animal e do aumento da produção de proteína microbiana e consequente fluxo de proteína microbiana para o intestino delgado (SANTOS; CARARETO; MARQUES, 2011).

2.2.1 Efeito da ensilagem sobre a digestibilidade do amido

A silagem de grão com alta umidade, também conhecida como silagem de grão úmido, consiste na ensilagem do grão de milho em estágio avançado de maturação em torno da linha negra, quando a planta apresenta teor de umidade ainda elevado, em torno de 30 a 40%. Dentre os métodos de processamento de grãos, a ensilagem apresenta vantagens operacionais quando comparada a outras técnicas, como moagem e floculação. A ensilagem de milho grão úmido possibilita a antecipação da retirada da cultura da área plantada em aproximadamente 30 dias, o que depende da região e das condições climáticas, uma vez que o grão de milho é colhido com MS reduzida (60 a 70%), enquanto para a estocagem de grão seco a colheita é feita com MS acima de 82%, mesmo quando o grão passa pelo processo de secagem. A antecipação da colheita da lavoura possibilita um novo plantio de milho ou outras culturas e, no caso de integração lavoura pecuária, ocorre a liberação mais rápida da área de pastagem para manejo. Com relação aos processos mais intensos como a floculação, a ensilagem apresenta a vantagem de ter o custo reduzido por dispensar a aquisição de maquinário de elevado custo.

A proteína zeína, que está presente na matriz proteica, pode ser potencialmente degradada durante o processo de ensilagem por solubilização ou atividade proteolítica. Apesar de ser insolúvel em água e no fluido ruminal, a zeína pode ser solúvel em ácido láctico e ácido acético (LAWTON, 2002), que são encontrados nas silagens como produtos da fermentação. A proteólise, devido à ação de enzimas das plantas ou pela ação das proteases das bactérias, é outro mecanismo

intrínseco à fermentação de silagens de milho com alta umidade, que pode induzir a degradação de proteínas (VIERSTRA, 1996).

Segundo Hoffman et al. (2011), a degradação da proteína zeína pode estar mais relacionada à atividade de proteólise, uma vez que, aos 240 dias de ensilagem houve redução da proteína zeína e aumento do N-NH₃. A degradação da γ -zeína, que ocorreu em maior proporção, e das outras frações de zeína, que são responsáveis pelas ligações cruzadas com os grânulos de amido, promoveu maior dissociação entre os grânulos e a matriz proteica, o que foi confirmado pela microscopia eletrônica dos grãos. Portanto a ensilagem do grão com alta umidade pode melhorar o acesso das bactérias do rúmen aos grânulos de amido, melhorando assim sua degradação ruminal.

Fernandes et al. (2015) observaram que o aumento do tempo de estocagem reduz os teores de prolamina em silagens de grão de milho com alta e baixa vitreosidade, ensilados em diferentes estágios de maturação (linha do leite, linha negra para silagem de grão úmido e seco depois moído e reidratado para silagem de grão reidratado) o que propiciou aumento da degradabilidade ruminal *in situ* do amido com 12 horas de incubação. Kung Jr, Windle e Walker (2014) observaram ao longo do tempo de estocagem (0, 70 e 140 dias) redução nos teores de prolamina e aumento nos teores de nitrogênio amoniacal e proteína solúvel, indício da quebra da matriz proteica que recobre os grãos de amido, e aumento da digestibilidade *in vitro* do amido. Kung Jr. (2013) sugere que tempos de armazenamento de 3 a 6 meses são necessários para o aumento da digestibilidade do amido das silagens da planta inteira de milho. Com o objetivo de estabelecer recomendações práticas para o tempo mínimo de estocagem para silagem de milho, Daniel, Junges e Nussio (2014) compilaram uma série de dados e observaram que, nos primeiros 28 dias de estocagem, ocorrem os maiores ganhos em digestibilidade do amido (0,31 unidades percentuais por dia), sendo que após esse período o incremento cai em 10 vezes (0,03 unidades percentuais por dia). Portanto, experimentos com tempos prolongados de estocagem são necessários para determinar qual o ponto onde obtemos os ganhos máximos em digestibilidade do amido para silagens de milho grão úmido e reidratado.

2.2.2 Ensilagem de milho reidratado

A ensilagem do grão de milho seco, após passar por processo de reidratação, que devolve ao grão a umidade necessária para a sua ensilagem, é uma alternativa à ensilagem do grão úmido de milho. Por apresentar um curto intervalo de colheita, aumentam-se as chances de insucesso na ensilagem de milho com alta umidade, em virtude da maturação excessiva e consequente perda de umidade (PEREIRA; PEREIRA, 2013). A ensilagem do grão reidratado apresenta as vantagens da ensilagem, sem o risco de insucesso proveniente do ponto de colheita avançado, quando a umidade do grão cai abaixo de 28% o que reduz a atividade de água necessária para o crescimento microbiano durante a fermentação.

Os grãos de milho, ao alcançarem a maturidade fisiológica com uma concentração de umidade em torno de 34% no milho dentado e 37% no milho duro, não sofrem mais alteração no seus teores de amido (PHILIPPEAU; MICHALET-DOREAU, 1997). Isso demonstra que o milho colhido com alta umidade e o reidratado, provavelmente terão concentrações de amido semelhantes. Correia et al. (2002) não observaram influência na concentração de amido do grão de milho com o avanço da maturidade, entretanto ocorre aumento da vitreosidade. O estresse sofrido pelos grãos de milho durante a secagem no campo e por aquecimento em secador comercial, modifica a população bacteriana do milho seco em comparação com o milho colhido na linha negra para a confecção de silagem de grão úmido. Carvalho (2014) observou no dia 0 grande quantidade de bactérias do gênero *Clostridium* (19,5% do total de microrganismos) e menor população do gênero *Lactobacillus* (9,1% do total) no material ensilado de grãos de milho reidratados, resultado bem diferente do milho colhido para grão úmido, onde pode ser observado uma alta quantidade de *Lactobacillus* (33,5% do total) e a ausência de *Clostridium*.

A menor digestibilidade do grão de milho seco em relação ao milho com alta umidade, devido ao aumento da vitreosidade, pode ser compensada pela moagem fina para reidratação, uma vez que o tamanho de partícula também é determinante da digestibilidade do grão (FERRARETTO; CRUMP; SHAVER, 2013; PEREIRA; PEREIRA, 2013). Devido às modificações no perfil microbiológico das silagens de milho reidratado, é necessário que estudos sejam realizados para determinar qual é o

impacto na fermentação, bem como os efeitos do uso de aditivos que melhorem o perfil fermentativo e a estabilidade aeróbia dessas silagens.

São encontrados alguns precedentes na literatura sobre a reconstituição de grãos de milho e de sorgo, nos trabalhos de Tonroy, Perry e Beeson (1974), Tonroy e Perry (1974), Owens et al. (1997). Entretanto, as formas de reidratação são diferentes das propostas por recentes trabalhos realizados no Brasil (ANDRADE FILHO et al., 2010a; ANDRADE FILHO et al., 2010b; BITENCOURT, 2012; PEREIRA, 2012; CARVALHO, 2014; FERNANDES et al., 2015; MORAIS et al., 2015a; MORAIS et al., 2015b), onde tem se preconizado a moagem fina do milho seco e reidratação a teores de umidade próximo de 35% com água à temperatura ambiente, para posterior ensilagem.

Contudo não há trabalhos que comparem a silagem de milho com alta umidade com a silagem de milho reidratado sobre o desempenho de bovinos de corte confinados consumindo essas silagens.

2.3 Uso de inoculantes na ensilagem de grãos de milho

A ensilagem de grão úmido de milho está propensa à deterioração, por apresentar altos teores de ácido láctico e carboidratos solúveis remanescentes, que são utilizados como substrato para o crescimento de leveduras e fungos filamentosos, após a abertura do silo (SEBASTIAN et al., 1996). Contudo a literatura dispõe de poucas informações sobre o perfil fermentativo e a estabilidade aeróbia das silagens de milho reidratado (REZENDE et al., 2014), o que estimula novas pesquisas nessa área.

Os inoculantes bacterianos, classificados como estimuladores da fermentação, como as bactérias ácido lácticas heterofermentativas facultativas (comumente chamadas de homofermentativas), como *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus* e *Enterococcus faecium*, tem a capacidade de melhorar o processo fermentativo e acelerar a acidificação da silagem, o que reduz as fermentações secundárias e proporciona maior recuperação de energia. Entretanto, o uso desses aditivos em silagens de milho pode agravar ainda mais o problema da deterioração aeróbia após a abertura e nas áreas periféricas de silos horizontais. Kleinschmit, Schmidt e Kung

(2005) estudaram o uso de *L. plantarum* como inoculante em silagem de milho planta inteira e observaram decréscimo na estabilidade aeróbia, devido à menor produção de substâncias inibidoras de fungos, como o ácido acético, e maior contagem de leveduras. Kung et al. (2004) não observaram diferença entre o controle e as silagens de milho grão úmido com inoculantes bacterianos (entre eles o *Lactobacillus plantarum*) na estabilidade aeróbia das silagens, embora as silagens inoculadas apresentassem numericamente menor estabilidade aeróbica. Sendo portanto, mais indicado o uso de inoculantes à base de bactérias homoláticas em culturas que têm problemas fermentativos.

Quanto ao processo de deterioração aeróbica, o contato com o ar pode ocorrer em algumas fases, como no enchimento do silo, armazenamento do material por falhas no fechamento e na etapa de utilização da silagem. Com a entrada de O₂, as leveduras iniciam a assimilação de ácido láctico, outros produtos da fermentação e carboidratos solúveis residuais, com isso há aumento da temperatura e pH (PAHLOW et al., 2003), com conseqüente consumo das substâncias inibidoras do crescimento desses microrganismos. As bactérias aeróbias também consomem o O₂, retomando a anaerobiose de parte do ambiente. Esse novo ambiente anaeróbio, com reduzidas substâncias inibidoras, favorece o crescimento de microrganismos anaeróbios como *Clostridium* (JONSSON, 1991). O processo de deterioração pode ser agravado em regiões de clima tropical, uma que vez altas temperaturas podem aumentar a taxa de crescimento dos microrganismos deterioradores (ASHBELL et al., 2002). O processo de deterioração aeróbia está associado com altas perdas de nutrientes e matéria seca, diminuição da ingestão (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991; BOLSEN; WHITLOCK; URIARTE-ARCHUNDIA, 2002) e relação com problemas de saúde animal, uma vez que há riscos de contaminações por microrganismos patogênicos e produção de micotoxinas (QUEIROZ; RABAGLINO; ADESOGAN, 2011).

O uso de aditivos classificados com inibidores de deterioração aeróbia tem demonstrado resultados positivos no controle de deterioração em silagens de milho planta inteira. Dentre eles, o *Lactobacillus buchneri* vem sendo um dos mais estudados nos últimos anos (KUNG; STOKES; LIN, 2003).

O *Lactobacillus buchneri* é uma bactéria ácido láctica heterofermentativa obrigatória, capaz de produzir, pela fermentação de glicose e frutose, ácido láctico,

ácido acético, manitol e etanol. A falta da enzima acetaldeído desidrogenase impede a redução do acetaldeído em etanol, aumentando a produção de ácido acético (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Justamente um desses componentes, o ácido acético, proporciona melhorias na estabilidade aeróbia das silagens, por suas características antifúngicas. Isso porque o pH do meio é inferior ao seu pKa o que faz com que ele esteja na forma não dissociada. Nessa forma, ele entra na célula microbiana através da sua membrana via transporte passivo. Uma vez dentro da célula, o ácido é dissociado, em razão do pH interno ser próximo a 7,0 e ocorrer a liberação dos íons H^+ , acidificando o meio intracelular (LAMBERT; STRATFORD, 1999). Para manter a neutralidade da célula, os microrganismos eliminam os íons por transporte ativo, levando a um gasto de energia que prejudica seu crescimento e multiplicação, podendo levá-lo à morte.

Kleinschmit e Kung (2006), resumindo os resultados de 26 experimentos com uso de *L. buchneri* em silagem de milho planta inteira, observaram aumento na concentração de ácido acético, decréscimo no número de leveduras e aumento da estabilidade aeróbia das silagens tratadas. O uso do *L. buchneri* na concentração de 1×10^6 ufc g^{-1} de forragem também promoveu em silagens de milho planta inteira maior concentração de ácido acético e menor contagem de leveduras, o que refletiu em uma maior estabilidade aeróbia (>900 h) em relação aos demais tratamentos (RANJIT; KUNG, 2000). Resultados semelhantes também foram encontrados por Mari et al. (2009) e Tabacco et al. (2011) para silagem de milho planta inteira. O efeito positivo de aumento da estabilidade aeróbia, nas silagens de grão úmido de milho inoculadas com *L. buchneri* foi relatado no trabalho de Taylor e Kung (2002) com aumento de estabilidade de 84 para 208 horas nas silagens controle em relação às silagens inoculadas com a dose mais baixa de *L. buchneri* (1×10^5 ufc por g) e enzimas aos 166 dias de estocagem. O mesmo ocorreu nos trabalhos de Kung Jr. et al. (2007) e Basso et al. (2012) com aumento da estabilidade aeróbia de 50 horas no controle para mais de 200 horas nas silagens inoculadas com *L. buchneri* ($6,6 \times 10^5$ ufc por g) e *L. buchneri* + enzima, no primeiro trabalho; e de 63,8 horas no controle para 87,5 horas para silagens tratadas com *L. buchneri* (5×10^5 ufc por g), no segundo trabalho. Com base nos trabalhos de Taylor e Kung (2002), Kung Jr. et al. (2007) e Basso et al. (2012), em média, o incremento na estabilidade aeróbia com a inoculação de *L.*

buchneri nas silagens de milho grão úmido é de 250% em relação ao controle. Contudo, há escassez de estudos sobre o efeito de inoculantes e doses para a ensilagem de milho reidratado.

Outro ponto a ser levantado é a influência do uso de inoculantes no aumento da degradação do amido. Segundo Junges et al. (2015), a atividade proteolítica das bactérias é responsável por 60,4% da degradação de proteína em silagens de grãos de milho reidratado. Portanto, o efeito dos inoculantes sobre o perfil microbiano das silagens possivelmente pode influenciar a degradação de amido nas silagens de milho reidratado e silagem de milho grão úmido.

2.4 Desempenho de animais confinados consumindo silagem de milho com alta umidade

Diversos experimentos têm demonstrado o potencial da silagem de milho com alta umidade em aumentar a eficiência alimentar de bovinos confinados. Ladely et al. (1995), avaliando o efeito dos métodos de processamento sobre três híbridos de milho (lenta, média e rápida taxa de desaparecimento do amido *in vitro*), observaram aumento da eficiência alimentar de 11,33% nos bovinos em terminação alimentados com silagem de milho com alta umidade (inclusão de 83% da MS) em comparação com o grão seco moído. Aumento na eficiência alimentar de 15,42% foi observado por Costa et al. (2002), avaliando o desempenho de bovinos superprecoces alimentados com diferentes fontes de volumoso (silagem de milho e feno de aveia; relação volumoso/concentrado de 40:60 e 30:70, respectivamente) e grãos de milho ensilados ou secos. Henrique et al. (2007) compararam o efeito de dietas contendo milho úmido ou seco, e Huck et al. (1998), avaliando o efeito dos métodos de processamento do grão de milho observaram um aumento de eficiência alimentar de 9,70% e 3,43%, respectivamente. Resultados semelhantes também foram encontrados por Scott et al. (2003) e Corrigan et al. (2009) em bovinos alimentados com silagem de milho com alta umidade e subprodutos (glúten de milho úmido e grãos destilados), com o aumento na eficiência alimentar de 5,00% e 12,27%, quando comparados com as dietas que continham milho seco e os mesmos subprodutos. Silva et al. (2007) observaram aumento da eficiência alimentar em 17,24% para os animais alimentados com silagem de grão úmido em comparação com o grão seco (relação V:C de 40:60

e inclusão de 48% da MS de silagem de grão úmido na dieta), maior número de *Entodinium*, *Eudiplodinium* e do número total de protozoários, o que pode ser atribuído à maior disponibilidade ruminal de amido nessas dietas.

Ferraretto, Crump e Shaver (2013) realizaram meta análise com a finalidade de estimar os efeitos de diferentes métodos de processamento de grãos sobre o consumo, digestibilidade e produção de leite de vacas leiteiras. Houve tendência de aumento na digestibilidade ruminal e total nos animais alimentados com silagem de milho com alta umidade. Esses resultados podem ser atribuídos a distúrbios na matriz proteica e proteólise durante a ensilagem. A ingestão de matéria seca (IMS) foi reduzida em 1,2 kg/dia e a produção de leite não foi afetada, conseqüentemente, a conversão alimentar (leite/IMS) foi maior, sendo relatada maior energia líquida para lactação (ELL) nas dietas contendo silagem de milho com alta umidade. A redução no tamanho de partícula (>2000 µm para <2000 µm) na silagem de milho grão úmido aumentou a digestibilidade no trato digestivo total de 89,5% para 95,2%. Esse fato pode ser explicado pelo aumento da superfície de contato para a digestão bacteriana e enzimática (HUNTINGTON, 1997) de partículas mais finas e pelo aumento na taxa de passagem de partículas mais grosseiras e mais densas pelo trato gastrointestinal (NOCEK; TAMMINGA, 1991).

Ferraretto, Crump e Shaver (2013) concluíram que a maior quantidade de amido digerido no rúmen reduz o fluxo de amido para o duodeno, otimizando a hidrólise no intestino delgado, refletindo em uma maior digestibilidade total do amido. Considerando-se que a digestão pós-ruminal é correlacionada positivamente com a digestão total do amido, e que o aumento da digestão ruminal pode aumentar a digestão pós-ruminal, isso explica a relação positiva entre digestibilidade ruminal e total do amido (aumento de 3,4% de digestão total por unidade percentual de aumento de digestibilidade ruminal). O fluxo duodenal de amido é inversamente correlacionado com a digestão no trato digestivo total (redução de 1,3% da digestão total por unidade percentual de aumento no fluxo de amido no duodeno), portanto o aumento do fluxo de amido para o duodeno reduz a digestão pós-ruminal do amido e, conseqüentemente, reduz a digestão total do amido. A redução na digestão pós-ruminal do amido em função do aumento do fluxo de amido no duodeno está relacionada à alta taxa de passagem através dos intestinos, que leva a um tempo

insuficiente para completar a hidrólise do amido (Owens et al., 1986) ou a insuficiente atividade da amilase pancreática (Huntington, 1997).

Ao avaliar o desempenho de vacas leiteiras consumindo milho moído, silagem de milho reidratado e ensilado ou milho extrusado, Bitencourt (2012) observou tendência de aumento na conversão do alimento ingerido em leite e na digestibilidade da matéria orgânica, além de queda no teor de N-ureico no leite com milho reidratado e ensilado comparado com o milho seco. Apesar de ter sido observado um índice numérico de maior produção de proteína microbiana, dada a maior excreção de alantoína para a silagem de milho reidratado, isso não teve reflexo em produção de proteína no leite. O que pode ser um indício de que a tendência de maior produção de proteína no leite com milho extrusado não foi devida a produção de proteína microbiana e sim, ao aumento da disponibilidade de aminoácidos metabolizáveis para a glândula mamária, devido ao maior fluxo de propionato para o fígado, o que pode poupar aminoácidos gliconeogênicos. Esse fato demonstra que outras rotas além do aumento da produção de proteína microbiana podem explicar os resultados do processamento do milho.

Referências

ANDRADE FILHO, R.; REIS, R. B.; PEREIRA, M. N.; ANTENOR, M. Degradabilidade ruminal in situ de grãos de milho maduros do tipo flint ou dentado, secos ou reconstituídos e ensilados. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 47., 2010, Salvador. Resumos... Salvador: UFBA, SBZ, 2010a. 1 CD.

ANDRADE FILHO, R.; REIS, R. B.; PEREIRA, M. N.; SOUZA, R. C. Reconstituição, inoculação e ensilagem de grãos de milho maduros. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 47., 2010, Salvador. Resumos... Salvador: UFBA, SBZ, 2010b. 1 CD.

ASHBELL, G.; WEINBERG, Z. G.; HEN, Y; FILYA, I. The effects of temperature on the aerobic stability of wheat and corn silages. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Hampshire, v. 28, n. 5, p. 261-263, may. 2002.

BASSO, F. C.; BERNARDES, T. F.; ROTH, A. P. T. P.; RABELO, C. H. S.; RUGGIERI, A. C.; REIS, R. A. Fermentation and aerobic stability of high-moisture corn silages

inoculated with different levels of *Lactobacillus buchneri*. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 41, p. 2369-2373, 2012.

BITENCOURT, Luciene Lignani. Substituição de milho moído por milho reconstituído e ensilado ou melaço de soja em vacas leiteiras. 2012. 130 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

BOLSEN, K. K.; WHITLOCK, L. A.; URIARTE-ARCHUNDIA, M. E. Effect of surface spoilage on the nutritive value of maize silage diets. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 13., 2002, Auchincruive. Proceedings... Auchincruive, Scotland: [Cornell University], 2002. p. 76-77.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Am. Soc. Plant Physiol., Rockville, MD. 2000.

CARVALHO, P. A. Influência do genótipo e maturidade na diversidade microbiológica em milho grão para silagem. Dissertação de mestrado. Esalq/Usp, Piracicaba, 2014.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, V. 3- SAFRA 2015/16- N. 11. Acesso em 22 de abril de 2013. Disponível em: <
http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&&Pagina_objcmsconteudos=1#A_objcmsconteudos.

CORREA, C. E. S.; SHAVER, R. D.; PEREIRA, M. N.; LAUER, J. G.; KOHN, K. Relationship Between Corn Vitreousness and Ruminant In Situ Starch Degradability. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 85, n. 11, p. 3008–3012, nov. 2002.

CORRIGAN, M. E.; ERICKSON, G. E.; KLOPFENSTEIN, T. J.; LUEBBE, M. K.; VANDER POL, K. J.; MEYER, N. F.; BUCKNER, C. D.; VANNESS, S. J.; HANFORD, K. J. Effect of corn processing method and corn wet distillers grains plus solubles inclusion level in finishing steers. Journal of Animal Science, Champaign, v. 87, p. 3351–3362, 2009.

CORONA, L.; OWENS, F. N.; ZINN, R. A. Impact of corn vitreousness and processing on site and extent of digestion by feedlot cattle. Journal of Animal Science, Champaign, v. 84, p. 3020-3031, 2006.

COSTA, C.; ARRIGONI, M B.; SILVEIRA, A. C.; OLIVEIRA, H. N de. Desempenho de bovinos superprecoces alimentados com silagem de milho ou feno de aveia e grãos de milho ensilados ou secos. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 24, n. 4, p. 1175-1183, 2002.

FERNANDES, J.; DANIEL, J. L. P.; JUNGES, D.; CARVALHO, P. A.; BACH, B. C.; PAZIANI, S. F.; NUSSIO, L. G. Prolonged storage offset the negative effect of vitreousness on the degradability of high moisture corn silages. In *Proc. XVIIth Int. Silage Conf.* June 1-3. Piracicaba, SP, Brasil, p. 564 -565, 2015. ISSN 2175-4624

FERRARETTO, L. F.; CRUMP, P. M.; SHAVER, R. D. Effect of cereal grain type and corn grain harvesting and processing methods on intake, digestion, and milk production by dairy cows through a meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 96, n. 1, p. 533–550, jan. 2013.

JUNGES, D.; MORAIS, G.; DANIEL, J. L. P.; SPOTO, M. H. F.; NUSSIO, L. G. Contribution of proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. In *Proc. XVIIth Int. Silage Conf.* June 1-3. Piracicaba, SP, Brasil, p. 566-567, 2015. ISSN 2175-4624.

HENRIQUE, W.; BELTRAME FILHO, J. A.; LEME, P. R.; LANNA, D. P. D.; ALLEONI, G. F.; COUTINHO FILHO, J. L. V.; SAMPAIO, A. A. M. Avaliação da silagem de grãos de milho úmido com diferentes volumosos para tourinhos em terminação. Desempenho e características de carcaça. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, n.1, p.183-190, 2007.

HOFFMAN, P. C.; ESSER, N. M.; SHAVER, R. D.; COBLENTZ, W. K.; SCOTT, M. P.; BODNAR, A. L.; SCHMIDT, R. J.; CHARLEY, R. C. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 94, n. 5, p. 2465–2474, may 2011.

HUNTINGTON, G. B. Starch utilization by ruminants: From basics to the bunk. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 75, p. 852–867, 1997.

JONSSON, A. Growth of *Clostridium tyrobutyricum* during fermentation and aerobic deterioration of grass silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v. 54, n. 4, p. 557-568, 1991.

HUCK, G. L.; KREIKEMEIER, K. K.; KUHL, G. L.; ECK, T. P.; BOLSEN, K. K. Effects of Feeding Combinations of Steam-Flaked Grain Sorghum and Steam-Flaked, High-

Moisture, or Dry-Rolled Corn on Growth Performance and Carcass Characteristics in Feedlot Cattle. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 76, p. 2984–2990, 1998.

KUNG, L. JUNIOR.; STOKES, M. R.; LIN, C. J. Silage additives. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H (Co-ed.). *Silage science and technology*. Madison: ASA, 2003. Cap. 7, p. 305-360. (Agronomy, 42).

KUNG, Jr., L.; MYERS, C. L.; NEYLON, J. M.; TAYLOR, C. C.; LAZARTIC, J.; MILLS, J. A.; WHITER, A. G. The Effects of Buffered Propionic Acid-Based Additives Alone or Combined with Microbial Inoculation on the Fermentation of High Moisture Corn and Whole-Crop Barley. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 87, p. 1310–1316, 2004.

KUNG, JR., L.; SCHMIDT, R. J.; EBLING, T. E; HU, W. The Effect of *Lactobacillus Buchneri* 40788 on the Fermentation and Aerobic Stability of Ground and Whole High-Moisture Corn. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 90, p. 2309–2314, 2007.

KUNG, Jr., L.; WINDLE, M. C.; WALKER, N. The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of high-moisture corn. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 97, p. 1707–1712, 2014.

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

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

LAMBERT, R. J.; STRATFORD, M. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 86, n. 1, p. 157-164, jan. 1999.

LADELY, S. R.; STOCK, R. A.; GOEDEKEN, F. K.; HUFFMAN, R. P. Effect of corn hybrid and grain processing method on rate of starch disappearance and performance of finishing cattle. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 73, p. 360-364, 1995.

LAWTON, J. W. Zein: A history of processing and use. *Cereal Chem.* 79:1–18, 2002.

MARI, L. J.; SCHMIDT, R. J.; NUSSIO, L. G.; HALLADA, C. M.; KUNG JR., L. An evaluation of the effectiveness of *Lactobacillus buchneri* 40788 to alter fermentation and improve the aerobic stability of corn silage in farm silos. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 92, n. 3, p. 1174-1176, may 2009.

McDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. Microorganisms. In: McDONALD, P. *The biochemistry of silage*. 2. ed. Aberystwyth, UK: Chalcombe Publications, 1991. p. 81-152.

MILLEN, D. D.; PACHECO, R. D. L.; ARRIGONI, M. D. B.; GALYEAN, M. L.; VASCONCELOS, J. T. A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 87, p. 3427–3439, 2009.

MORAIS, G.; KLEINSHMITT, C.; SALVO, P. A.; WINCKLER, J. P.; SILVA, J.; PASETTI M. H. O.; DANIEL, J. L. P.; NUSSIO, L. G. Ruminal degradability and aerobic stability of reconstituted corn grain silages treated with sodium benzoate. In *Proc. XVIIth Int. Silage Conf.* June 1-3. Piracicaba, SP, Brasil, p. 552-553, 2015a. ISSN 2175-4624.

MORAIS, G.; SCHONELL, E.; KLEINSHMITT, C.; JUNGES, D.; WINCKLER, J. P.; SALVO, P. A.; DANIEL, J. L. P.; NUSSIO, L. G. Effects of chemical and microbial additives on the fermentation and aerobic stability of rehydrated corn grain silages. In *Proc. XVIIth Int. Silage Conf.* June 1-3. Piracicaba, SP, Brasil, p. 554-555, 2015b. ISSN 2175-4624.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. *Nutrients requirements of beef cattle*. 7.ed. Washington, D.C.: 1996. 244p. NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. *Nutrients requirements of beef cattle*. 7.ed. Washington, D.C.: 1996. 244p.

NOCEK, J. E.; TAMMINGA, S. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effects on milk yield and composition. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 74, p. 3598–3629, 1991.

OWENS, F. N.; SECRIST, D. S.; HILL, W. J.; GILL, D. R. The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle: a review. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 75, p. 868-879, 1997.

OWENS, F. N.; SODERLUND, S. Ruminal e postruminal starch digestion by cattle. Pioneer Hi-Bred, a DuPont Business Conference, Johnston, 2007.

PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK; S. J. W. H.; SPOELSTRA, S.F. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H (Co-ed.). Silage science and technology. Madison: ASA, 2003. Cap. 2, p. 31-93. (Agronomy, 42).

PHILIPPEAU, C.; LANDRY, J.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of the protein distribution of maize endosperm on ruminal starch degradability. J. Sci. Food Agric. 80:404–408, 2000.

PEREIRA, M. L. R. Degradabilidade ruminal *in vitro* de grão reidratado e ensilado de milho e sorgo com diferentes granulometrias. 2012. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

PEREIRA, M. N.; PEREIRA, R. A. N. Processamento de milho por re-hidratação e ensilagem. In: ENCONTRO DE CONFINAMENTO, 8., 2013, Ribeirão Preto. Anais ... Ribeirão Preto: Coan, 2011. p.141-162.

PHILIPPEAU, C.; MONREDON, F. LE DESCHAULT DE; MICHALET-DOREAU, B. Relationship between ruminal starch degradation and the physical characteristics of corn grain. Journal of Animal Science, Champaign, v. 77, p. 238–243, 1999.

QUEIROZ, O. C. M.; RABAGLINO, M. B.; ADESOGAN, A. T. Mycotoxins in silage. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2., 2011, São Pedro. Proceedings... Piracicaba: FEALQ, 2011. p. 105-126.

RANJIT, N. K.; KUNG, L. JR. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 83, n. 3, p. 526-535, mar. 2000.

REZENDE, A. V.; RABELO, C. H. S.; VEIGA, R. M.; ANDRADE, L. P.; HÄRTERB, C. J.; RABELO, F. H. S.; BASSO, F. C.; NOGUEIRAD, D. A.; REIS, R. A. Rehydration of corn grain with acid whey improves the silage quality. Anim. Feed Sci. Technol. v. 197, p. 213–221, 2014.

SANTOS, F. A. P.; CARARETO, R.; MARQUES, R. S. Processamento de grãos para bovinos de corte. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 9., 2011, Piracicaba. Anais ... Piracicaba: FEALQ, 2011. p.403-432.

SANTOS, F. A. P.; SOUSA, J.; BATISTEL, F.; COSTA, D. F. A. In: ENCONTRO DE CONFINAMENTO, 8., 2013, Ribeirão Preto. Anais ... Ribeirão Preto: Coan, 2013. p. 261-291.

SCOTT, T.L.; MILTON, C.T.; ERICKSON, G.E.; KLOPFENSTEIN, T. J.; STOCK, R. A. Corn processing method in finishing diets containing wet corn gluten feed. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 81, p. 3182-3190, 2003.

SEBASTIAN, S; PHILLIP, L. E.; FELLNER, V.; IDZIAK, E. S. Comparative assessment of bacterial inoculation and propionic acid treatment on aerobic stability and microbial populations of ensiled high-moisture ear corn. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 74, p. 447-456, 1996.

SILVA, S. L.; LEME, P. R.; PUTRINO, S. M.; VALINOTE, A. C.; NOGUEIRA FILHO, J. C. M.; LANNA, D. P. D. Milho grão seco ou úmido com sais de cálcio de ácidos graxos para novilhos Nelore em confinamento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, n.5, p.1426-1434, 2007.

TABACCO, E.; PIANO, S.; REVELLO-CHION, A.; BORREANI, G. Effect of *Lactobacillus buchneri* LN4637 and *Lactobacillus buchneri* LN40177 on the aerobic stability, fermentation products, and microbial populations of corn silage under farm conditions. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 94, n. 11, p. 5589-5598, nov. 2011.

TAYLOR, C. C.; KUNG, L. JR. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation and aerobic stability of high moisture corn in laboratory silos. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 85, n. 6, p. 1526–1532, jun. 2002.

THEURER, C. B.; HUBER, J. T.; DELGADO-ELORDUY, A.; WANDERLEY, R. Invited review: Summary of steam-flaking corn or sorghum grain for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 82, n. 9, p. 1950–1959, set. 1999.

TONROY, B. R.; PERRY, T. W.; BEESON, W. M. Dry, ensiled high-moisture, ensiled reconstituted high-moisture and volatile fatty acid treated high moisture corn for growing-finishing beef cattle. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 39, n. 5, p. 931-936, may. 1974.

TONROY, B. R.; PERRY, T. W. Effect of corn preservation treatments on in vitro digestibility, ruminal pH and volatile fatty acid formation. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 38, n. 3, p. 676-680, 1974.

USDA - United States Department of Agriculture. Livestock and Poultry: World Markets and Trade. October 2012. Acesso em 25 de março de 2013. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>.

VASCONCELOS, J. T., GALYEAN, M. L. Nutritional recommendations of feedlot consulting nutritionists: The 2007 Texas Tech University survey. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 85, p. 2772–2781, 2007.

VIERSTRA, R. D. Proteolysis in plants: Mechanisms and functions. *Plant Mol. Biol.*, v. 32, p. 275–302, 1996.

WOOLFORD, M. K. *The silage fermentation*. 4. ed. New York: Marcel Dekker, 1984. p. 350.

ZINN, R. A.; OWENS, F. N.; WARE, R. A. Flaking corn: Processing mechanics, quality standards, and impacts on energy availability and performance of feedlot cattle *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 80, p. 1145–1156, 2002.

CAPÍTULO 2

O artigo a seguir está redigido conforme normas de publicação do *Animal Feed Science and Technology*, exceto o posicionamento das Tabelas e Figuras.

CAPÍTULO 2 - Perfil fermentativo, características microbiológicas e estabilidade aeróbia de silagens de milho reidratado com diferentes doses de *Lactobacillus buchneri* ou *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici*

Resumo

Nosso objetivo com este trabalho foi determinar qual inoculante e dose de microrganismo deve ser utilizado na ensilagem de grãos de milho reidratados. Para isso avaliou-se o uso de doses de inoculantes *L. buchneri* (LB) ou *L. plantarum* e *P. acidilactici* (LPPA) sobre o perfil fermentativo, características microbiológicas e estabilidade aeróbia de silagens de milho reidratado, bem como sua ação na matriz proteica dos grãos e na degradabilidade do amido. O milho foi finamente moído e reidratado para ficar com matéria seca (MS) de 650 g/kg. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com sete tratamentos e seis repetições, sendo: 1) controle (C); 2) LPPA na dose de 1×10^5 ufc/g de milho reidratado; 3) LPPA na dose de 5×10^5 ufc/g; 4) LPPA na dose de 1×10^6 ufc/g; 5) LB na dose de 1×10^5 ufc/g; 6) LB na dose de 5×10^5 ufc/g; e 7) LB na dose de 1×10^6 ufc/g. A recuperação de MS foi menor ($P < 0,01$) e as perdas por gases foram maiores ($P < 0,01$) nas silagens inoculadas com LB em relação às silagens C. Já as silagens com LPPA não apresentaram diferença ($P = 0,05$) em comparação as C. O uso de LB, em comparação com o C reduziu ($P < 0,01$) as concentrações de ácido lático e etanol e aumentou o pH ($P < 0,01$) e as concentrações de ácido acético, ácido propiônico e 1,2-propanodiol. No momento da abertura, as silagens com LB apresentaram maior contagem de bactérias ácido lácticas (BAL) e menor contagem de leveduras ($P < 0,01$) em relação às silagens C. A estabilidade aeróbia foi maior ($P < 0,01$) nas silagens com LB e menor ($P = 0,01$) nas silagens com LPPA em relação ao tratamento C, não havendo diferença ($P > 0,05$) no uso de doses crescentes de ambos os inoculantes. O uso de LB reduziu ($P < 0,01$) as perdas de MS

durante o período de exposição ao ar em relação ao C, não havendo diferença ($P > 0,05$) entre as doses, enquanto o uso de LPPA aumentou ($P = 0,02$) as perdas de MS em relação ao C, havendo um comportamento linear ($P < 0,01$) com o uso de doses crescentes de LPPA. Os teores de prolamina foram menores ($P = 0,02$) nas silagens inoculadas com LB em relação ao C, o que refletiu em maior ($P < 0,01$) degradabilidade da MS em 12 horas. Não houve diferenças ($P > 0,05$) dos teores de prolamina e degradabilidade (12 horas) nas silagens inoculadas com LPPA em relação ao C. Recomenda-se o uso de LB na dose 1×10^5 ufc/g de milho reidratado, por mudar o perfil de ácidos das silagens de grãos de milho reidratado, produzir maior quantidade de ácido acético, reduzir a contagem de leveduras e fungos filamentosos, o que aumenta a estabilidade aeróbia e a degradabilidade da MS em 12 horas das silagens de milho reidratado.

Palavras-chave: compostos voláteis, degradabilidade do amido, prolamina

1. Introdução

Estudos com foco na melhoria da digestibilidade do amido do milho têm sido frequentes, explorando principalmente os diferentes tipos de processamento dos grãos (Ferraretto et al, 2013). Técnicas como ensilagem dos grãos de milho seco, reidratados após processo de moagem, têm sido utilizadas de forma promissora por combinar dois processamentos, a moagem e a ensilagem. Essa técnica consiste na ensilagem dos grãos de milho secos e moídos após passar por um processo de reidratação para retomar a umidade necessária para o crescimento de microrganismos (Resende et al., 2014). Isso representa uma vantagem diante da impossibilidade de plantar áreas para produção de grão úmido de milho ou

de baixa disponibilidade de terras, permitindo a aquisição do milho fora da propriedade. Contudo, os grãos maduros utilizados na ensilagem de milho reidratado apresentam variável concentração de carboidratos solúveis, em comparação com silagens de milho planta inteira, baixa contagem de *Lactobacillus* e elevada contagem de microrganismos indesejáveis, como esporos de *Clostridium* (Carvalho et al., 2015). Isso pode constituir fator limitante no processo fermentativo e potencializar problemas de deterioração, sendo recomendado o uso de aditivos.

Aditivos microbianos à base de bactérias heterofermentativas facultativas (comumente chamadas de homofermentativas), como *Lactobacillus plantarum*, vários *Pediococcus* e *Enterococcus faecium*, constituem um grupo capaz de reduzir rapidamente o pH das silagens. Já as bactérias ácido lácticas heterofermentativas obrigatórias agem como inibidores da deterioração aeróbia (Kung et al., 2003), um dos principais problemas das silagens de grãos de milho (Taylor e Kung, 2002; Resende et al., 2014). Dentro desse grupo, o *L. buchneri* apresenta destaque devido à alta capacidade antifúngica de um dos produtos da sua fermentação, o ácido acético (Kleinschmit e Kung, 2006; Basso et al., 2012; Tabacco et al., 2011). O efeito dos inoculantes sobre o perfil microbiano das silagens de milho reidratado, possivelmente, pode influenciar a degradação do amido. Uma vez que a atividade proteolítica de bactérias é responsável por 60,4% da degradação de proteína em silagens de grãos de milho reidratado (Junges et al., 2015), e que a proteólise da matriz proteica hidrofóbica que recobre os grânulos de amido pode aumentar a digestibilidade do amido (Hoffman et al., 2011). Contudo, são escassos na literatura estudos sobre o efeito desses inoculantes, bem como a recomendação das melhores doses para a ensilagem de milho reidratado. Em busca de uma melhor eficiência de uso desses inoculantes é fundamental estabelecer a melhor dose.

Tem-se como hipótese que o uso de inoculantes homoláticos melhoraria o perfil fermentativo pelo rápido decréscimo do pH, e que os inoculantes heteroláticos aumentariam a

estabilidade aeróbica das silagens, em função do aumento do ácido acético. O objetivo deste trabalho foi determinar qual inoculante e dose de microrganismo devem ser utilizados na ensilagem de grãos reidratados. Para isso, avaliou-se o uso de doses de inoculantes *L. buchneri* ou *L. plantarum* e *P. acidilactici* sobre o perfil fermentativo, características microbiológicas e estabilidade aeróbia de silagens de milho reidratado, bem como sua ação na matriz proteica dos grãos e na degradabilidade do amido.

2. Material e Métodos

2.1 Processo de ensilagem

O milho foi finamente moído em moinho de martelo (TN 9), utilizando-se peneira com crivo de 2 mm. Após essa etapa, foi colocado em vagão de mistura total com balança acoplada (Siltomac, modelo S-2.3, São Carlos, SP, Brasil), onde recebeu água de poço artesiano à temperatura ambiente, com o objetivo de atingir teor de umidade de 35%, com mistura constante para garantir uniformização do material. O milho reidratado (Tabela 1) foi então depositado em sete pilhas e utilizados para a confecção dos seguintes tratamentos: 1) controle (C); 2) *Lactobacillus plantarum* (MA18/5U) e *Pediococcus acidilactici* (MA18/5M) (LPPA; Bacto Silo Master Tropical, Lallemand, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil) na dose de 1×10^5 ufc de bactérias por grama de milho reidratado; 3) LPPA na dose de 5×10^5 ufc/g; 4) LPPA na dose de 1×10^6 ufc/g; 5) *Lactobacillus buchneri* (LB; NCIMB 40788, Lallemand, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil) na dose de 1×10^5 ufc de bactérias por grama de milho reidratado; 6) LB na dose de 5×10^5 ufc/g; e 7) LB na dose de 1×10^6 ufc/g, sendo utilizadas seis repetições por tratamento. Em ambos os tratamentos os inoculantes foram diluídos em água sem cloro, sendo aplicados 2 L por tonelada de material ensilado por meio de pulverizador manual, sendo

utilizado um pulverizador por tratamento. O controle também recebeu a mesma quantidade de água dos tratamentos com aditivos.

Como silos experimentais, foram utilizados baldes plásticos com capacidade de 15 L. A compactação foi realizada manualmente, tendo como densidade média 1085 ± 75 kg por m^3 de matéria natural. Após a compactação, cada silo foi vedado com tampa plástica apropriada.

2.2 Perdas fermentativas

Os mini silos foram pesados imediatamente depois do fechamento e antes da abertura para a determinação das perdas por gases (PG), segundo as equações abaixo descritas. Na abertura, foram usados os teores de MS corrigidos considerando-se as concentrações dos compostos voláteis (Weissbach, 2009).

$$\text{Perdas por gases (\% de MS)} = (\text{PSI} - \text{PSF}) / \text{MSI} \times 100 \quad (1)$$

Onde: PSI = peso do silo no momento da ensilagem (kg), PSF = peso do silo no momento da abertura (kg); e MSI = matéria seca ensilada (quantidade de forragem em kg \times % MS da forragem).

Tabela 1. Composição química (g/kg de MS) do material ensilado de milho reidratado

Item	MU
MS	642,3
PB	82,6
CSA ¹	21,7
Prolamina	46,0

¹CSA = carboidratos solúveis em água.

2.3 Período de estabilidade aeróbia

Os silos foram abertos após 124 dias de estocagem, homogeneizados e subamostrados. Cada subamostra foi submetida à determinação das alterações das características do grão, perfil fermentativo, contagem microbiana e estabilidade aeróbica.

Aproximadamente três kg de silagem foram colocados em baldes plásticos e foram cobertos com folha de papel alumínio, para evitar perda de umidade da silagem e contaminação por elementos externos (Tabacco et al., 2009), para o monitoramento da estabilidade aeróbia. Os baldes foram mantidos em sala fechada em temperatura ambiente. A temperatura das silagens e do ambiente foram registradas a cada meia hora por meio de *data loggers* (Pro2.07.09, Escort Console, Buchanan, VA, Estados Unidos da América). A estabilidade aeróbia foi definida como o número de horas que a silagem permaneceu estável antes de atingir 5°C acima da temperatura ambiente, estratégia adotada por que o ensaio foi realizado em temperatura ambiente não controlada. Foram calculados o pico de temperatura, as horas para atingir o pico de temperatura e a soma das medias das diferenças de temperatura por dia do balde com o ambiente aos 4, 8 e 12 dias de aerobiose (ADITE4, ADITE8 e ADITE12). Mais três kg de silagem foram depositados em baldes plásticos para determinação do perfil do pH ao longo da exposição aeróbia, os quais também foram cobertos com folha de alumínio e amostrados nos dias 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 de aerobiose.

2.4 Análises químicas e microbiológicas

O material pré-ensilado e as silagens, ambos em duplicata, foram levados à estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas para estimação da MS (nº do método 934.01, AOAC, 1995) sendo moídos em moinho com peneira de crivo de 1 mm para posterior estimação da proteína bruta (PB) conforme a AOAC (nº do método 978.04; 1995), carboidratos solúveis em água (Hall, 2000) e prolamina (Nellis et al., 2013). A determinação do pH, nitrogênio amoniacal (N-NH₃), ácido láctico (Pryce, 1969) e compostos voláteis foram obtidos por meio de extrato aquoso (1:10) com água destilada. O pH foi medido com potenciômetro (DM-22, Digimed, São Paulo, SP, Brasil) e o nitrogênio amoniacal (N-NH₃) segundo técnica descrita por Noel e

Hambleton (1976). Os teores de álcoois, ésteres, ácidos graxos voláteis e acetona foram estimados em cromatógrafo gasoso com detector de massas (GCMS) (GCMS QP 2010 plus, Shimadzu®, Kyoto, Japan), usando coluna capilar (Stabilwax, Restek®, Bellefonte, USA; 60 m, 0,25 mm \varnothing , 0,25 μ m crossbond carbowax polyethylene glycol) e parâmetros analíticos conforme as recomendações do fabricante.

Outra amostra de silagem foi utilizada para a contagem de leveduras, fungos filamentosos e bactérias ácido lácticas (BAL), utilizando-se extrato aquoso (1:10) com água peptonada (1 g por litro de água), homogeneizado durante 4 minutos no Stomacher® (400 Circulator, West Sussex, UK). Para a contagem de leveduras e fungos filamentosos foi utilizada a técnica de plaqueamento em superfície, com o meio de cultura YGC Agar (Fluka), sendo preparadas diluições em série e em duplicata (Tabacco et al., 2009). Após incubação a 28 °C, durante três e cinco dias para leveduras e fungos filamentosos, respectivamente, foram contadas as colônias separadamente, com base nas suas características macromorfológicas. Na contagem de BAL foi usada a mesma técnica descrita para leveduras e fungos filamentosos, entretanto o meio de cultura utilizado foi o MRS Agar (Himedia), e a incubação foi realizada a 35°C por três dias para contagem das colônias de BAL. Durante o ensaio de estabilidade aeróbia foram coletadas amostras dos baldes nos dias 4, 8 e 12, sendo destinadas à leitura de pH e à contagem de leveduras e fungos filamentosos.

2.5 Degradabilidade in situ

O material pré-ensilado e as silagens, ambos em duplicata, foram levados à estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas para estimação da MS (AOAC, 1995). Para a análise de degradabilidade *in situ* foram utilizados 5 g de silagem seca, porém com tamanho de partícula original, incubada em sacos para degradabilidade (modelo R1020, Ankon, 50 \pm 15 micras),

conforme descrito por Nocek (1988). Foram utilizados seis bovinos Nelore canulados no rúmen, recebendo dieta com alta inclusão de milho seco e moído (62,6 % da MS da dieta), com relação volumoso:concentrado de 12,5:87,5. Foram utilizados dois tempos de incubação, 12 e 24 horas, simulando situação de alta (0,08/h) e baixa (0,04/h) taxa de passagem. Em cada animal foi incubado uma das repetições de cada tratamento (foram utilizados 4 sacos para cada repetição), portanto em cada animal foram incubados todos os tratamentos, sendo colocados primeiro os sacos de 24 horas e, após 12 horas, os sacos de 12 horas, todos ficaram retirados ao mesmo tempo e lavados e secados por 72 horas em estufa de circulação forçada a 55°C para posterior pesagem.

2.6 Análise estatística

As variáveis foram analisadas como delineamento inteiramente casualizado com 6 repetições com o seguinte modelo: $Y_i = \mu + T_i + e_i$, onde Y_i = variável resposta; μ = média geral; T_i = efeito de tratamento ($i = C, LPPA 1 \times 10^5, LPPA 5 \times 10^5, LPPA 1 \times 10^6, LB 1 \times 10^5, LB 5 \times 10^5, LB 1 \times 10^6$); e_i = erro experimental. As variáveis foram analisadas pelo PROC MIXED de SAS (9.2). Os resultados significativos foram avaliados por contrastes ortogonais (C1: C vs LPPA; C2: C vs LB; C3: linear nas doses de LPPA; C4: quadrático nas doses de LPPA; C5: linear nas doses de LB; C6: quadrático nas doses de LB). Foi adotado o nível de significância de 5%.

As variáveis pH, contagem de leveduras e de fungos filamentosos ao longo de 12 dias de exposição ao ar foram avaliadas como medidas repetidas no tempo com o seguinte modelo: $Y_{ik} = \mu + T_i + D_j + A_{j:i} + T \times D_{ij} + e_{ij}$. Em que efeitos fixos são μ = média geral; T_i = tratamento ($i = C, LPPA 1 \times 10^5, LPPA 5 \times 10^5, LPPA 1 \times 10^6, LB 1 \times 10^5, LB 5 \times 10^5, LB 1 \times 10^6$); D_j = dias de exposição ao ar (pH, $j = 0, 2, 4, 6, 8, 10$ e 12; leveduras e fungos filamentosos, $j = 0, 4, 8$ e 12); $T \times D_{ij}$ = interação entre tratamento e dias de exposição ao ar; e efeitos aleatórios de $A_{j:i}$ (balde

aninhado em tratamento) e e_{ij} = erro experimental. A melhor estrutura de variância para cada variável testada foi escolhida pela menor BIC. As variáveis foram analisadas pelo PROC MIXED de SAS (9.2).

3. Resultados

3.1 Características químicas e perfil fermentativo

Todas as variáveis testadas apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$), com exceção de degradabilidade da MS *in situ* em 24 horas de incubação ($P = 0,29$), metanol ($P = 0,30$), acetona ($P = 0,23$) e álcool iso-propílico ($P = 0,10$), sendo apresentado os resultados dos contrastes para as demais variáveis. Em comparação com o C, as silagens LPPA não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) nos teores de MS, PB, prolamina e N-NH₃ (Tabela 2). Com o uso de doses crescentes de LPPA, os teores prolamina aumentaram linearmente ($P < 0,01$), e os teores de N-NH₃ tiveram comportamento quadrático ($P < 0,01$). Já as silagens inoculadas com LB tiveram menores ($P = 0,02$) teores de prolamina e maiores ($P < 0,01$) de N-NH₃ em relação ao C. Não houve diferença nos teores de MS ($P = 0,10$) e PB ($P = 0,99$) nas silagens inoculadas com LB em comparação com o C. Com o uso de doses crescentes de LB os teores de MS e PB aumentaram de forma linear ($P < 0,05$), os valores de N-NH₃ reduziram de forma linear ($P < 0,01$), e não houve diferenças ($P > 0,05$) nos teores de prolamina.

As silagens LPPA não diferiram nas perdas por gases e tiveram menor contagem de BAL ($P = 0,01$), em relação a silagem C. Doses crescentes de LPPA não influenciaram as perdas por gases e a contagem de BAL (Tabela 2). Em relação ao C, as silagens inoculadas com LB tiveram maiores ($P < 0,01$) perdas por gases e contagem de bactérias ácido lácticas.

As silagens LPPA apresentaram menor ($P < 0,01$) concentração de ácido acético, lactato de etila (resposta quadrática às doses crescentes; $P < 0,01$) e 2-butanol, além de maior ($P < 0,05$) concentração de ácido butírico e ácido valérico (resposta linear às doses crescentes; $P < 0,01$) em comparação com o C, não havendo diferenças ($P > 0,05$) entre LPPA e C para os demais ácidos (Tabela 3). Houve efeito das doses crescentes de LPPA com resposta quadrática ($P = 0,02$) de etanol e acetato de etila, linear crescentes ($P < 0,01$) de 1,2-propaniciol; e linear decrescente ($P < 0,05$) de ácido lático e 2,3-butanodiol. Silagens inoculadas com LB apresentaram diferenças ($P < 0,01$) em todos os ácidos estudados (Tabela 2), com exceção do ácido butírico ($P = 0,08$) e do ácido valérico ($P = 0,70$). Em comparação ao C, as silagens com LB apresentaram menor concentração de ácido lático, etanol, lactato de etila (resposta linear crescente; $P < 0,01$), ácido iso-valérico (resposta linear decrescente; $P = 0,03$), e maior concentração de ácido acético, ácido propiônico (resposta linear decrescente; $P < 0,01$), 1,2-propanodiol, 2,3-butanodiol (resposta linear decrescente; $P = 0,02$), acetato de etila (resposta linear decrescente; $P = 0,03$), ácido fórmico (resposta linear decrescente; $P = 0,02$), ácido iso-butírico, 2-butanol (resposta linear decrescente; $P < 0,01$), acetato de propila (resposta linear decrescente; $P < 0,01$).

Tabela 2. Perfil fermentativo, microbiologia e estabilidade aeróbia de silagens de milho reidratado sem inoculante (Controle, C) e tratamentos com *Lactobacillus buchneri* (LB; NCIMB 40788) nas doses de 1×10^5 , 5×10^5 ou 1×10^6 ufc de bactérias por g de milho reidratado e *Lactobacillus plantarum* (MA18/5U) e *Pediococcus acidilactici* (MA18/5M) (LPPA) nas doses de 1×10^5 , 5×10^5 ou 1×10^6 ufc de bactérias por g de milho reidratado

Itens ^a	C	LPPA			LB			EPM	P-valor ^b	C vs LPPA	C vs LB	LPPA		LB	
		1×10^5	5×10^5	1×10^6	1×10^5	5×10^5	1×10^6					L ^c	Q ^d	L	Q
MS, g/kg de MN	628	632	630	638	629	633	639	0,27	0,03	0,14	0,10	0,08	0,11	0,01	0,94
PB, g/kg de MS	91,1	83,2	85,2	84,7	83,6	92,7	96,8	2,96	0,01	0,08	0,99	0,71	0,70	<0,01	0,37
Prolamina, g/kg de MS	35,5	32,2	36,3	38,5	31,5	31,0	31,6	1,44	<0,01	0,92	0,02	<0,01	0,47	0,96	0,74
N-NH ₃ , g/kg de MS	0,71	0,73	0,59	1,00	1,03	0,98	0,75	0,04	<0,01	0,16	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,20
PG, g/kg de MS	16,5	13,1	15,3	14,4	24,0	23,2	23,4	3,72	<0,01	0,05	<0,01	0,40	0,21	0,68	0,67
Bactérias ácido lácticas, log ufc/g	3,36	2,41	2,84	2,53	6,46	6,35	6,31	0,25	<0,01	0,01	<0,01	0,79	0,23	0,68	0,91
Estabilidade aeróbia, h	71	57	49	51	288	288	288	2,35	<0,01	<0,01	<0,01	0,33	0,23	0,76	0,31
Horas para o pico de temperatura, h	161	174	153	158	138	139	138	3,81	<0,01	0,83	<0,01	0,01	<0,01	0,96	0,81
Pico de temperatura, °C	44,6	46,8	43,5	49,6	28,7	28,4	28,1	0,56	<0,01	0,04	<0,01	<0,01	<0,01	0,23	0,98
Perdas de MS na aerobiose, g/kg de MS	127	132	121	165	18,2	25,1	31,6	9,93	<0,01	0,51	<0,01	0,05	0,12	0,11	0,86
ADIT 4	18,1	22,2	30,8	26,6	-0,99	-1,04	-1,55	2,06	<0,01	0,11	<0,01	0,37	0,06	0,03	0,65
ADIT 8	79,1	86,1	88,0	99,9	-0,75	-2,18	-3,02	3,18	<0,01	0,17	<0,01	0,01	0,40	0,01	0,68
ADIT 12	148	156	150	171	1,24	1,24	-2,47	3,87	<0,01	0,23	<0,01	0,02	0,05	0,01	0,49

^aMS = matéria seca; PB = proteína bruta; N-NH₃ = nitrogênio amoniacal; PG = perdas por gases; ADIT = soma das médias de diferença da temperatura dos silos e da temperatura ambiente nos 4, 8 e 12 dias de exposição ao ar. ^bP-valor = valor de probabilidade de erro para os tratamentos. ^cL = efeito linear. ^dQ = efeito quadrático.

Tabela 3. Componentes voláteis de silagens de milho reidratado sem inoculante (Controle, C) e tratamentos com *Lactobacillus buchneri* (LB; NCIMB 40788) nas doses de 1×10^5 , 5×10^5 ou 1×10^6 ufc de bactérias por g de milho reidratado e *Lactobacillus plantarum* (MA18/5U) e *Pediococcus acidilactici* (MA18/5M) (LPPA) nas doses de 1×10^5 , 5×10^5 ou 1×10^6 ufc de bactérias por g de milho reidratado

Itens	C	LPPA			LB			EPM	P-valor ^a	C vs LPPA	C vs LB	LPPA		LB	
		1×10^5	5×10^5	1×10^6	1×10^5	5×10^5	1×10^6					L ^b	Q ^c	L	Q
g/kg de MS															
Ácido láctico	27,6	28,1	24,3	23,4	12,0	11,4	15,1	1,48	<0,01	0,18	<0,01	0,03	0,35	0,12	0,27
Ácido acético	3,60	2,83	2,66	2,49	15,4	15,2	16,3	0,52	<0,01	<0,01	<0,01	0,33	0,89	0,40	0,66
Etanol	5,25	5,68	6,76	5,08	2,93	3,38	3,72	0,43	<0,01	0,24	<0,01	0,27	0,02	0,19	0,84
mg/kg de MS															
Ácido propiônico	30,5	23,8	26,1	22,4	159,6	78,1	66,4	5,57	<0,01	0,07	<0,01	0,74	0,58	<0,01	0,01
Ácido butírico	5,16	7,79	11,79	7,00	3,41	3,49	3,55	1,15	<0,01	0,03	0,08	0,69	0,17	0,76	0,97
1,2-Propanodiol	174,5	4,5	18,4	14,5	11305	11216	12216	287	<0,01	0,09	<0,01	<0,01	<0,01	0,25	0,58
2,3-Butanodiol	393	398	343	294	2183	2205	1836	63,3	<0,01	0,22	<0,01	0,04	0,73	0,02	0,25
Lactato de etila	172	146	173	153	39,4	45,1	64,1	3,88	<0,01	<0,01	<0,01	0,37	<0,01	<0,01	0,24
Acetato de etila	54,3	49,8	65,7	41,2	148	112	108	8,95	<0,01	0,77	<0,01	0,27	0,02	0,03	0,26
Ácido fórmico	0,91	1,06	0,00	0,01	248	209	192	16,4	<0,01	0,98	<0,01	0,97	0,98	0,02	0,48
Metanol	31,4	37,1	36,1	25,9	32,2	30,0	33,2	3,36	0,30	0,67	0,91	0,02	0,35	0,80	0,52
1-Propanol	0,00	0,00	0,00	0,00	144	135	128	4,63	<0,01	1,00	<0,01	1,00	1,00	0,15	0,82
Acetona	7,75	5,57	6,23	6,30	7,64	7,91	7,15	0,74	0,23	0,05	0,83	0,51	0,72	0,62	0,59
Ácido iso-butírico	1,87	3,12	2,22	3,10	20,3	20,3	20,4	0,77	<0,01	0,07	<0,01	0,93	0,08	0,93	0,98
Ácido iso-valérico	5,26	5,00	4,85	4,98	2,66	2,40	1,78	0,29	<0,01	0,35	<0,01	0,98	0,70	0,03	0,72
2-Butanol	6,30	0,34	0,97	0,40	19,76	8,98	5,60	1,10	<0,01	<0,01	<0,01	0,94	0,28	<0,01	0,07
Acetato de propila	0,40	0,47	0,59	0,31	12,09	8,43	7,41	0,49	<0,01	0,75	<0,01	0,40	0,47	<0,01	0,16
Ácido valérico	0,94	2,25	1,48	1,17	1,03	0,77	0,86	0,16	<0,01	<0,01	0,70	<0,01	0,38	0,36	0,12
Álcool iso-propílico	0,71	0,41	0,61	0,59	0,91	0,79	0,80	0,12	0,10	0,21	0,39	0,32	0,42	0,52	0,64

^aP-valor = valor de probabilidade de erro para os tratamentos. ^bL = efeito linear. ^cQ =efeito quadrático.

3.2 Estabilidade aeróbia

O uso do inoculante LB aumentou ($P < 0,01$) a estabilidade das silagens de milho reidratado em 406% em relação ao C, enquanto o uso de LPPA reduziu ($P < 0,01$) a estabilidade aeróbia em 26% em relação ao C (Tabela 2). As silagens LB levaram menos horas para atingir o pico de temperatura que as silagens C ($P < 0,01$; Tabela 2), porém o pico de temperatura foi menor ($P < 0,01$) nas silagens inoculadas com LB. Embora não haja diferença entre LPPA e C na variável horas para atingir o pico de temperatura, o uso de doses crescentes de LPPA reduz linearmente ($P = 0,01$) o tempo para atingir o pico de temperatura. Doses crescentes LPPA aumentaram ($P = 0,04$) o pico de temperatura das silagens de milho reidratado de forma linear crescente, sendo em média maior ($P < 0,01$) que o pico de temperatura atingido pelas silagens não tratadas (C).

As perdas de MS das silagens expostas a um ambiente aeróbio por 12 dias são menores nas silagens inoculadas com LB ($P < 0,01$) e maiores nas silagens inoculadas com LPPA ($P = 0,02$) em relação ao C. A perdas de MS aumentaram linearmente ($P < 0,01$) com o uso de doses crescentes de LPPA.

Silagens inoculadas com LB apresentaram menores ADIT aos 4, 8 e 12 dias de exposição ao ar em relação ao C ($P < 0,01$), havendo efeito linear decrescente ($P < 0,05$) com o aumento das doses de LB em todos os ADIT. As silagens de milho reidratado, inoculadas com doses crescentes de LPPA, aumentaram de forma linear os ADIT8 e ADIT12 ($P < 0,05$), embora não tenham sido diferentes do C ($P > 0,05$).

Houve interação ($P > 0,01$) entre os tratamentos e os dias de exposição ao ar (Figura 1). No dia da abertura dos silos (dia 0) e no dia dois de exposição ao ar, as silagens com LB apresentaram valores de pH maiores que as silagens com LPPA e C. A partir do dia quatro, entretanto, os valores de pH das silagens LPPA e C aumentaram, permanecendo acima dos

valores de pH das silagens LB. O valor de pH das silagens inoculadas com LB permaneceram abaixo de 4,50 durante os 12 dias de exposição ao ar.

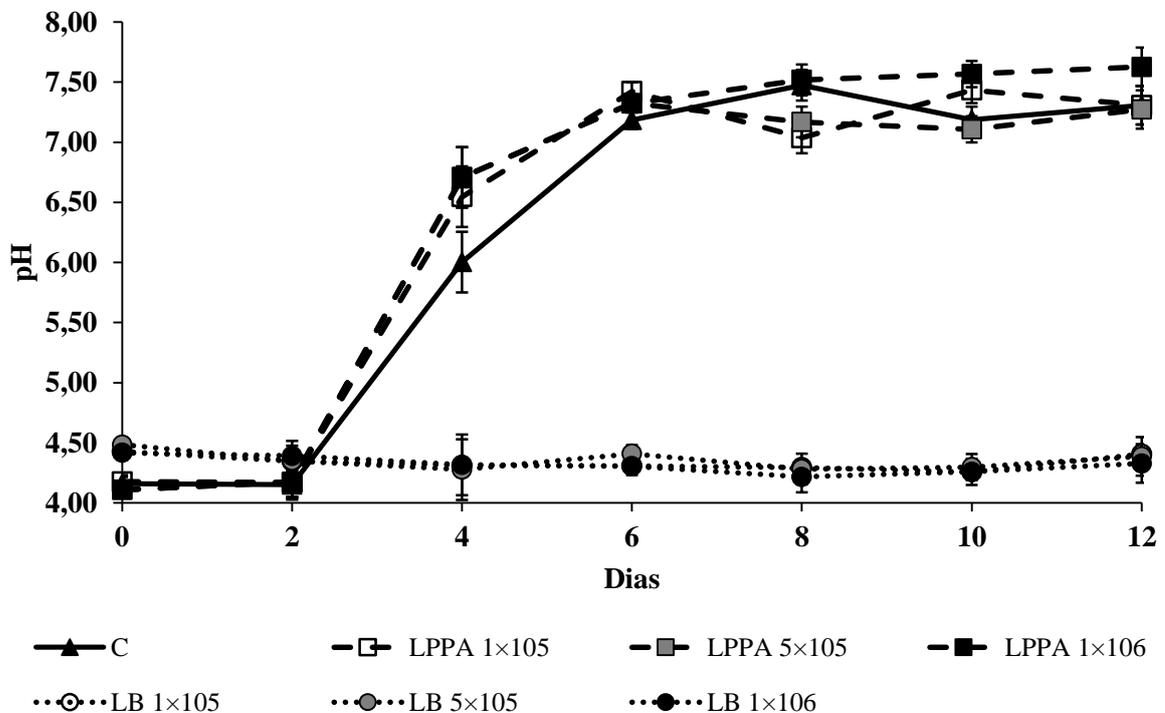


Figura 1. pH de silagens de milho reidratado sem inoculante (Controle, C) e tratamentos com *Lactobacillus buchneri* (LB; NCIMB 40788) nas doses de 1×10^5 , 5×10^5 ou 1×10^6 ufc de bactérias por grama de milho reidratado e *Lactobacillus plantarum* (MA18/5U) e *Pediococcus acidilactici* (MA18/5M) (LPPA) nas doses de 1×10^5 , 5×10^5 ou 1×10^6 ufc de bactérias por grama de milho reidratado; EPM = 0,13. Efeito de tratamento, $P < 0,01$; efeito de dias de exposição ao ar, $P < 0,01$; interação entre efeito de tratamento e dias de exposição ao ar, $P < 0,01$.

Houve interação ($P < 0,01$) entre tratamentos e dias de exposição ao ar nas contagens de leveduras e fungos filamentosos (Figura 2). O uso de LB reduziu a contagem de leveduras em todos os dias de exposição ao ar em relação a C e aos LPPA. As leveduras permaneceram durante todo esse período abaixo do nível de detecção ($< 2,00$ log de ufc/g silagem), com exceção do dia quatro. No dia da abertura das silagens a contagem de fungos filamentosos estavam abaixo do nível de detecção para todos os tratamentos. Silagens com LB permaneceram com contagem abaixo do nível de detecção durante os 12 dias de exposição ao ar. A partir do

dia quatro, para silagens com LPPA, e do dia oito, na silagem C, houve maior contagem de fungos filamentosos em comparação com LB.

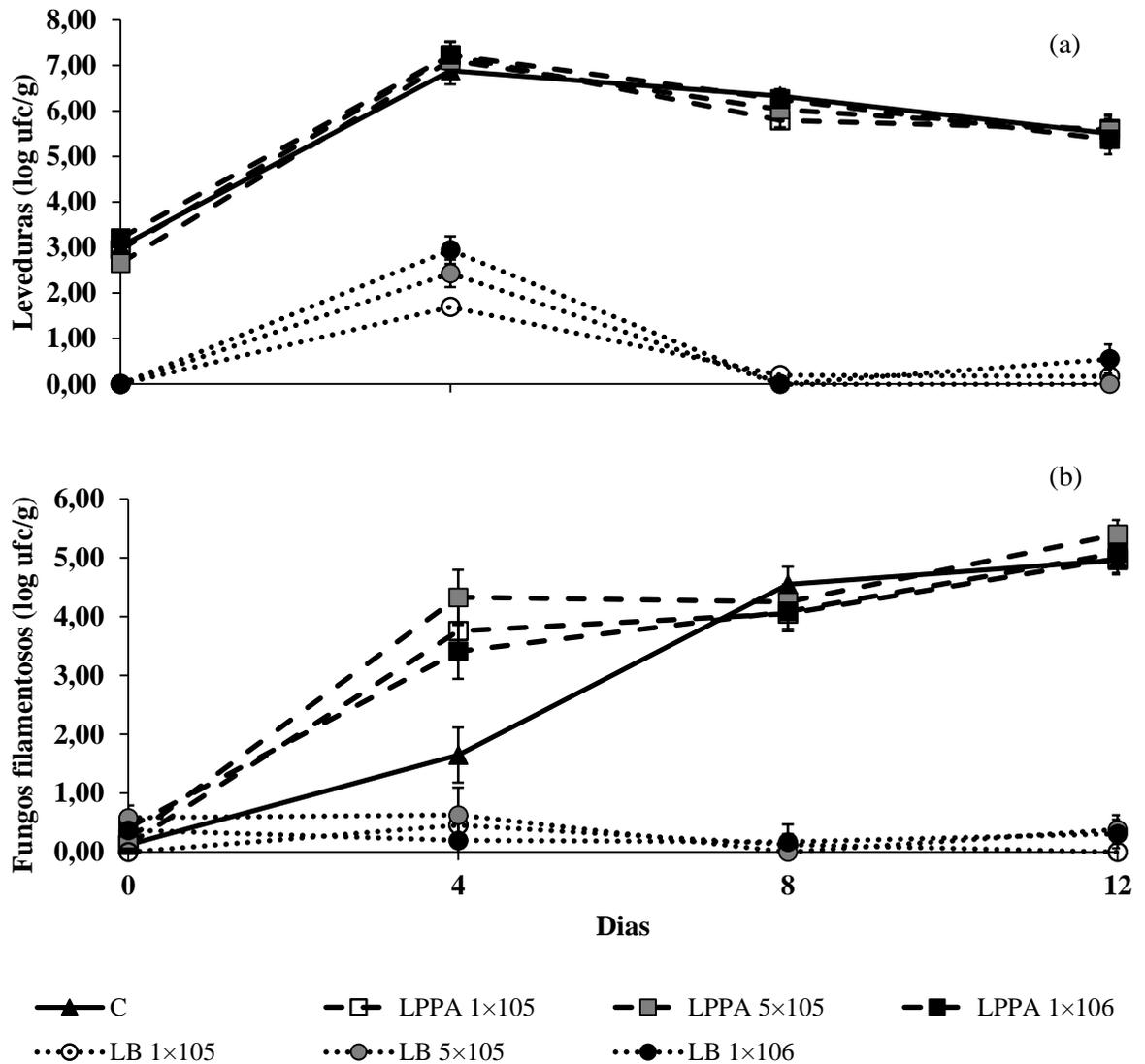


Figura 2. Contagem de leveduras (a) e fungos filamentosos (b) de milho reidratado sem inoculante (Controle, C) e tratamentos com *Lactobacillus buchneri* (LB; NCIMB 40788) nas doses de 1×10^5 , 5×10^5 ou 1×10^6 ufc de bactérias por grama de milho reidratado e *Lactobacillus plantarum* (MA18/5U) e *Pediococcus acidilactici* (MA18/5M) (LPPA) nas doses de 1×10^5 , 5×10^5 ou 1×10^6 ufc de bactérias por grama de milho reidratado; (a) EPM = 0,23 (b) EPM = 0,31. (a; b) Efeito de tratamento, $P < 0,01$; efeito de dias de exposição ao ar, $P < 0,01$; interação entre efeito de tratamento e dias de exposição ao ar, $P < 0,01$.

3.3 Degradabilidade *in situ*

O uso de inoculantes influenciou ($P < 0,01$) a degradabilidade *in situ* da MS (Tabela 3) das silagens de milho reidratado com 12 horas de incubação, entretanto não influenciou ($P = 0,29$) com 24 horas de incubação. A degradabilidade *in situ* da MS com 12 horas de incubação foi maior ($P < 0,01$) nas silagens inoculadas com LB em comparação com as silagens C. Não houve diferença na degradabilidade com 12 horas de incubação em silagens com LPPA em relação ao C ($P = 0,06$), e entre as doses crescentes de ambos os inoculantes ($P > 0,05$).

Tabela 3. Digestibilidade *in situ* da MS com 12 e 24 horas de incubação de silagens de milho reidratado sem inoculante (Controle, C) e tratamentos com *Lactobacillus buchneri* (LB; NCIMB 40788) nas doses de 1×10^5 , 5×10^5 ou 1×10^6 ufc de bactérias por g de milho reidratado e *Lactobacillus plantarum* (MA18/5U) e *Pediococcus acidilactici* (MA18/5M) (LPPA) nas doses de 1×10^5 , 5×10^5 ou 1×10^6 ufc de bactérias por g de milho reidratado

Itens	C	LPPA			LB			EPM	P-valor	C vs LPPA	C vs LB	LPPA		LB	
		1×10 ⁵	5×10 ⁵	1×10 ⁶	1×10 ⁵	5×10 ⁵	1×10 ⁶					L1	Q2	L	Q
Degradabilidade 12 h (g/kg de MS)	790	821	814	817	836	843	864	11,3	<0,01	0,06	<0,01	0,79	0,70	0,07	0,71
Degradabilidade 24 h (g/kg de MS)	845	876	862	863	878	889	882	13,2	0,29	0,16	0,02	0,50	0,63	0,89	0,57

^aP-valor = valor de probabilidade de erro para os tratamentos. ^bL = efeito linear. ^cQ =efeito quadrático.

4. Discussão

Uma grande preocupação com relação à silagem de milho reidratado é a capacidade fermentativa do material. No grão de milho há o acúmulo de amido, carboidratos de reserva da planta, restando pouca quantidade de carboidratos solúveis em água, que é o principal substrato para o crescimento das BAL na silagem. Neste experimento não foram observados problemas no processo fermentativo nas silagens de milho reidratado, uma vez que as silagens C apresentaram valores de pH de 4,16, estando dentro do ideal (3,8 a 4,2; McDonald et al., 1991). Houve considerável produção de ácido láctico, acético, propiônico, butírico e etanol nas silagens C (total de 36,49 g por kg), sendo semelhante aos encontrados na literatura para silagens de milho com alta umidade (Sebastian et al., 1996, Taylor e Kung, 2002, Kung et al., 2007) e silagem de milho reidratado (Rezende et al., 2014). As perdas de MS nas silagens de milho reidratado no tratamento C durante o processo de ensilagem foram baixas (15,4 g por kg de MS), porém, durante o período de exposição ao ar, essas perdas foram elevadas (127 g por kg de MS), devido à sua baixa estabilidade aeróbia de 71 horas. As silagens C apresentaram altos picos de temperatura e elevação do pH durante o período de exposição ao ar, sugerindo assim, que silagens de milho reidratado apresentam problemas de estabilidade aeróbia.

A inoculação com LB mudou o perfil fermentativo em relação ao C, pois apresentaram menores concentrações de ácido láctico e etanol, e maior de ácido acético, ácido propiônico, 1,2-propanodiol e 2,3-butanodiol. As BAL heterofermentativas obrigatórias, grupo ao qual o *L. buchneri* pertence, produzem pela fermentação da glicose e frutose não só ácido láctico, mas também ácido acético, manitol e etanol. Uma particularidade do *L. buchneri* é a ausência da enzima acetaldeído desidrogenase, o que impede a redução do acetaldeído em etanol (McDonald et al., 1991), aumentando a produção de ácido acético e evitando incremento na produção de etanol, o que ocorreu neste experimento. Portanto a redução em 54% de ácido

lático nas silagem com LB, em relação à silagem C, é uma resposta à fermentação dos açúcares pelo *L. buchneri* a outros produtos, o que em parte explica o aumento de 334% na concentração de ácido acético. Uma vez que, segundo Oude Elferink et al. (2001) o aumento da concentração do ácido acético também pode ser explicado pela degradação do ácido lático pelo *L. buchneri* em ambientes anaeróbios que tem como produto final ácido acético e 1,2-propanodiol. Esses autores propõem uma nova rota de degradação do ácido lático pelo *L. buchneri* em anaerobiose, onde 2 mols de ácido lático são degradados a 1 mol de ácido acético mais 1 mol de 1,2-propanodiol. Esse estudo corrobora esses autores, uma vez que houve aumento do 1,2-propanodiol, indo de 0,17 g por kg de MS na silagem C para 11,58 g por kg de MS nas silagens com LB. O aumento de 1,2-propanodiol também foi observado com o uso cepas de *L. buchneri* indígenas em silagem de milho planta inteira (Silva et al., 2014). A degradação do ácido lático pelo *L. buchneri* funciona como um mecanismo de autoproteção à redução do pH gerada pelo ácido lático, o que permitiria a sobrevivência dessas bactérias por um tempo prolongado (Oude Elferink et al., 2001). O início desse processo ocorreria portanto após o estágio inicial de fermentação, depois que houvesse a redução do pH, o que explica o aumento de 90% na contagem de BAL nas silagens LB em comparação com a silagem C no momento da abertura. O que também foi observado em outro trabalho do nosso grupo (Silva, dados não publicados – Capítulo 3) com perfil fermentativo de silagens de milho reidratado sem e com *L. buchneri*, onde com o aumento do tempo de estocagem, de 15 para 300 dias, ocorreu uma menor redução na contagem de BAL, de 7,44 para 6,29 log (ufc/g), na silagem com LB e maior, de 7,08 para 2,92 log (ufc/g), na silagem sem LB. Essa menor redução da contagem de BAL na silagem com LB, coincide com o aumento na concentração de 1,2-propanodiol aos 30, 60 e 180 dias (2,8; 6,0 e 11,1 g por kg de MS, respectivamente). As silagens inoculadas com LB apresentaram maior concentração de ácido propiônico (101,4 mg por kg de MS) e 1-propanol (135,5 mg por

kg de MS) em relação à silagem C (30,5 e 0,0 g por kg de MS, respectivamente). Isso ocorreu, possivelmente, pela fermentação do 1,2-Propanodiol a ácido propiônico e 1-propanol pelo *Lactobacillus diolivorans* (Krooneman et al., 2002). A redução na concentração de etanol nas silagens LB (3,34 g por kg de MS) em comparação ao C (5,25 g por kg de MS) é uma resposta à redução ocorrida na contagem de leveduras que, em ambientes anaeróbios, fermentam açúcares a etanol (Rooke e Hatfield, 2003).

A redução na recuperação de MS de 1,3% e o aumento nas perdas por gases de 42,4% foram observados para as silagens LB em comparação com o C. Nessas silagens, houve predominância de fermentação do tipo heterolática, como pode ser observado pelo perfil dos ácidos da silagem. Esse tipo de fermentação leva ao aumento nas perdas de MS das silagens tratadas com *L. buchneri* em relação às não tratadas, pela produção de CO₂ durante o metabolismo do ácido acético e de outros produtos (Driehuis et al., 1999; Driehuis et al., 2001).

Silagens com LB tiveram maiores valores de pH na abertura dos silos (4,44) em relação ao C (4,16), o que é explicado pelo menor poder de acidificação do ácido acético (Pahlow et al., 2003) e redução do teor de ácido lático. O ácido acético apresenta um pKa menor que o pH do ambiente o que faz com que ele esteja na forma não dissociada, permitindo que ele entre via transporte passivo em células de leveduras e fungos filamentosos. Uma vez dentro da célula ele se dissocia, em razão do pH próximo a 7,0, ocorrendo liberação de H⁺ e acidificação do meio. A via para reverter a acidificação do meio é por transporte ativo com gasto de ATP, o que prejudica o crescimento, a multiplicação e pode levar esses microrganismos à morte (Lambert e Stratford, 1999). Por isso ácido acético e ácido propiônico possuem uma alta ação antifúngica (Kleinschmit et al., 2005; Tabacco et al., 2011). A presença de grandes quantidades de ácido acético (15,6 g por kg de MS) nas silagens com LB levou a redução na contagem de leveduras (< 2,00 log de ufc por g de silagem), o que persistiu durante todo o período de exposição ao ar,

refletindo em maior estabilidade aeróbia (288 horas) em comparação com a silagem C (3,60 g por kg de MS de ácido acético, 3,02 log de ufc por g de silagem de leveduras e 71 horas de estabilidade aeróbia). Outros parâmetros que demonstram indiretamente a maior estabilidade aeróbia das silagens com LB em relação ao C são: menor contagem de fungos filamentosos nos dias 8 e 12, permanência de pH baixo com média de 4,33 nos 12 dias e menor pico de temperatura (LB = 28,4° C vs C = 44,6° C). Esse comportamento é semelhante ao encontrado por Kleinschmit e Kung (2006) e Mari et al. (2009) para silagens de planta inteira de milho e por Kung et al. (2007), Reis et al. (2008) e Basso et al. (2012) para silagens de milho grão úmido. A maior estabilidade aeróbia gerada pelo uso do *L. buchneri* resultou na queda em 80,3% das perdas de MS, nos 12 dias de exposição ao ar, caindo de 127,0 g por kg de MS nas silagens C para 25,0 g por kg de MS nas silagens LB. Há também uma redução nos ADIT 4, 8 e 12 para as silagens com LB.

O processo fermentativo das silagens de milho reidratado de maneira geral não foi alterado com a aplicação de bactérias do tipo homofermentativas. O LPPA não afetou o pH na abertura, as concentrações de ácido láctico, ácido propiônico, 1,2-propanodiol, entre outros compostos voláteis. A redução nas concentrações de ácido láctico (com redução da contagem de BAL) e ácido acético nas silagens de LPPA em comparação com a silagem C, constitui forte indício de que a rota fermentativa homolática foi usada com maior intensidade nas silagens com LPPA, visto que bactérias do tipo homofermentativas fermentam açúcares quase que exclusivamente a ácido láctico (Pahlow et al., 2003). Contudo, a estabilidade das silagens de milho reidratado foram alteradas pela inoculação com LPPA. A estabilidade aeróbia das silagens LPPA foi reduzida, e os picos de temperatura alcançado por essas silagens foram maiores em relação ao C. Em consequência, houve aumento nas perdas de MS durante o período de exposição ao ar. A falta de mecanismos que impeçam o crescimento de microrganismos

espoliadores e a redução do ácido acético nas silagens com LPPA podem ter desencadeado aumento de leveduras e fungos filamentosos nos primeiros dias de exposição ao ar, o que levou à quebra da estabilidade aeróbia. Embora não haja diferença na contagem de microrganismos na abertura, no dia quatro houve uma maior contagem de leveduras e fungos filamentosos para as silagens LPPA. Como os pontos intermediários entre abertura e dia quatro não foram avaliados, não é possível ter a contagem no exato momento da quebra de estabilidade aeróbia para silagens com LPPA e C. Kleinschmit et al. (2005) também observaram redução da estabilidade aeróbia de silagem inoculadas com bactérias homofermentativas.

A matriz proteica que recobre os grãos de amido é formada por uma camada de proteínas denominada prolamina, no milho chamada de zeína. Essa camada hidrofóbica responsável pela redução da digestibilidade do amido dos grãos pode ser quebrada durante o processo de ensilagem por enzimas da planta e dos microrganismos das silagens pelo processo de proteólise e pela solubilização por ácidos gerados no processo fermentativo (Hoffman et al., 2011). A redução da prolamina nas silagens de milho reidratado com LB ocorre em função desses processos, e a quebra dessa matriz proteica culminou no aumento da digestibilidade *in situ* da MS com 12 horas de incubação e da quantidade de N-NH₃ dessas silagens. Já as silagens com LPPA não apresentaram diferença na concentração de prolamina, N-NH₃ e na digestibilidade *in situ* da MS com 12 horas de incubação em relação à silagem C. Novos trabalhos têm mostrado que a atividade proteolítica de bactérias é o maior mecanismo de degradação de proteína nas silagens de milho reidratado (Junges et al., 2015), sendo possível portanto, que o tipo de microrganismo usado para inoculação modifique a intensidade da proteólise nas silagens. Isso pode ser observado neste trabalho, uma vez que o uso de LB reduziu a quantidade de prolamina, aumentou a quantidade de N-NH₃ e a degradação da MS, enquanto o uso de LPPA não alterou esses parâmetros.

5. Conclusão

Recomenda-se uso de LB, na dose 1×10^5 ufc por g de milho reidratado. O uso do LPPA piorou a estabilidade aeróbia das silagens de milho reidratado.

Referências

- Association of Official Analytical Chemist, AOAC. 1995. 16th. ed. Arlington: [AOAC], 1995.
- Basso, F.C., Bernardes, T. F., Roth, A.P.T.P., Rabelo, C.H.S., Ruggieri, A.C., Reis, R.A. 2012. Fermentation and aerobic stability of high-moisture corn silages inoculated with different levels of *Lactobacillus buchneri*. R. Bras. Zootec. 41:2369-2373.
- Carvalho, P.A., Bigaton, A.D., Fernandes, J., Santos, M.C., Daniel, J.L.P., Duarte, A.P., Nussio, L.G. 2015. Shifts in bacterial population of high moisture corn silages and its correlation with fermentation end-products. Pages 556-557 in Proc. XVIIth Int. Silage Conf. June 1-3. Piracicaba, SP, Brasil. ISSN 2175-4624.
- Driehuis, F., Oude Elferink, S. J.W.H., Spolestra, S.F. 1999. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. J. Appl. Microbiol.87:583–594.
- Driehuis, F.; Oude Elferink, S.J.W.H.; Van Wikselaar, P.G. 2001. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. Grass Forage Sci. 56:330–343.
- Hall, M.B. 2000. Neutral detergent-soluble carbohydrates nutritional relevance and analysis. Gainesville: University of Florida, 42 p. (Bulletin, 339).

- Hoffman, P.C., Esser, N.M., Shaver, R.D., Coblenz, W.K., Scott, M.P., Bodnar, A.L., Schmidt, R.J., Charley, R.C. 2011. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. . J. Dairy Sci. 94:2465–2474.
- Junges, D., Morais, G., Daniel, J.L.P., Spoto, M.H.F., Nussio, L.G. 2015. Contribution of proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. Pages 566-567 in Proc. XVIIth Int. Silage Conf. June 1-3. Piracicaba, SP, Brasil. ISSN 2175-4624.
- Kleinschmit, D.H., Schmidt, R. J., Kung, L., Jr. 2005. The effects of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage. J. Dairy Sci. 88:2130–2139.
- Kleinschmit, D.H.; Kung, L., Jr. 2006. A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. J. Dairy Sci. 89:4005-4013.
- Krooneman, J., Faber, F., Alderkamp, A.C., Oude Elferink, S.J.H.W, Driehuis, F., Cleenwerck, I., Swings, J., Gottschal, J.C., Vancanneyt, M. 2002. *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. International J. Syst. Evol. Microbiol. 52:639-646.
- Kung, L., Jr., Stokes, M.R.; Lin, C.J. 2003. Silage Additives. Pages 305-360 in Silage Science and Technology. Buxton, D.R., Muck, R.E., Harrison, J.H. (Eds.). American Society of Agronomy, Madison, WI.
- Kung, L., Jr., Schmidt, R.J., Ebling, T.E, Hu, W. 2007. The Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the Fermentation and Aerobic Stability of Ground and Whole High-Moisture Corn. J. Dairy Sci. 90:2309–2314.
- Lambert, R.J., Stratford, M. 1999. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. J. Appl. Microbiol. 86:157–164.

- Mari, L.J., Schmidt, R.J., Nussio, L.G., Hallada, C.M., Kung, L., Jr. 2009. An evaluation of the effectiveness of *Lactobacillus buchneri* 40788 to alter fermentation and improve the aerobic stability of corn silage in farm silos. *J. Dairy Sci.* 92:1174–1176.
- McDonald, P., Henderson, A.R., Heron, S.J.E. 1991. *The Biochemistry of Silage*. 2nd ed. Chalcombe Publ., Abersytwyth, U.K.
- Nellis, S.E., Hoffman, P.C., Shaver, R.D. 2013. Technical note: A modified method to quantify prolamin proteins in dry and high-moisture corn. *J. Dairy Sci.* 96:4647-52.
- Noel, R.J., Hambleton, L.G. 1976. Collaborative study of a semiautomated method for determination of crude protein in animal feeds. *J. AOAC Int.* 59:134-140.
- Oude Elferink, S.J.W.H., Krooneman, J., Gottschal, J.C., Spoelstra, S.F., Faber, F., Driehuis, F. 2001. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 125–132.
- Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Oude-Elferink, S.J.W.H., Spoelstra, S.F. 2003. Microbiology of Ensiling. Pages 31-93 in *Silage Science and Technology*. Buxton, D.R., Muck, R.E., Harrison, J.H. (Eds.). American Society of Agronomy, Madison, WI.
- Pryce, J.D. 1969. A modification of the barker-summeson method for the determination of lactic acid. *Analyst*, 94:1151-1152.
- Reis, R.A.; Schocken-Iturrino, R.P.; Almeida, E.O., Januskiewicz, E.R., Bernardes, T.F., Roth, A.P.T.P. 2008. Efeito de doses de *Lactobacillus buchneri* “CEPA NCIMB 40788” sobre as perdas nos períodos de fermentação e pós-abertura da silagem de grãos úmidos de milho. *Ciência Animal Brasileira* 9:923-934.
- Rezende, A.V., Rabelo, C.H.S., Veiga, R.M., Andrade, L.P., Härterb, C.J., Rabelo, F.H.S., Basso, F.C., Nogueirad, D.A., Reis, R.A. 2014. Rehydration of corn grain with acid whey improves the silage quality. *Anim. Feed Sci. Technol.* 197:213–221.

- Rooke, J.A., Hatfield, R.D. 2003. Biochemistry of Ensiling. Pages 95-140 in Silage Science and Technology. Buxton, D.R., Muck, R.E., Harrison, J.H. (Eds.). American Society of Agronomy, Madison, WI.
- Sebastian, S, Phillip, L.E., Fellner, V., Idziak, E.S. 1996. Comparative assessment of bacterial inoculation and propionic acid treatment on aerobic stability and microbial populations of ensiled high-moisture ear corn. *J. Anim. Sci.* 74:447-456.
- Silva, N. C., Santos, J.P., Avila, C. L. S., Evangelista, A. R., Casagrande, D. R., Bernardes, T. F. 2014. Evaluation of the effects of two *Lactobacillus buchneri* strains and sodium benzoate on the characteristics of corn silage in a hot-climate environment. *Grassland Sci.* 60:169–177.
- Tabacco, E., Piano, S., Cavallarin, L., Bernardes, T.F., Borreani, G. 2009. Clostridia spore formation during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* inoculants. *J. Appl. Microbiol.* 107:632-1641.
- Tabacco, E., Piano, S., Revello-Chion, A., Borreani, G. 2011. Effect of *Lactobacillus buchneri* LN4637 and *Lactobacillus buchneri* LN40177 on the aerobic stability, fermentation products, and microbial populations of corn silage under farm conditions. *J. Dairy Sci.* 94:5589–5598.
- Taylor, C. C., Kung, L., J. 2002. The effect of *Lactobacillus Buchneri* 40788 on the fermentation and aerobic stability of high moisture corn in laboratory silos. *J. Dairy Sci.* 85:1526–1532.
- Weissbach, F. 2009. Correction of dry matter content of silages used as substrate for biogas production. Pages 483-484 in Proc. XVth Int. Silage Conf. July 26-28. Madison, WI.

CAPÍTULO 3

O artigo a seguir está redigido conforme normas de publicação do *Journal of Dairy Science*, exceto o posicionamento das Tabelas e Figuras.

CAPÍTULO 3 - Influência dos tempos de armazenamento e do uso do inoculante *L. buchneri* na matriz proteica, perfil fermentativo, estabilidade aeróbia e degradabilidade de silagens de milho grão úmido ou reidratado

RESUMO

No processo de ensilagem de grão de milho ocorre a quebra da matriz proteica que recobre os grãos de amido, o que aumenta a digestibilidade do amido do milho. O objetivo deste estudo foi determinar as alterações que ocorreram devido ao tempo de estocagem e ao uso de inoculante sobre a matriz proteica, perfil fermentativo, microbiológico, estabilidade aeróbica e degradabilidade *in situ* de silagens de milho grão úmido ou reidratado. Os tratamentos foram estabelecidos pela combinação de dois tipos de ensilagem, silagem de milho grão úmido (MU) e silagem de milho reidratado (MR; 65% de MS), ambos com o uso de *Lactobacillus buchneri* (LB; NCIMB 40788, Lallemand, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil) na concentração de 1×10^5 ufc/g de milho grão úmido ou reidratado fresco ou sem inoculante (Controle), em um esquema fatorial 2×2 . Foram avaliados 8 tempos de estocagem (15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 e 300 dias após a ensilagem). Os dados foram avaliados com delineamento inteiramente casualizado, com esquema fatorial e medidas repetidas no tempo, usando-se o procedimento MIXED do SAS. O uso de inoculante na MU aumentou o pH e a contagem de bactérias ácido lácticas durante todo o período de estocagem. A prolamina foi maior na MR Controle de 15 a 60 dias de estocagem e menor na MU LB de 120 a 300 dias. A utilização do *L. buchneri* reduziu a contagem de leveduras e a concentração de etanol na MR. A MU com e sem inoculante teve maior contagem de fungos filamentosos durante o período de estocagem em relação à MR. Os teores de ácido láctico, ácido acético, ácido propiônico e 1,2-propanodiol foram maiores, e o de ácido butírico foi menor na MR em comparação com a MU. As silagens inoculadas com LB apresentaram

maiores concentrações de ácido acético e 1,2-propanodiol e menores concentrações dos ácidos láctico e butírico. O LB aumentou a estabilidade aeróbia e reduziu os picos de temperatura em ambas as formas de processamento do milho. A soma das diferenças médias de temperaturas entre o ambiente e as silagens, aos 4, 8 e 12 dias de aerobiose, foram maiores na MU Controle durante a estocagem em relação às demais silagens. Quando incubadas com tamanho de partícula original, a degradabilidade *in situ* da MS foi maior na MR em comparação com a MU. Já, quando foram padronizadas por moagem a 2 mm, a MU teve maior degradabilidade que a MR. De acordo com o modelo de regressão segmentada os maiores ganhos de degradabilidade *in situ* (12 horas de incubação) na MU e MR ocorreram até 71 e 52 dias de estocagem, respectivamente, quando incubados com tamanho de partícula original, e até 35 e 50 dias, quando incubados após moagem a 2 mm.

Palavras-chave: amido, degradabilidade *in situ*, prolamina, reidratação

INTRODUÇÃO

Os grãos de milho estão entre os ingredientes mais utilizados em dietas de ruminantes, sendo uma das principais fontes de energia. Eles podem ser classificados, de acordo com a vitreosidade do seu endosperma, em dentados (endosperma com menor porcentagem vitreosidade) e duros (endosperma com maior vitreosidade). Quanto maior a vitreosidade do material, menor a degradabilidade *in vivo* e *in situ* do amido (Philippeau et al., 2000; Correa et al., 2002). Isso ocorre porque a matriz proteica que recobre os grãos de amido é mais espessa e desenvolvida no endosperma vítreo. A matriz proteica, que é composta na maior parte pela proteína prolamina (zeína no milho) é hidrofóbica e age como barreira física que dificulta a

digestão do amido no rúmen pelos microrganismos (Owens et al., 1986). Práticas de processamento têm aumentado a digestibilidade dos grãos pelo rompimento físico e/ou químico da matriz proteica (Theurer et al., 1999; Ferraretto et al., 2013).

A ensilagem dos grãos de milho é uma técnica que apresenta bons resultados em aumentar a digestibilidade do amido (Ferraretto et al., 2013). Durante a ensilagem, dois mecanismos intrínsecos à fermentação das silagens são responsáveis por expor os grãos de amido: 1) solubilização da matriz proteica pelos ácidos produzidos durante a fermentação; 2) proteólise da matriz por enzimas proteolíticas dos microrganismos e da própria planta (Vierstra, 1996). A redução da zeína, presente na matriz proteica, foi observada com o aumento de tempo de estocagem em silagens de grão úmido (Hoffman et al., 2011), entretanto não foram estudados os efeitos diretos na digestibilidade do amido. Outro tipo de processamento é a ensilagem de grão de milho seco e moído, após passarem por um processo de reidratação, alcançando teor de umidade ideal para o crescimento microbiano. A silagem de grão de milho reidratado apresenta a vantagem dos processos de moagem e ensilagem, embora existam poucas informações científicas sobre esses benefícios em conjunto. A silagem de milho reidratado pode ser utilizada de forma estratégica em locais onde seja inviável o plantio do milho para a confecção da silagem de grão úmido.

Tanto as silagens de grão úmido como as de grão reidratado de milho, apresentam problemas relacionados à estabilidade aeróbia (Sebastian et al., 1996; Rezende et al., 2014). Assim, o uso de inoculantes à base de bactérias heterofermentativas obrigatórias, como o *Lactobacillus buchneri*, tem apresentado bons resultados sobre a estabilidade aeróbia de silagens de grão úmido (Kung et al., 2007, Basso et al., 2012) e de milho reidratado (Silva et al., 2014), devido à alta capacidade antifúngica do ácido acético, um dos produtos da sua fermentação (Lambert e Stratford, 1999). O uso de inoculantes pode ter efeito sobre o perfil

microbiano dessas silagens e conseqüentemente influenciar a degradação do amido. Uma vez que a atividade proteolítica de bactérias é responsável por 60,4% da degradação de proteína em silagens de grãos de milho reidratado (Junges et al., 2015). Segundo Hoffman et al. (2011) a atividade proteolítica está mais relacionada à degradação da zeína que a solubilização por ácidos em silagens de milho com alta umidade. Há fortes indícios na literatura da atividade proteolítica durante a ensilagem, com quebra da matriz proteica (Hoffman et al., 2011; Kung et al., 2014). Contudo não foram quantificados os efeitos dessas mudanças ao longo de tempos prolongados de estocagem, bem como do uso de inoculantes no aumento da digestibilidade ao amido. A hipótese do presente trabalho é que o tempo longo de estocagem associado com o uso de inoculante resultaria em maior digestibilidade do amido do milho, além da manutenção da estabilidade da silagem, sendo possível definir o pondo de abertura das silagens para explorar os ganhos de aumento de digestibilidade

Assim, o objetivo deste estudo foi verificar as alterações, em resposta ao tempo de estocagem e uso de inoculante sobre a matriz proteica, perfil fermentativo, microbiológico, estabilidade aeróbica e degradabilidade *in situ* de silagens de milho grão úmido ou reidratado.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantio e Adubação

O experimento foi conduzido no Pólo Regional do Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios da Alta Mogiana, em Colina, São Paulo. O híbrido de milho utilizado foi o DKB 390 VT PRO 2TM (Dekalb, Uberlândia, MG, Brasil). Foram plantados 4 hectares em uma área com sistema de irrigação de pivô central, previamente dessecada. A adubação de plantio foi 380 kg por hectare de 8-28-16 e de cobertura 400 kg por hectare de 20-0-20. Uma parte do milho foi colhido em setembro de 2014 para a ensilagem de grão úmido de milho, e o restante

permaneceu no campo para secar e, em outubro de 2014, foi colhido para ensilagem de milho reidratado.

Aplicação dos Tratamentos

Os tratamentos foram constituídos por um esquema fatorial (2×2) em que o primeiro fator foi dois tipos de ensilagem, sendo silagem de milho grão úmido (**MU**) e silagem milho reidratado (**MR**); e o segundo fator foi o uso de inoculante, sendo as silagens inoculadas com *Lactobacillus buchneri* (**LB**; NCIMB 40788, Lallemand, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil) na concentração de 1×10^5 ufc/g de milho com alta umidade e sem inoculante (**Controle**). Os grãos de milho colhidos com alta umidade passaram pelo rolo laminador da embutidora (INGRAIN60, Marcher, Gravataí, RS, Brasil) para quebra grosseira. Foram divididas em dois montes (Tabela 1), os quais foram utilizados para a confecção da MU Controle e da MU LB. O milho seco foi colhido (18% de umidade) e levado a um secador comercial para secagem por aquecimento (10,5% de umidade), posteriormente moído em moinho de martelo (TN 9; peneira com crivo de 2 mm), colocado em um vagão de mistura total com balança acoplada (Siltomac, modelo S-2.3, São Carlos, SP, Brasil) onde recebeu água sem cloro à temperatura ambiente, com o objetivo de atingir teor de umidade de 35 %, com mistura constante para garantir uma uniformização do material. O milho reidratado foi então depositado em dois montes (Tabela 1), os quais foram utilizados para a confecção da MR Controle e da MR LB. Em ambos os tratamentos, os inoculantes foram diluídos em água não clorada, sendo aplicados 2 L por tonelada de milho por meio de um pulverizador manual. O controle também recebeu a mesma quantidade de água dos tratamentos com aditivos.

Tabela 1. pH, composição química (% da MS) e microbiológica do material ensilado do milho grão úmido e (MU) e do milho reidratado (MR) ensilados sem (Controle) e com *L. buchneri* (LB; 1×10^5 ufc/g)

Item	MU		MR	
	Controle	LB	Controle	LB
pH	5,38	5,37	6,77	6,79
MS, %	62,2	61,3	64,7	63,3
PB, %	8,05	8,09	8,35	8,29
CSA ¹ , %	1,38	1,30	1,89	1,83
BAL ² , log ufc/g	7,74	7,40	4,16	4,30
Leveduras, log ufc/g	5,63	5,90	3,70	3,62
Fungos filamentosos, log ufc/g	4,53	3,90	3,52	3,56

¹CSA = carboidratos solúveis em água. ²BAL = bactéria ácido láctica.

Para a avaliação do tempos de estocagem, foram utilizados baldes plásticos como silos experimentais com capacidade de 15 L. Cada tratamento foi composto por 8 tempos de estocagem (15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 e 300 dias, após a ensilagem) e 4 repetições. A compactação foi realizada manualmente, atingindo uma densidade média de 1000 kg/m³ de matéria natural no milho grão úmido e de 1000 kg/m³ de matéria natural no milho reidratado. Após a compactação, cada silo foi vedado com tampa plástica.

Período de Exposição Aeróbia

Os silos foram abertos e todo o conteúdo de cada silo foi homogeneizado e dividido em subamostras. Cada subamostra foi submetida à determinação das alterações das características do grão, perfil fermentativo, contagem microbiana e estabilidade aeróbia. Aproximadamente 3 kg de silagem foram colocados em sacos plásticos para o monitoramento da estabilidade aeróbia. Os sacos foram mantidos em sala fechada com temperatura constante de 25°C por 12 dias. A temperatura das silagens foi registrada a cada hora por meio de *data loggers* (Pro2.07.09, Escort Console, Buchanan, VA, Estados Unidos da América). A estabilidade aeróbia foi definida como o número de horas que a silagem permaneceu estável antes de atingir 2°C acima da temperatura ambiente (Ranjit e Kung, 2000), sendo calculado o pico de

temperatura e soma das médias das diferenças de temperatura por dia do balde com o ambiente aos 4, 8 e 12 dias de aerobiose (**ADITE4**, **ADITE8** e **ADITE12**).

Análises Químicas e Microbiológicas

O material pré-ensilado e as silagens, ambos em duplicata, foram levados à estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas para estimação da MS (nº do método 934.01, AOAC, 1995), sendo moídos em moinho com peneira de crivo de 1 mm para posterior estimação da proteína bruta (PB) conforme a AOAC (nº do método 978.04; 1995), carboidratos solúveis em água (CSA) (Hall, 2000) e prolamina (Nellis et al., 2013). A determinação do pH, nitrogênio amoniacal, ácido lático (Pryce, 1969) e compostos voláteis foram obtidos por meio de extrato aquoso (1:10) com água destilada. O pH foi mensurado com potenciômetro (DM-22, Digimed, Campo Grande, São Paulo, SP, Brasil) e o nitrogênio amoniacal (**N-NH₃**) segundo técnica descrita por Noel e Hambleton (1976). Os teores de álcoois, ésteres, ácidos graxos voláteis e acetona foram determinados em cromatógrafo gasoso com detector de massas (GCMS) (GCMS QP 2010 plus, Shimadzu®, Kyoto, Japan), usando coluna capilar (Stabilwax, Restek®, Bellefonte, USA; 60 m, 0,25 mm ø, 0,25 µm crossbond carbowax polyethylene glycol) e parâmetros analíticos conforme as recomendações do fabricante.

Outra amostra foi utilizada para a contagem de leveduras, fungos filamentosos e BAL, utilizando-se um extrato aquoso (1:10) com água peptonada (1g por litro de água), homogeneizado durante 4 minutos no Stomacher® (400 Circulator, West Sussex, UK). Para a contagem de leveduras e fungos filamentosos foi utilizada a técnica de plaqueamento em superfície, com o meio de cultura YGC Agar (Fluka), sendo preparadas diluições em série e em duplicata (Tabacco et al., 2009). Após incubação a 28 °C durante três e cinco dias para leveduras e fungos filamentosos, respectivamente, foram contadas as colônias separadamente, com base nas suas características macromorfológicas. Para a contagem total de bactérias ácido

láticas (BAL), foi usada à mesma técnica descrita para leveduras e fungos filamentosos, entretanto o meio de cultura utilizado foi o MRS Agar (Himedia), e a incubação foi realizada a 35°C por três dias, quando se procedeu à contagem.

Degradabilidade in situ

Para a análise de degradabilidade *in situ*, foram utilizados 5 g de silagem seca a 55°C, como descrito anteriormente, com tamanho médio de partícula original (**TMPOrig**; manteve o tamanho de partícula da ensilagem) ou tamanho média de partícula de 2 mm (**TMP2mm**; moído em moinho tipo Willy com peneira com crivo a 2 mm), incubada em sacos para avaliação da degradabilidade (modelo R1020, Ankon, 50±15 micras), como descrito por Nocek (1988). Foram utilizados dois tempos de incubação de 12 e 24 horas, simulando uma situação de alta (0,08/h) e baixa (0,04/h) taxa de passagem. A incubação foi realizada em 8 bovinos Nelore canulados no rúmen. Os animais foram alimentados com dieta que continha silagem de milho com alta umidade sem inoculante (n=2), ou silagem de milho com alta umidade com *L. buchneri* (n=2), ou silagem de milho reidratado sem inoculante (n=2), ou silagem de milho reidratado com *L. buchneri* (n=2), sempre na proporção de 62,6 % da MS da dieta, com relação volumoso:concentrado de 12,5:87,5. As incubações foram realizadas em 4 períodos, sendo 9 dias de adaptação à dieta e um de incubação. Nos dois primeiros períodos foram incubadas as silagens com tamanho de partícula original e, nos dois últimos, as silagens moídas a 2 mm.

Foram colocados primeiro os sacos de 24 horas e, após 12 horas, os sacos de 12 horas, sendo retirados ao mesmo tempo e, posteriormente, lavados e secados por 72 horas em estufa de circulação forçada a 55°C para posterior pesagem.

Análise Estatística

O experimento foi constituído de um delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial 2×2 (duas formas de ensilagem, com ou sem inoculante), como medidas repetidas no tempo com o seguinte modelo: $Y_{ijk} = \mu + ENS_i + IN_j + ENS \times IN_{ij} + T_k + Aj:i + ENS \times T_{ik} + IN \times T_{jk} + ENS \times IN \times T_{ijk} + e_{ijk}$. Em que efeitos fixos são μ = média geral; ENS_i = tipo de ensilagem (MU; MR); IN_j = inoculante (sem; com *L. buchneri*); $ENS \times IN_{ij}$ = interação entre tipo de ensilagem e inoculantes; T_k = tempos de estocagem dos silos (15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 e 300); $ENS \times T_{ik}$ = interação entre tipo de ensilagens e tempos de estocagem; $IN \times T_{jk}$ = interação entre inoculantes e tempo de estocagem; $ENS \times IN \times T_{ijk}$ = interação entre tipo de ensilagem, inoculantes e tempo de estocagem; e efeitos aleatórios de $Aj:i$ (balde aninhado em tratamento); e e_{ijk} = erro experimental. A melhor estrutura de variância para cada variável testada foi escolhida pela menor BIC. As variáveis foram analisadas pelo PROC MIXED do SAS (2000) e as médias foram comparadas pelo teste t a 5% de probabilidade.

Para a variável degradabilidade *in situ* da MS, foi realizada a modelagem dos dados para os tempos de estocagem, sendo considerados cinco modelos de regressão não-linear, utilizando o procedimento PROC NLIN do SAS: 1) exponencial; 2) logístico; 3) *Broken-line* com regressão linear para o primeiro segmento seguido de platô; 4) *Broken-line* com regressão linear para o primeiro segmento e outra linear para o segundo segmento; e 5) *Broken-line* com regressão quadrática para o primeiro segmento e linear para o segundo segmento. Os ajustes aos modelos foram comparados por R^2 -ajustado e raiz quadrada do quadrado médio do erro.

RESULTADOS

Características Químicas e Perfil Fermentativo

Os teores de MS, N-NH₃ e prolamina foram influenciados ($P < 0,01$) pela interação entre tipos de ensilagem, inoculante e tempo de estocagem (Figura 1). De maneira geral, os teores de MS aumentaram até os 240 dias de estocagem, diminuindo aos 300 dias. O teor de MS na MR Controle foi maior que os demais tratamentos dos 15 aos 60 dias de estocagem. A partir de 120 dias de estocagem, MU Controle e MU LB, de maneira geral, apresentaram maiores teores de MS que MR Controle e MR LB. A concentração de N-NH₃ foi maior para as silagens MR LB e MU LB a partir dos 120 dias de estocagem. Os teores de prolamina decresceram com os dias de estocagem, sendo que até 90 dias de estocagem a quantidade de prolamina foi maior na MU Controle e, a partir do 120 dias de estocagem, menor na MU LB, em relação aos demais tratamentos. O teor de PB foi influenciado pelo tipo de ensilagem ($P < 0,01$), tempo de estocagem ($P < 0,01$), interação entre tempo de estocagem e tipo de ensilagem ($P < 0,01$) e tempo de estocagem e inoculante ($P = 0,01$). Em média, MR (8,48 %) teve maiores teores de PB que MU (8,06 %). Os teores de PB aumentaram com o tempo de estocagem, sendo que MR foi maior que MU durante todo o período de estocagem.

Os valores de pH e a contagem de BAL, leveduras e fungos filamentosos foram influenciados ($P < 0,05$) pela interação entre tipos de ensilagem, inoculante e tempo de estocagem (Figura 2). A utilização de LB aumentou o pH na MU na maior parte do tempo de estocagem em relação aos demais tratamentos. De maneira geral MR Controle e MR LB tem maiores valores de pH que MU Controle. A contagem de BAL nas silagens com LB foi maior que nas silagens Controle, até os 120 dias de, independentemente do tipo de ensilagem. Com 180 dias de ensilagem foi perdida a contagem de bactérias ácido lácticas na MR LB, devido a

problemas no plaqueamento. A partir de 180 dias de estocagem MU LB apresentou maior contagem de BAL. O uso de LB reduziu a contagem de leveduras na MU e MR com 30, 60 e 90 dias de estocagem. Dos 120 dias em diante MU LB, MR LB e MU Controle apresentaram menor contagem de leveduras que MR Controle, permanecendo abaixo do nível de detecção ($< 2,0 \log$ de ufc/g). De maneira geral a contagem de fungos foi maior na MU LB e MU Controle em relação à MR LB e MR Controle.

Os ácidos butírico e iso-butírico foram os únicos componentes voláteis influenciados ($P < 0,01$) pela interação entre os tipos de ensilagem, inoculantes e tempo de estocagem (Tabela 2). A concentração de 2-butanodiol, acetato de propila, ácido valérico e álcool iso-propílico foram muito baixas, não sendo avaliadas estatisticamente. Os componentes voláteis ácido láctico, 1,2-propanodiol, etanol, 2,3-butanodiol, ácido fórmico e ácido iso-valérico foram influenciados ($P < 0,05$) pela interação entre o tipo de ensilagem e o inoculante. O maior teor de ácido láctico foi observado na MU Controle e o menor na MU LB. Em média, os teores de ácido láctico foram reduzidos ($P < 0,01$) com o tempo de estocagem de 25,7; 20,9 e 20,0 g/kg de MS aos 30, 60 e 180 dias de estocagem, respectivamente, sendo maior ($P < 0,01$) na MR (24,1; 23,2 e 22,0 g/kg de MS, respectivamente) em comparação com MU (27,3; 18,6 e 18,1 g/kg de MS, respectivamente), ao longo dos dias de estocagem (30, 60 e 90 dias). Silagens inoculadas com LB apresentaram maiores ($P < 0,01$) teores de ácido acético em relação às silagens Controle, e MR teve maior ($P < 0,01$) teor de ácido acético que MU. A concentração de ácido acético foi maior ($P < 0,01$) aos 180 dias (9,17 g/kg de MS) de estocagem em relação a 30 e 60 dias (5,08 e 6,12 g/kg de MS, respectivamente). Silagens inoculadas com LB tiveram maior concentração de ácido acético em todos os dias de estocagem em relação às silagens Controle ($P < 0,01$). Maior ($P < 0,01$) concentração de ácido propiônico foi encontrada na MR em comparação ao MU.

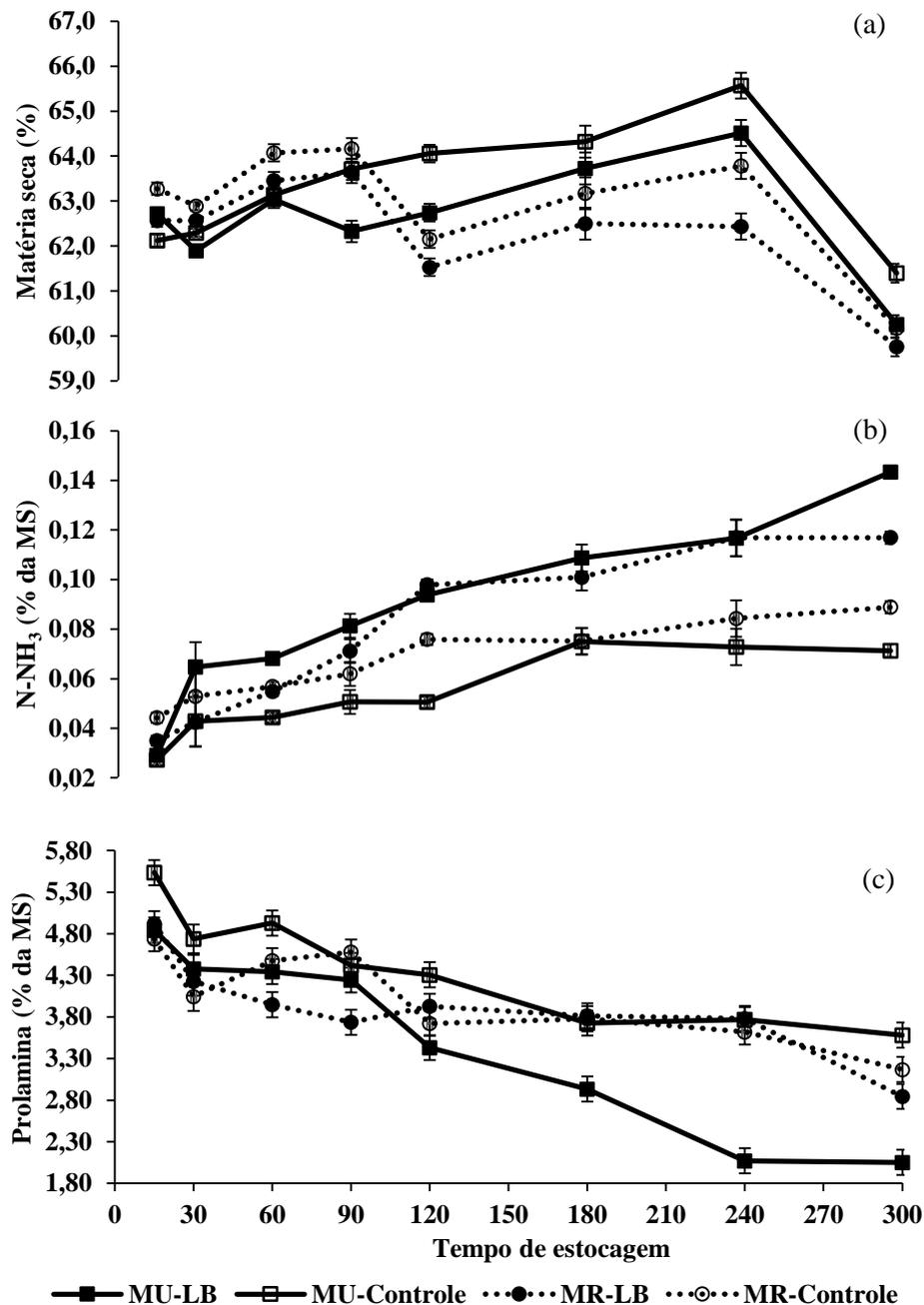


Figura 1. Teores de MS (a) nitrogênio amoniacal (N-NH₃) (b) e prolamina (c) da silagem de milho grão úmido (MU) e silagem de milho reidratado (MR) ensiladas sem (Controle) e com *L. buchneri* (LB; 1×10^5 ufc/g) em diferentes tempos de estocagem. (a) EPM = 0,21; Efeito de tipos de ensilagem (ENS), $P < 0,01$; efeito de inoculante (IN), $P < 0,01$; interação entre tipos de ensilagem e inoculante (ENS×IN), $P = 0,90$; efeito de tempo de estocagem (T), $P < 0,01$; interação entre ENS×T, $P < 0,01$; interação entre IN×T, $P < 0,01$; interação entre ENS×IN×T, $P < 0,01$. (b) EPM = 0,005; Efeito de ENS, $P = 0,23$; efeito de IN, $P < 0,01$; interação entre ENS×IN, $P < 0,01$; efeito de T, $P < 0,01$; interação entre ENS×T, $P < 0,01$; interação entre IN×T, $P < 0,01$; interação entre ENS×IN×T, $P < 0,01$. (c) EPM = 0,15; Efeito de ENS, $P = 0,97$; efeito de IN, $P < 0,01$; interação entre ENS×IN, $P < 0,01$; efeito de T, $P < 0,01$; interação entre ENS×T, $P < 0,01$; interação entre IN×T, $P < 0,01$; interação entre ENS×IN×T, $P < 0,01$.

De maneira geral, com o avanço do tempo de estocagem houve aumento significativo ($P < 0,01$) na concentração de ácido propiônico (16,8; 16,5 e 21,5 mg/kg de MS aos 30, 60 e 90 dias de estocagem, respectivamente). A concentração de 1,2-propanodiol foi maior ($P = 0,01$) na MU LB e MR LB e menor para MU e MR sem inoculante. Em relação ao tempo de estocagem, a concentração de 1,2-propanodiol aumentou ($P < 0,01$) em todos os tempos (1450, 2685 e 5045 mg/kg de MS aos 30, 60 e 180 dias, respectivamente); e com relação à interação entre inoculante e tempo o uso de LB gerou maior ($P < 0,01$) concentração de 1,2-propanodiol em relação ao Controle em todos os tempos de estocagem. O ácido butírico foi maior ($P < 0,01$) na MU Controle aos 30, 60 e 180 dias de estocagem (8,21; 13,71 e 140,77 mg/kg MS) em relação a MU LB (3,20; 3,25 e 5,36 mg/kg MS), MR Controle (3,99; 2,67 e 2,97 mg/kg MS) e MR LB (2,36; 2,11 e 2,19 mg/kg MS). A concentração de etanol foi maior ($P < 0,01$) na MR Controle em relação às demais silagens e menor na MU Controle e MU LB. Com relação à interação tipo de ensilagem e tempo, houve diferença somente aos 30 dias de estocagem nos quais a concentração de etanol foi maior ($P = 0,02$) na MR em comparação com MU. O tratamento MU LB apresentou maior concentração de 2,3-butanodiol em comparação com MU Controle, MR LB e MR Controle. Lactato de etila e acetato de etila foram maiores ($P < 0,01$) na MR em comparação com MU. As silagens inoculadas com LB apresentaram maior ($P < 0,01$) concentração de acetato de etila e menor ($P < 0,01$) concentração de lactato de etila em relação às silagens Controle. Com relação ao tempo de estocagem, houve um aumento ($P < 0,01$) na concentração lactato de etila e acetato de etila com o avançar dos dias. Em média, as concentrações de lactato de etila e acetato de etila foram maiores ($P < 0,01$) na MR em relação ao MU ao longo dos tempos de estocagem. O uso de LB reduziu ($P < 0,01$) a concentração de lactato de etila e aumentou ($P < 0,01$) a concentração de acetato de etila em relação às silagens Controle, em todos os tempos de estocagem. A concentração de ácido fórmico foi maior ($P <$

0,01) na MU LB em relação aos demais e menor para MU Controle. Com relação à interação entre inoculante e tempo de estocagem, o uso de LB (51,8 mg/kg MS) aumentou ($P < 0,01$) a concentração de ácido fórmico em relação ao Controle (6,9 mg/kg MS), aos 30 dias de estocagem, não havendo diferenças nos demais dias de estocagem. A MR apresentou menor ($P = 0,04$) concentração de metanol e maior ($P < 0,01$) de 1-propanol em relação à MU. Silagens inoculadas com LB apresentaram maior ($P < 0,01$) concentração de metanol e 1-propanol em relação ao Controle. Em relação ao tempo de estocagem, com o avanço dos dias (30, 60 e 180 dias) houve um aumento na concentração de metanol (37,8; 41,9 e 55,3 mg/kg MS, respectivamente; $P < 0,01$) e 1-propanol (1,71; 4,74 e 9,37 mg/kg MS, respectivamente; $P = 0,01$). A MU apresentou maior ($P < 0,01$) concentração de acetona em comparação com as silagens MR. A interação entre tipos de ensilagem e tempo de estocagem influenciou ($P < 0,01$) a concentração de acetona, sendo que aos 30 dias de estocagem MU (101,44 mg/kg MS) foi maior em relação a MR (6,94 mg/kg MS), e nos demais dias (60 e 180 dias), não houve diferenças entre MU (4,08 e 7,64 mg/kg MS) e MR (4,33 e 8,61 mg/kg MS). A concentração de ácido iso-butírico foi maior ($P < 0,01$) na MR LB (13,51 mg/kg MS) e MU LB (7,14 mg/kg MS) em relação à MR Controle (1,64 mg/kg MS) e MU Controle (1,56 mg/kg MS), aos 180 dias de estocagem e, para os demais dias, não houve diferença. A concentração de ácido iso-valérico foi maior ($P < 0,01$) na MR em comparação à MU, e para silagens Controle em relação a LB. Houve interação ($P = 0,03$) entre inoculante e tempo de estocagem sendo que, aos 60 e 180 dias de ensilagem, as silagens com LB (2,02 e 2,00 mg/kg MS, respectivamente) apresentaram menores concentrações de ácido iso-valérico em comparação com Controle (3,60 e 4,29 mg/kg MS, respectivamente).

Estabilidade Aeróbia

Houve interação ($P < 0,01$) entre tipo de ensilagem, inoculante e tempo de estocagem para as variáveis estabilidade aeróbia, pico de temperatura, ADIT 4, ADIT 8 e ADIT 12. Houve aumento ($P < 0,01$) na estabilidade aeróbia com o avançar do tempo de estocagem. A utilização do LB nas duas formas de ensilagem (MU e MR) promoveu melhorias na estabilidade aeróbia. A estabilidade aeróbia da MR Controle foi maior que a da MU Controle na maioria dos tempos de estocagem. Os picos máximos de temperatura foram reduzidos com os tempos de estocagem. O uso do inoculante LB na MU e MR reduziu os picos de temperatura em relação as silagens Controle nas duas formas de ensilagem (MU e MR). Nos tempos iniciais de estocagem (até os 60 dias), os picos de temperatura foram maiores para MU Controle e MU LB em relação à MR Controle e MR LB. A MU Controle apresentou o maior ADIT 4 até os 120 dias de estocagem. Durante todo o tempo de estocagem, o ADIT 8 foi maior na MU Controle. Já o ADIT 12 foi maior para as silagens que não receberam aditivos (MU Controle e MR Controle) durante a maior parte do tempo de estocagem.

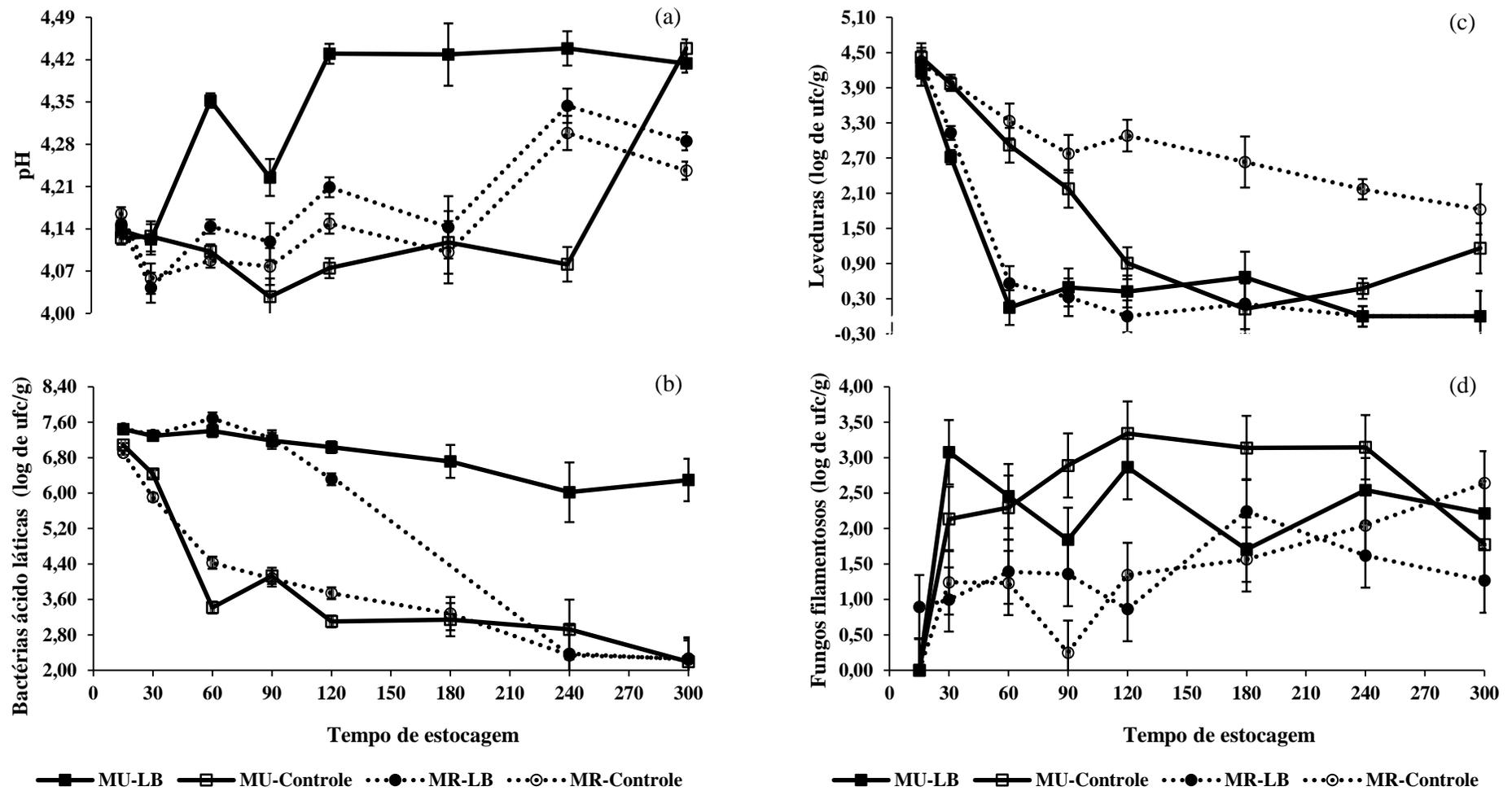


Figura 2. Valores de pH (a), contagem de bactérias ácido lácticas (b), leveduras (c) e fungos filamentosos (d) da silagem de milho grão úmido (MU) e silagem de milho reidratado (MR) ensiladas sem (Controle) e com *L. buchneri* (LB; 1×10^5 ufc/g) em diferentes tempos de estocagem. (a) EPM = 0,02; Efeito de tipo de ensilagem (ENS), $P < 0,01$; efeito de inoculante (IN), $P < 0,01$; interação entre tipo de ensilagem e inoculante (ENS x IN), $P < 0,01$; efeito de tempo de estocagem (T), $P < 0,01$; interação entre ENS x T, $P < 0,01$; interação entre IN x T, $P < 0,01$; interação entre ENS x IN x T, $P < 0,01$. (b) EPM = 0,26; Efeito de ENS, $P < 0,01$; efeito de IN, $P < 0,01$; interação entre ENS x IN, $P <$

0,01; efeito de T, $P < 0,01$; interação entre ENS×T, $P < 0,01$; interação entre IN×T, $P < 0,01$; interação entre ENS×IN×T, $P < 0,01$. c) EPM = 0,29; Efeito de ENS, $P < 0,01$; efeito de IN, $P < 0,01$; interação entre ENS×IN, $P < 0,01$; efeito de T, $P < 0,01$; interação entre ENS×T, $P < 0,06$; interação entre IN×T, $P < 0,01$; interação entre ENS×IN×T, $P < 0,01$. d) EPM = 0,45; Efeito de ENS, $P < 0,01$; efeito de IN, $P = 0,51$; interação entre ENS×IN, $P = 0,37$; efeito de T, $P < 0,01$; interação entre ENS×T, $P = 0,06$; interação entre IN×T, $P = 0,62$; interação entre ENS×IN×T, $P = 0,03$.

Tabela 2. Componentes voláteis da silagem de milho grão úmido (MU) e silagem de milho reidratado (MR) ensiladas sem (Controle) e com *L. buchneri* (LB; 1×10^5 ufc/g) em diferentes tempos de estocagem

Item	MU		MR		EPM	P valor ¹						
	LB	Controle	LB	Controle		ENS	IN	ENS×IN	T	ENS×T	IN×T	ENS×IN×T
	g/kg de MS											
Ácido láctico	16,0 c	26,7 a	22,4 b	23,7 b	0,83	0,04	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,23	0,88
Ácido acético	8,99	3,13	10,82	4,23	0,29	<0,01	<0,01	0,24	<0,01	0,23	<0,01	0,83
Etanol	5,33 c	4,35 c	7,05 b	9,36 a	0,36	<0,01	0,08	<0,01	0,07	0,02	0,55	0,28
	mg/kg de MS											
Ácido propiônico	14,6	14,6	21,4	23,2	0,76	<0,01	0,50	0,12	<0,01	0,66	0,38	0,65
Ácido butírico	3,94 b	54,23 a	2,22 c	3,21 bc	4,04	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
1,2-Propanodiol	5493 b	41 c	6603 a	103 c	193	<0,01	<0,01	0,01	<0,01	0,07	<0,01	0,07
2,3-Butanodiol	552 a	148 c	230 bc	265 b	32,2	<0,01	<0,01	<0,01	0,07	0,12	0,43	0,34
Lactato de etila	74,8	89,2	139	170	5,74	<0,01	<0,01	0,16	<0,01	<0,01	<0,01	0,84
Acetato de etila	84,7	48,0	143,9	95,2	5,31	<0,01	<0,01	0,27	<0,01	<0,01	<0,01	0,65
Ácido fórmico	58,7 a	4,0 c	25,2 b	40,0 b	5,20	0,81	<0,01	<0,01	0,36	0,35	<0,01	0,31
Metanol	52,2	42,2	44,8	40,8	1,92	0,04	<0,01	0,15	<0,01	0,44	0,94	0,81
1-Propanol	3,43	0,00	14,33	3,35	1,95	<0,01	<0,01	0,06	0,01	0,41	0,05	0,99
Acetona	38,1	37,4	7,24	6,02	0,98	<0,01	0,35	0,78	<0,01	<0,01	0,89	0,86
Ácido iso-butírico	4,05 b	1,73 c	6,25 a	1,67 c	0,31	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Ácido. iso-valérico	1,97 c	2,95 b	2,61 b	4,75 a	0,11	<0,01	<0,01	<0,01	0,13	0,48	0,03	0,43

¹ENS= efeito de tipo de ensilagem; IN = efeito de inoculante; ENS×IN = interação entre tipo de ensilagem e inoculante; T = efeito de tempo de estocagem; ENS×T = interação entre tipo de ensilagem e tempo de estocagem; IN×T = interação entre inoculante e tempo de estocagem; ENS×IN×T = interação entre tipo de ensilagem, inoculante e tempo de estocagem. ^{a-c}Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si.

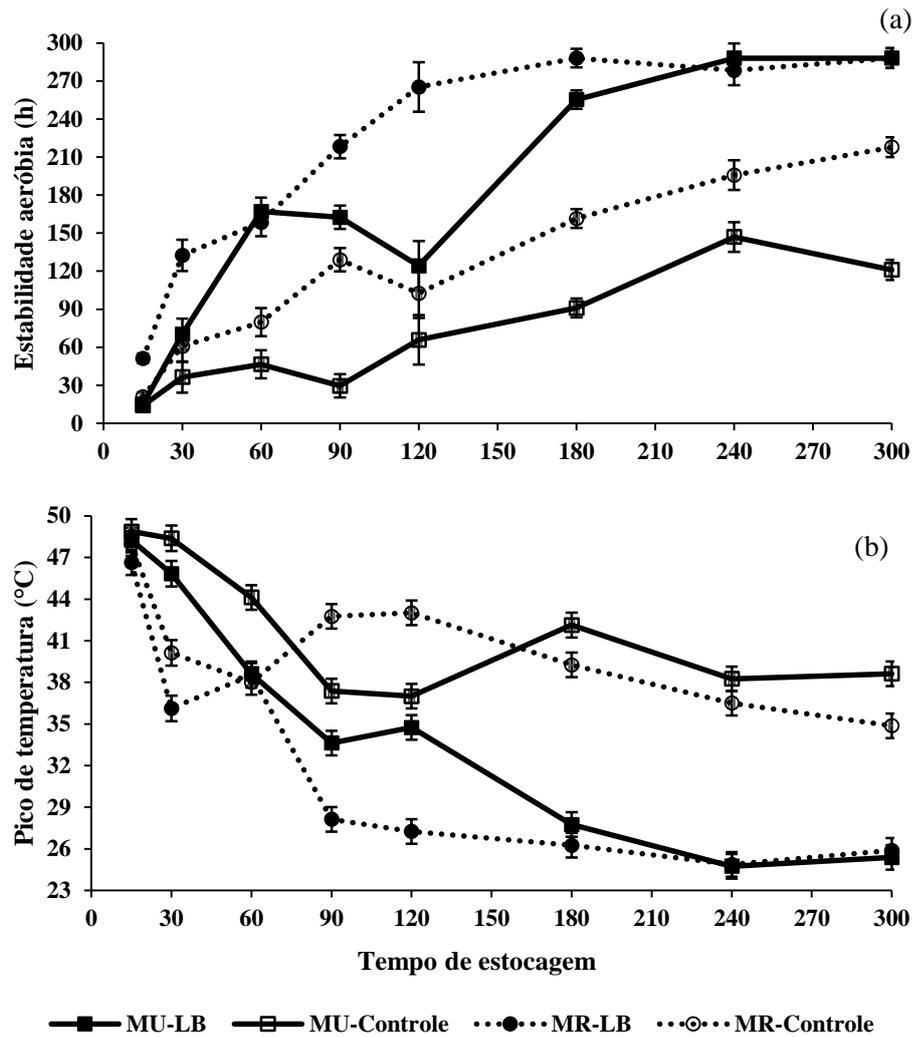


Figura 3. Estabilidade aeróbica e pico de temperatura da silagem de milho grão úmido (MU) e silagem de milho reidratado (MR) ensiladas sem (Controle) e com *L. buchneri* (LB; 1×10^5 ufc/g) em diferentes tempos de estocagem. (a) EPM = 10,31; Efeito de tipos de ensilagem (ENS), $P < 0,01$; efeito de inoculante (IN), $P < 0,01$; interação entre tipos de ensilagem e inoculante (ENS×IN), $P = 0,10$; efeito de tempo de estocagem (T), $P < 0,01$; interação entre ENS×T, $P < 0,01$; interação entre IN×T, $P < 0,01$; interação entre ENS×IN×T, $P < 0,01$. (b) EPM = 0,89; Efeito de ENS, $P < 0,01$; efeito de IN, $P < 0,01$; interação entre ENS×IN, $P = 0,01$; efeito de T, $P < 0,01$; interação entre ENS×T, $P < 0,01$; interação entre IN×T, $P < 0,01$; interação entre ENS×IN×T, $P < 0,01$.

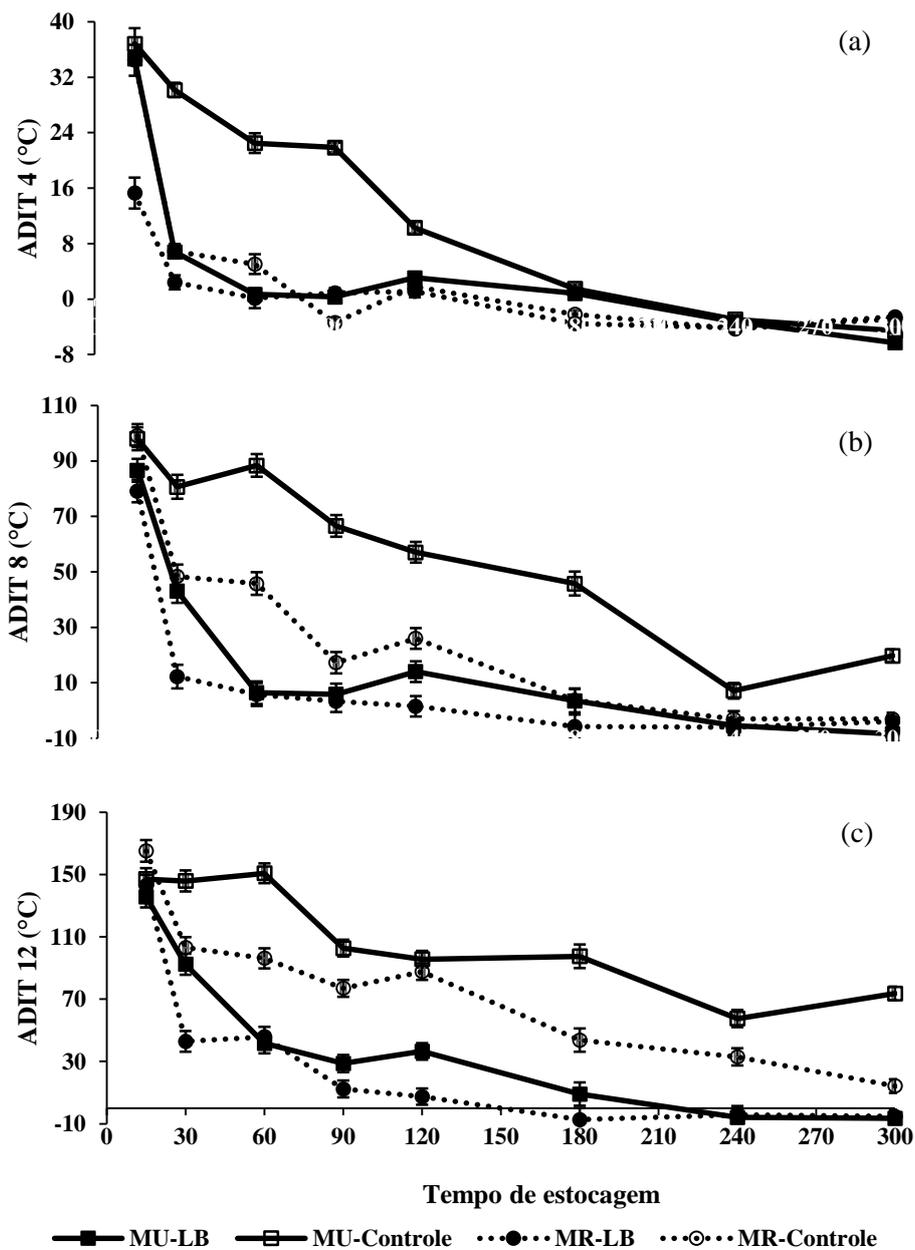


Figura 4. Soma das médias de diferença da temperatura dos silos e da temperatura ambiente nos 4 (ADIT4), 8 (ADIT4) e 12 (ADIT4) dias de exposição ao ar da silagem de milho grão úmido (MU) e silagem de milho reidratada (MR) ensiladas sem (Controle) e com (LB) o uso de *L. buchneri* (1×10^5 ufc por g de milho) em diferentes tempos de estocagem. (a) EPM = 0,95; Efeito de tipos de ensilagem (ENS), $P < 0,01$; efeito de inoculante (IN), $P < 0,01$; interação entre tipos de ensilagem e inoculante (ENS \times IN), $P < 0,01$; efeito de tempo de estocagem (T), $P < 0,01$; interação entre ENS \times T, $P < 0,01$; interação entre IN \times T, $P < 0,01$; interação entre ENS \times IN \times T, $P < 0,01$. (b) EPM = 3,68; Efeito de ENS, $P < 0,01$; efeito de IN, $P < 0,01$; interação entre ENS \times IN, $P < 0,01$; efeito de T, $P < 0,01$; interação entre ENS \times T, $P < 0,01$; interação entre IN \times T, $P < 0,01$; interação entre ENS \times IN \times T, $P < 0,01$. (c) EPM = 6,02; Efeito de ENS, $P < 0,01$; efeito de IN, $P < 0,01$; interação entre ENS \times IN, $P < 0,01$; efeito de T, $P < 0,01$; interação entre ENS \times T, $P < 0,01$; interação entre IN \times T, $P < 0,01$; interação entre ENS \times IN \times T, $P < 0,01$.

Degradabilidade in situ

Não houve diferença ($P > 0,05$) na degradabilidade *in situ* da MS com relação ao uso do inoculante, na interação entre tipo de ensilagem e inoculante, interação entre inoculante e tempo de estocagem e na interação tipo de ensilagem, inoculante e tempo de estocagem para as silagens incubadas com MPOrig por 12 horas, TMP2mm incubados por 12 horas, TMPOrig incubados por 24 horas e TMP2mm incubados por 24 horas. Houve diferença na degradabilidade *in situ* da MS para o tempo de estocagem ($P < 0,01$) em todas as formas de incubação testadas (TMPOrig incubadas por 12 e 24 horas e TMP2mm incubados por 12 e 24 horas), e entre tipos de ensilagem ($P < 0,05$) e interação entre tempo de estocagem e tipos de ensilagem ($P < 0,05$) para as silagens incubadas TMPOrig incubadas por 12 e 24 horas e TMP2mm incubados por 12 horas (Tabela 3).

A MR com TMPOrig incubadas por 12 horas teve maior degradabilidade da MS em comparação com MU na maior parte dos tempos de estocagem, enquanto a MR TMPOrig incubadas por 24 horas teve degradabilidade da MS maior que MU apenas nos períodos iniciais de estocagem (15 e 30 dias) e nos 120 dias. A degradabilidade da MS na MU com TMP2mm incubadas por 12 horas foi maior que a da MR nos tempos de estocagem de 15, 30 e 90 dias.

Devido à inexistência de diferenças ($P > 0,05$) na degradabilidade com o uso de inoculante e entre as silagens incubadas por 24 horas com TMP2mm, optou-se por testar os modelos ao efeito do tipo de ensilagem (MU e MR) com 12 horas de incubação (Figura 5), sendo testados com objetivo de estabelecer recomendações práticas para o tempo mínimo para estocagem dessas silagens os seguintes modelos: exponencial, logístico, *broken-line* (linear, platô), *broken-line* (linear, linear), *broken-line* (quadrático, linear). O melhor ajuste se deu ao modelo *broken-line* (linear, linear). A taxa de aumento da degradabilidade na MU com TMPOrig foi de 0,30 unidades percentuais/dia até os 71 dias de estocagem; após esse período,

o ganho em degradação foi de 0,03 unidades percentuais/dia. Já MR com TMPOrig apresentaram taxa de aumento na digestão de 0,23 unidades percentuais/dia até 52 dias de estocagem, 0,03 unidades percentuais após essa fase. Quando a avaliação foi realizada com TMP2mm, MU apresentou ganhos de 0,46 unidades percentuais/dia até 35 dias, caindo para 0,03 após esse período. Na MR com TMP2mm o incremento foi de 0,52 unidades percentuais até os 50 dias de estocagem e de 0,05 unidades percentuais posteriormente.

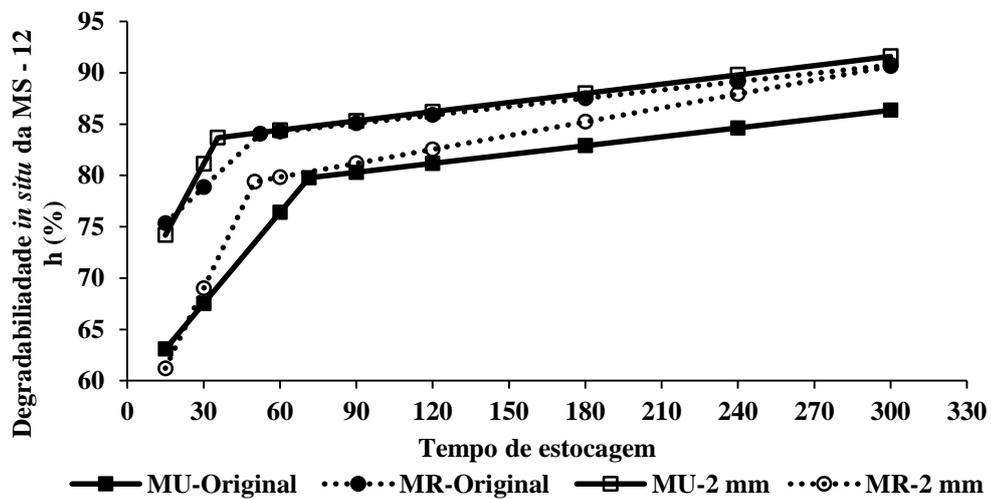


Figura 5. Degradabilidade *in situ* da MS da silagem de milho grão úmido (MU) e silagem de milho reidratada (MR) com dois tamanhos partícula em diferentes tempos de estocagem. Linhas demonstram os valores previstos pelo modelo *broken-line* (linear, linear) para incubação por 12 horas.

Tabela 3. Degradabilidade *in situ* da silagem de milho grão úmido (MU) e silagem de milho reidratada (MR) ensiladas sem (Controle) e com (LB) o uso de *L. buchneri* (1×10^5 ufc por g de milho) com dois tamanhos de partícula em diferentes tempos de estocagem

Itens	Tempos de estocagem								EPM	Ens	In	Ens×In	T	Ens×T	In×T	Ens×In×T
	15	30	60	90	120	180	240	300								
Tamanho de partícula original - 12 h de incubação																
MU	64,2 b	65,8 b	77,0 b	81,0 a	79,9 b	82,3 b	85,6 a	85,7 a	1,60	< 0,01	0,59	0,56	< 0,01	< 0,01	0,19	0,78
MR	75,3 a	78,9 a	82,8 a	85,1 a	87,2 a	88,0 a	89,2 a	90,0 a								
Tamanho de partícula de 2 mm - 12 h de incubação																
MU	74,2 a	81,1 a	83,4 a	86,6 a	88,0 a	88,9 a	89,4 a	89,4 a	1,69	0,02	0,30	0,86	< 0,01	0,04	0,96	0,40
MR	61,2 b	69,0 b	76,3 a	81,6 b	85,0 a	88,1 a	87,8 a	88,7 a								
Tamanho de partícula original - 24 h de incubação																
MU	78,4 b	76,4 b	83,4 a	86,3 a	84,2 b	86,5 a	89,1 a	89,2 a	1,54	0,04	0,95	0,90	< 0,01	< 0,01	0,47	0,18
MR	88,7 a	88,8 a	89,3 a	90,8 a	90,6 a	91,4 a	91,7 a	91,8 a								
Tamanho de partícula de 2 mm - 24 h de incubação																
MU	85,4	85,4	88,0	90,5	90,0	90,7	91,1	91,4	1,66	0,43	0,98	0,64	< 0,01	0,29	0,94	0,98
MR	80,4	84,0	85,5	87,6	89,0	90,2	90,7	90,9								

¹ENS= efeito de tipo de ensilagem; IN = efeito de inoculante; ENS×IN = interação entre tipo de ensilagem e inoculante; T = efeito de tempo de estocagem; ENS×T = interação entre tipo de ensilagem e tempo de estocagem; IN×T = interação entre inoculante e tempo de estocagem; ENS×IN×T = interação entre tipo de ensilagem, inoculante e tempo de estocagem. ^{a-b}Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, dentro do mesmo tamanho de partícula e do tempo de incubação.

DISCUSSÃO

Perfil fermentativo

O pH na MU LB foi mais alto durante os dias de estocagem devido à menor concentração de ácido láctico presente nessas silagens. Em contrapartida, MU Controle apresentou menor valor de pH em função da maior concentração de ácido láctico, uma vez que o ácido láctico é o principal responsável pela acidificação das silagens. A MR, além de ter maior teor de ácido láctico e menor valor de pH, apresenta maior concentração de compostos voláteis, sendo 16,6% maior em relação ao MU, o que indica que a MR fermentou mais que a MU.

As silagens inoculadas com *L. buchneri* (MU LB e MR LB) apresentaram menor concentração de ácido láctico, maior de 1,2-propanodiol e numericamente maior concentração de ácido acético. O uso do inoculante *L. buchneri* modificou o perfil fermentativo das silagens, uma vez que ao fermentar açúcares gerou, além do ácido láctico, outros produtos de fermentação como o ácido acético. Diferentemente de outras BAL do grupo das heterofermentativas obrigatórias, o *L. buchneri* não produz etanol por não ter a enzima acetaldeído desidrogenase, o que impede a redução do acetaldeído em etanol (McDonald et al., 1991), o que aumenta a produção de ácido acético. O aumento de 1,2-propanodiol e a redução do ácido láctico na MU LB e MR LB são justificados também por um mecanismo de autoproteção do *L. buchneri* a redução do pH gerada pelo ácido láctico, em que o *L. buchneri* produz em anaerobiose, pela rota de degradação do ácido láctico, ácido acético e 1,2-propanodiol (Oude Elferink et al., 2001). Esse processo permite a sobrevivência desse microrganismo por mais tempo. Pode ser observado neste estudo que, com o uso de LB a contagem de BAL permaneceu alta na MU durante todo o período de estocagem e na MR até os 120 dias de estocagem. Esse mecanismo de proteção por algum motivo parou de funcionar na MR LB aos

180 dias de ensilagem. Os teores de ácido láctico caíram com uma maior intensidade na MU LB (2,29; 1,25 e 1,24 g por kg de MS) em relação à MR LB (2,46; 2,23 e 2,04 g por kg de MS) aos 30, 60 e 180 dias de estocagem, respectivamente, o que reflete em aumento de pH na MU LB e manutenção do pH na MR LB. Já o acúmulo de ácido acético foi maior na MR LB (0,69; 1,00 e 1,56 g por kg de MS) em comparação com a MU LB (0,65; 0,74 e 1,31 g por kg de MS); e a concentração de 1,2-propanodiol foi maior na MR LB (2,77; 5,98 e 11,06 g por kg de MS) em comparação com a MU LB (2,88; 4,64 e 8,96 g por kg de MS), aos 30, 60 e 180 dias de estocagem, respectivamente. Isso demonstra que os mecanismos de autoproteção do LB em ambientes com pH baixo continuam ativos, porém não foram suficientes para aumentar o pH das MR LB, o que provavelmente resultou na queda das BAL para essas silagens a partir dos 180 dias de estocagem.

Carvalho et al. (2015), ao estudarem a população bacteriana de silagem de milho grão colhido na linha do leite, silagem de milho grão úmido (milho colhido na linha negra) e silagem de milho reidratado (colhido seco), observaram maior proporção de sequências associadas ao gênero *Clostridium* para o milho reidratado e menor proporção de *Lactobacillus* na ensilagem e aos 120 dias de estocagem. Isso refletiu em alta associação dessas silagens com produtos do metabolismo de *Clostridium*, como o ácido butírico. Tais fatos são atribuídos ao maior estresse no campo, processo de secagem e moagem sofrido pelos grãos de milho, o que comprometeria a qualidade higiênica das silagens e a própria capacidade fermentativa de grão de milho reidratado. Contudo, neste estudo não foi observado qualquer comprometimento da capacidade fermentativa; ao contrário, a MR fermentou mais que a MU, e as concentrações iniciais de BAL estão dentro de padrões normais para MU (Kung et al., 2014). A concentração de ácido butírico é uma medida indireta da presença de *Clostridium* (Pahlow et al., 2003). A concentração de ácido butírico na MR LB, MR Controle e MU LB permaneceu abaixo de 0,01 g por kg de MS,

enquanto MU Controle apresentou concentração abaixo de 0,05 g por kg de MS. Portanto a MR, bem como as demais, não tiveram indícios relevantes da presença de *Clostridium*.

A fermentação do 1,2-Propanodiol a ácido propiônico e 1-propanol pelo *Lactobacillus diolivorans*, sobre a qual são encontrados relatos na literatura (Krooneman et al., 2002), parece não ocorrer no presentes trabalho, já que a quantidade de 1,2-propanodiol é alta para as silagens inoculadas com LB em relação ao Controle, mas a concentração de 1-propanol, apesar de mais alta nas silagens com LB, é pouco expressiva (< 0,01 g por kg de MS). Isso demonstra a baixa ação das bactérias *Lactobacillus diolivorans*. O ácido propiônico é influenciado pelo tipo de ensilagem, sendo maior na MR (14,6 mg por kg de MS) em relação à MU (22,3 mg por kg de MS), embora sua concentração seja baixa.

A MR Controle apresentou maior contagem de leveduras nos tempos de estocagem e foram as únicas que tiveram contagem acima do nível de detecção em todos os tempos de estocagem. Portanto a maior produção de etanol apresentada pela MR Controle é consequência da maior presença dessas leveduras, uma vez que o etanol é um dos compostos produzidos por leveduras pelo processo fermentativo em ambientes anaeróbios (Rooke e Hatfield, 2003).

Estabilidade aeróbia

A concentração de ácido acético foi maior nas silagens de milho inoculadas com LB em relação à silagem Controle e na MR em relação à MU. O ácido acético apresenta características antifúngicas (Kleinschmit et al., 2005; Tabacco et al., 2011), pela sua capacidade de entrar de forma passiva na célula dos fungos, dissociar-se no meio intracelular liberando H⁺ que acidifica o meio, levando a célula a um desbalanço iônico que reduz sua capacidade de multiplicação e até a morte (Lambert e Stratford, 1999). Com isso, as silagens inoculadas com LB apresentaram redução na contagem de leveduras aos 30 dias de estocagem, permanecendo abaixo do nível de

detecção a partir de 60 dias; e a MR apresentou menor contagem de fungos. Tudo isso devido à maior concentração de ácido acético nessas silagens, o que refletiu em maior estabilidade aeróbia na MR LB e MU LB em relação à MR Controle e MU Controle, e à MR Controle em comparação com MU Controle, uma vez que esses microrganismos fazem parte do principal grupo responsável por iniciar o processo de deterioração aeróbica (Pahlow et al., 2003). Naturalmente a estabilidade aeróbia das silagens de grão úmido e de milho reidratado aumentam com o tempo de estocagem, porém as diferenças entre os tratamentos ficaram maiores ao longo do tempo de estocagem. Outros indicativos da estabilidade aeróbia das silagens, como pico de temperatura e ADIT 4, 8 e 12, também refletem essa maior concentração de ácido acético. O pico de temperatura foi menor na MR LB e MU LB em relação à MR Controle e MU Controle. Nos quatro primeiros dias de exposição ao ar, o ADIT foi maior na MU Controle até os 120 dias de estocagem. Já nos 8 dias de exposição ao ar, o ADIT foi maior na MU Controle em todo o período de estocagem. Ao final de 12 dias de exposição ao ar, o ADIT foi maior na MU Controle e MR Controle em todo o período de estocagem. Portanto a inoculação de silagens com LB em comparação com as silagens não inoculadas reduz o crescimento de leveduras e fungos filamentosos mesmo com 12 dias de exposição ao ar, o que reflete em baixo acréscimo nas temperaturas das silagens.

Degradabilidade in situ

Durante a ensilagem de grãos de milho úmido ocorre o processo de proteólise pela ação de enzimas proteolíticas do próprio grão e dos microrganismos presentes, transformando proteínas e aminoácidos livres em $N-NH_3$. Esse processo é mais concentrado no início do processo de ensilagem, embora continue durante o armazenamento, porém com declínio das taxas de proteólise (Buchanan-Smith et al., 2003). Hoffman et al. (2011) observaram um

aumento constante dos teores de N-NH₃ em silagens de grão úmido de milho com o tempo de estocagem, sendo que para os dois híbridos estudados o uso do inoculantes *L. buchneri* aumentou os teores de N-NH₃. O mesmo comportamento foi encontrado por Kung et al. (2014), porém nesse caso as silagens foram inoculadas com proteases. Resultados semelhantes ao do presente estudo, no qual também foi observado aumento na concentração de N-NH₃ ao longo de todo o tempo de estocagem, sendo maior para a silagens inoculadas com LB.

Os grãos de amido do milho são recobertos por uma matriz proteica rica em zeína, nome dado à prolamina do milho. Essa matriz proteica é hidrofóbica, impedindo a digestão dos grãos de amido pelos microrganismos do rúmen (Owens et al., 1986). Durante o processo de ensilagem, a prolamina pode ser solubilizada pelos ácidos advindos do processo fermentativo, como o ácido lático e ácido acético (Lawton, 2002), e degradada pela ação de enzimas da planta e das proteases dos microrganismos (Vierstra, 1996). Esse trabalho mostrou redução dos teores de prolamina com o tempo de estocagem para todas as silagens, sendo que a MU LB apresentou o menor teor de prolamina a partir do 120 dias de estocagem, enquanto os teores de prolamina foram maiores na MU Controle dos 15 aos 60 dias de estocagem, mantendo-se alta nos demais dias, mas com valor próximo da MR LB e MR Controle. A maior queda dos teores de prolamina na MU LB pode estar associada ao uso do inoculante bacteriano que modifica o perfil da população de bactérias do silo, aumentando a concentração de BAL em todos os tempos de estocagem. Contudo, a queda nos teores de prolamina foi menos intensa na MR LB em comparação com MU LB. Apesar da MR ter sido inoculada com a mesma concentração de LB que a MU, aos 180 dias de ensilagem houve grande redução na contagem de BAL, o que pode ter reduzido a intensidade de queda na prolamina. A atividade proteolítica das bactérias tem sido apontada como o maior mecanismo de degradação de proteína nas silagens de milho reidratado, quando comparada com enzimas de fungos, enzimas do milho e solubilização por

produtos da fermentação (Junges et al., 2015). Contudo, não foi observado efeito do uso de inoculantes na degradabilidade *in situ* da MS das silagens incubadas com 12 e 24 horas, embora a prolamina tenha sido reduzida na MU LB.

A degradabilidade *in situ* da MS foi influenciada principalmente pelo tipo de ensilagem. O serem incubadas as silagens secas com TMPOrig, MR apresentou maior degradabilidade que MU com 12 e 24 horas de incubação. Já a incubação realizada com TMP2mm, com o objetivo de padronizar o tamanho de partícula, MU apresentou maior degradabilidade que MR com 12 horas de incubação e não apresentou diferenças com 24 horas de incubação. Essa inversão do resultado está ligada ao maior tamanho de partícula da MU. Mesmo a prolamina sendo baixa na MU LB, não houve reflexo disso na degradabilidade da MU incubada com TMPOrig. Com 24 horas de incubação, a degradabilidade da MU com TMPOrig apresentou degradação inferior à MR com TMPOrig, demonstrando uma resistência maior da MU à digestão, mesmo em tempos prolongados de incubação devido ao maior tamanho de partículas. A quebra da matriz proteica é um fator determinante para o aumento da degradabilidade ruminal dos grãos de amido, embora não seja o único fator que determine isso. A facilidade de acesso aos grânulos de amido e a colonização pelas bactérias ruminais, que levam ao aumento da digestão, é determinada também pelo tamanho médio de partícula do alimento (Engel et al., 2014). A redução do tamanho de partícula gerada pela moagem da MR aumentou a superfície de contato para as bactérias do rúmen, resultando em maior degradabilidade *in situ* dessa silagem. Ao se padronizado o tamanho de partícula para 2 mm o efeito da quebra na matriz proteica é mais relevante, e a MU apresenta maior degradabilidade *in situ* da MS que a MR, não existindo diferença de degradabilidade em tempos mais prolongados de incubação (24 horas). Ao se levar em consideração as diferenças nos tamanhos de partícula da MR e MU, recomenda-se que, para maximizar os efeitos da quebra da matriz proteica, as silagens fiquem armazenadas por 52 e 71

dias, respectivamente. Como há a redução do tamanho de partículas dos alimentos durante a mastigação por parte do animal, seria importante estudar os efeitos das ensilagens sobre a degradação da matriz proteica e seus efeitos sobre a digestibilidade da MR e da MU, em função das diferenças no tamanho de partícula das silagens e das mudanças que ele ainda podem sofrer durante a mastigação com o estudo da digestibilidade *in vivo*.

CONCLUSÃO

A silagem de milho reidratado é uma alternativa para o processamento dos grãos de milho, uma vez que apresenta bom perfil fermentativo. O uso de *L. buchneri* melhora a estabilidade aeróbia e o perfil microbiano das silagens de grão úmido ou reidratado. O tempo prolongado de estocagem, além de melhorar a estabilidade aeróbia das silagens, reduz a matriz proteica que recobre os grânulos de amido, aumentando a degradabilidade *in situ* das silagens de grão úmido ou reidratado. Porém ganhos altos de degradabilidade *in situ* acontecem nos 30 a 70 dias de estocagem.

REFERÊNCIAS

- Association of Official Analytical Chemist, AOAC. 1995. 16th. ed. Arlington: [AOAC], 1995.
- Basso, F. C., T. F. Bernardes, A. P. T. P. Roth, C. H. S. Rabelo, A. C. Ruggieri, and R. A. Reis. 2012. Fermentation and aerobic stability of high-moisture corn silages inoculated with different levels of *Lactobacillus buchneri*. R. Bras. Zootec. 41:2369-2373.
- Carvalho, P. A., A. D. Bigaton, J. Fernandes, M. C. Santos, J. L. P. Daniel, A. P. Duarte, L. G. Nussio. 2015. Shifts in bacterial population of high moisture corn silages and its correlation

with fermentation end-products. Pages 556-557 in Proc. XVIIth Int. Silage Conf. June 1-3. Piracicaba, SP, Brasil. ISSN 2175-4624.

Correa, C. S., R. D. Shaver, M. N. Pereira, J. G. Lauer, and K. Kohn. 2002. Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. *J. Dairy Sci.* 85:3008–3012.

Engel, C. L., V. L. Anderson, and C.S. Schauer. Effects of corn particle size and forage level on performance and carcass traits of yearling steers during finishing. On line:<https://www.ag.ndsu.edu/pubs/ansci/beef/AS1736-07.pdf>

Ferraretto, L. F., P. M. Crump, and R. D Shaver. 2013. Effect of cereal grain type and corn grain harvesting and processing methods on intake, digestion, and milk production by dairy cows through a meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 96:533–550.

Hall, M. B. 2000. Neutral detergent-soluble carbohydrates nutritional relevance and analysis. Gainesville: University of Florida, 42 p. (Bulletin, 339).

Hoffman, P. C., N. M. Esser, R. D. Shaver, W.K. Coblenz, M. P. Scott, A. L. Bodnar, R. J. Schmidt, and R. C. Charley. 2011. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. *J. Dairy Sci.* 94:2465–2474.

Junges, D., G. Morais, J. L. P. Daniel, M. H. F. Spoto, and L. G. Nussio. 2015. Contribution of proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. Pages 566-567 in Proc. XVIIth Int. Silage Conf. June 1-3. Piracicaba, SP, Brasil. ISSN 2175-4624.

Kleinschmit, D., R. J. Schmidt, L. Kung, Jr. 2005. The effects of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *J. Dairy Sci.* 88:2130–2139.

Krooneman, J., F. Faber, A. C. Alderkamp, S. J. H. W Oude Elferink, F. Driehuis, I. Cleenwerck, J. Swings, J. C. Gottschal, and M. Vancanneyt. 2002. *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:639-646.

- Kung, L., Jr., R. J. Schmidt, T. E. Ebling, and W. Hu. 2007. The Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the Fermentation and Aerobic Stability of Ground and Whole High-Moisture Corn. *J. Dairy Sci.* 90:2309–2314.
- Kung, L., Jr., M. C. Windle, and N. Walker. 2014. The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of high-moisture corn. *J. Dairy Sci.* 97 :1707–1712.
- Lambert, R. J., and M. Stratford. 1999. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *J. Appl. Microbiol.* 86:157–164.
- Lawton, J. W. Zein: A history of processing and use. *Cereal Chem.* 79:1–18, 2002.
- McDonald, P., A. R. Henderson, and S. J. E Heron. 1991. *The Biochemistry of Silage*. 2nd ed. Chalcombe Publ., Abersytwyth, U.K.
- Nellis, S. E., P. C. Hoffman, and R. D. Shaver. 2013. Technical note: A modified method to quantify prolamin proteins in dry and high-moisture corn. *J. Dairy Sci.* 96:4647-52.
- Nocek, J. E. 1988. *In Situ* and Other Methods to Estimate Ruminal Protein and Energy Digestibility: A Review. *J. Dairy Sci.* 71: 2051-2069.
- Noel, R. J., L. G. Hambleton. 1976. Collaborative study of a semiautomated method for determination of crude protein in animal feeds. *J. AOAC Int.* 59:134-140.
- Oude Elferink, S. J. W. H., J. Krooneman, J. C. Gottschal, S. F. Spoelstra, F. Faber, and F. Driehuis. 2001. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 125–132.
- Owens, F. N., R. A. Zinn, and Y. K. Kim. 1986. Limits to starch digestion in the ruminant small intestine. *J. Anim. Sci.* 63:1634–1648.
- Pahlow, G., R. E. Muck, F. Driehuis, S. J. W. H. Oude-Elferink, and S. F. Spoelstra. 2003. Microbiology of Ensiling. Pages 31-93 in *Silage Science and Technology*. Buxton, D.R., Muck, R.E., Harrison, J.H. (Eds.). American Society of Agronomy, Madison, WI.

- Philippeau, C., J. Landry, and B. Michalet-Doreau. 2000. Influence of the protein distribution of maize endosperm on ruminal starch degradability. *J. Sci. Food Agric.* 80:404–408.
- Pryce, J. D. 1969. A modification of the barker-summeson method for the determination of lactic acid. *Analyst*, 94:1151-1152.
- Ranjit, N. K., L. Kung, Jr. 2000. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *J. Dairy Sci.* 83:526-535.
- Rezende, A. V., C. H. S. Rabelo, R. M. Veiga, L. P. Andrade, C. J. Härterb, F. H. S. Rabelo, F. C. Basso, D. A. Nogueirad, and R. A. Reis. 2014. Rehydration of corn grain with acid whey improves the silage quality. *Anim. Feed Sci. Technol.* 197:213–221.
- Rooke, J. A., and R. D. Hatfield. 2003. Biochemistry of Ensiling. Pages 95-140 in *Silage Science and Technology*. Buxton, D. R., Muck, R. E., Harrison, J. H. (Eds.). American Society of Agronomy, Madison, WI.
- Sebastian, S, L. E. Phillip, V. Fellner, and E. S. Idziak. 1996. Comparative assessment of bacterial inoculation and propionic acid treatment on aerobic stability and microbial populations of ensiled high-moisture ear corn. *J. Anim. Sci.* 74:447-456.
- Silva, N. C., F. D. Resende, C. G. C. Marcolino, F. D. Santos, L. A. Santos, M. A. P. Alves, P. H. Gonçalves, G. R. Siqueira. 2014. Aerobic stability of reconstituted corn silage inoculated with different levels of *Lactobacillus buchneri* or *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*. Proc. 51st Annual Meeting of the Brazilian Society of Animal Science. July 29 to August 1. Barra dos Coqueiros, SE, Brazil.
- Tabacco, E., S. Piano, L. Cavallarin, T. F. Bernardes, and G. Borreani. 2009. Clostridia spore formation during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by

Lactobacillus buchneri and *Lactobacillus plantarum* inoculants. J. Appl. Microbiol. 107:632-1641.

Tabacco, E., S. Piano, A. Revello-Chion, G. Borreani. 2011. Effect of *Lactobacillus buchneri* LN4637 and *Lactobacillus buchneri* LN40177 on the aerobic stability, fermentation products, and microbial populations of corn silage under farm conditions. J. Dairy Sci. 94:5589–5598.

Vierstra, R. D. 1996. Proteolysis in plants: Mechanisms and functions. Plant Mol. Biol. 32:275–302.

Theurer, C. B., J. T. Huber, A. Delgado-Elorduy, R. Wanderley. 1999. Invited review: Summary of steam-flaking corn or sorghum grain for lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 82:1950–1959.

CAPÍTULO 4

O artigo a seguir está redigido conforme normas de publicação do *Journal of Animal Science* exceto o posicionamento das Tabelas e Figuras.

CAPÍTULO 4 – Desempenho e metabolismo de bovinos Nelore confinados consumindo silagens de milho grão úmido ou reidratado com e sem o uso de *L. buchneri*

RESUMO – Objetivou-se com este trabalho determinar os benefícios do processo da ensilagem do milho úmido ou reidratado com e sem o uso de *L. buchneri* em comparação com o uso de milho seco moído sobre o desempenho e parâmetros ruminais de bovinos Nelore confinados. Os tratamentos foram: milho seco moído (MSC), silagem de milho grão úmido sem inoculante (MU), silagem de milho grão úmido com inoculante *L. buchneri* (MUB; NCIMB 40788 concentração de 1×10^5 ufc por g de milho), silagem de milho reidratado sem inoculante (MR), silagem de milho reidratado com inoculante *L. buchneri* (MRB; NCIMB 40788 concentração de 1×10^5 ufc por g de milho), com inclusão de 62,6% na matéria seca da dieta. No *Experimento 1* foram utilizados animais canulados no rúmen e no duodeno em delineamento quadrado latino duplo (5 x 5), para avaliar os parâmetros ruminais e digestibilidade das dietas. No *Experimento 2* foram usados 180 bovinos Nelore em delineamento de blocos casualizados para avaliar o desempenho dos animais consumindo as dietas. Animais consumindo silagens apresentaram maior ($P < 0,05$) digestibilidade total da MS, MO e PB, concentração de propionato e total de ácidos graxos de cadeia curta, além de menor ($P < 0,01$) CMS, conversão alimentar, pH ruminal e maior ($P < 0,01$) eficiência alimentar, ELM e ELG em relação aos animais consumindo MSC. Não houve ($P > 0,05$) diferença no balanço de N e produção de proteína microbiana. Animais consumindo MSC e silagem de MUB apresentaram maior GMD ($P = 0,09$), peso corporal final ($P = 0,08$), e peso de carcaça quente ($P = 0,06$) em relação aos consumindo MRB. Recomenda-se o uso de silagens de grãos por propiciar melhor aproveitamento da dieta. A silagem de grão de milho reidratado é uma alternativa a silagem de milho grão úmido. O uso do inoculante nas silagens não afeta os parâmetros metabólicos e o desempenho dos bovinos Nelore.

Palavras-chave: amido, digestibilidade *in vivo*, matriz proteica

INTRODUÇÃO

Com o objetivo de melhorar o desempenho e reduzir os custos com a alimentação, tem-se buscado o aumento da eficiência de utilização dos grãos de milho para alimentação de ruminantes, uma vez que esse é o grão mais utilizado e compõe a maior parte da energia das dietas (Vasconcelos e Galyean, 2007; Millen et al., 2009). Esse fato tem uma importância ainda maior para grãos de milho com alta vitreosidade do endosperma, por apresentarem menor degradabilidade *in vivo* e *in situ* do amido (Philippeau et al., 2000; Correa et al., 2002).

Uma técnica de processamento que tem apresentado bons resultados no aumento da digestibilidade do amido do milho e a ensilagem dos grãos de milho (Ferraretto et al., 2013). Durante o processo de ensilagem, a solubilização pelos ácidos produzidos na fermentação e a proteólise da matriz proteica por enzimas dos microrganismos e da própria planta reduzem a matriz proteica (Vierstra, 1996); em consequência, há maior digestibilidade ruminal do amido pelo aumento do acesso por parte dos microrganismos do rúmen aos grânulos de amido (Hoffman et al., 2011), melhorando a eficiência alimentar de bovinos de corte em terminação (Huck et al., 1998; Henrique et al., 2007; Corrigan et al., 2009). A prática da reidratação e ensilagem do grão seco pode ser uma alternativa para locais onde seja inviável o plantio do milho ou quando não é possível colher o grão com alta umidade, permitindo flexibilizar o sistema.

Um limitante para a ensilagem de milho grão úmido é o fato de estar propensa a deterioração aeróbia (Sebastian et al., 1996). O uso de inoculantes contendo cepas de bactérias heterofermentativas obrigatórias, particularmente o *L. buchneri*, tem aumentado a estabilidade

aeróbia das silagens de grão milho com alta umidade (Taylor e Kung, 2002). Entretanto pouco se conhece sobre o efeito da melhoria da qualidade das silagens inoculadas com *L. buchneri*, devido ao aumento da estabilidade, sobre o desempenho de bovinos confinados, bem como é em grande parte desconhecido o efeito da alimentação de bovinos Nelore confinados com silagem de milho reidratado. A hipótese desse trabalho era de que animais alimentados com silagens reduzissem o consumo de matéria seca em função do aumento da digestibilidade do amido, mantendo com isso ganhos de peso semelhantes e que para as silagens de milho com *L. buchneri*, os resultados fossem melhores pelo aumento da estabilidade aeróbia e qualidade higiênica das silagens.

Portanto o objetivo deste trabalho é determinar os benefícios do processo da ensilagem do milho úmido ou reidratado sobre a digestibilidade ruminal do amido. Avaliando o desempenho e os parâmetros ruminais de bovinos Nelore confinados, alimentados com estas silagens com e sem o uso de *L. buchneri* em comparação ao uso de milho seco moído.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantio, adubação e confecção dos silos

Os dois experimentos foram conduzidos no Polo Regional do Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios da Alta Mogiana, em Colina, São Paulo. O híbrido de milho utilizado foi o DKB 390 VT PRO 2TM (Dekalb, Uberlândia, MG, Brasil). Para o *Experimento 1* foram plantados 4 hectares em uma área com sistema de irrigação de pivô central previamente dessecada. A adubação de plantio foi de 380 kg por hectare de 8-28-16 e, de cobertura, 400 kg por hectare de 20-0-20. A ensilagem do milho úmido foi realizada nos mês de setembro de 2014 e a do milho seco em outubro de 2014. Para o *Experimento 2* foram plantados 45 hectares de

milho em uma área de sequeiro, previamente dessecada e gradeada. Foram aplicadas 2 t de calcário por hectare. A adubação de plantio foi de 467 kg por hectare de 8-28-16 e de cobertura 400 kg por hectare de 20-0-20 e 200 kg de sulfato de amônia. A ensilagem do milho úmido foi realizada nos mês de abril de 2015 e a do milho seco em maio de 2015.

Experimento 1

Foram utilizados 10 animais da raça Nelore, não castrados, com peso aproximado de 602 ± 94 kg, canulados no rúmen e no duodeno. Os animais foram mantidos em baias individuais (2 x 5 m), semicobertas com piso cimentado. Esses animais já se encontravam na instituição e sua cirurgia foi aprovada pelo comitê e Ética da FCAV/UNESP/Jaboticabal (número 20858/13). O experimento foi constituído por dois quadrados latinos 5×5 balanceados, usando-se como critério de blocagem o peso.

Forneceu-se por 15 dias uma dieta inicial de adaptação (Tabela 1). Após isso, iniciou-se o experimento, sendo cinco períodos de 21 dias cada. As dietas experimentais foram isoproteicas, variando apenas em relação às fontes de milho (Tabela 1), sendo: 1) milho seco moído (MSC); 2) silagem de milho grão úmido sem inoculante (MU); 3) silagem de milho grão úmido com inoculante *L. buchneri* (NCIMB 40788, Lallemand, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil) na concentração de 1×10^5 ufc por g de milho (MUB); 4) silagem de milho reidratado sem inoculante (MR); 5) silagem de milho reidratado com inoculante *L. buchneri* (NCIMB 40788, Lallemand, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil) na concentração de 1×10^5 ufc por g de milho (MRB). Foram confeccionados 4 mini silos trincheira com face de $0,70 \times 0,60$ m, com 11 m de comprimento. Os grãos de milho colhidos com alta umidade (Tabela 2) passaram pelo rolo laminador da embutidora (INGRAIN60, Marcher, Gravataí, RS, Brasil). Já, para os demais tratamentos, o milho foi colhido (18% de umidade) e levado a um secador comercial para

secagem (10,5% de umidade), posteriormente, moído em moinho de martelo (TN 9), o material foi colocado em vagão de mistura total com balança acoplada (Siltomac, modelo S-2.3, São Carlos, SP, Brasil) onde recebeu água à temperatura ambiente, com objetivo de atingir teor de umidade de 35 %, com mistura constante para garantir uniformização. A aplicação dos inoculantes foi realizada com bomba costal (2 L por tonelada), a compactação foi realizada por pisoteio e os silos cobertos com lona plástica dupla face e terra (Tabela 2). Outra parte do milho seco foi mantida para moagem no início do experimento.

A ração foi preparada diariamente e ofertada uma vez ao dia, pela manhã (7:30 horas). A dieta ofertada e as sobras foram pesadas diariamente para a determinação do consumo de MS. O consumo foi *ad libitum* e as sobras mantidas entre 1-3% durante a adaptação dentro de cada período. No período de colheita, os animais foram mantidos com consumo restrito a 95% do consumido na adaptação de cada período. Para ajuste da dieta, o teor de MS do bagaço de cana foi medido a cada dois dias, e das silagens de milho e demais ingredientes semanalmente.

A digestibilidade total da MS, matéria orgânica (MO), proteína bruta, e fibra em detergente neutro (FDN) e amido foram estimadas pela relação do consumido pelo excretado. Para isso foi realizada coleta total de fezes durante três dias, sendo congeladas 10% do total ao final de cada dia a -20°C. Ao final, amostras dos três dias foram homogêneas e separadas em 3 partes iguais para secagem em estufa de ventilação forçada a 55°C, sendo moídas em peneira com crivo de 1 mm e utilizadas para análise apenas uma das amostras secas. As amostras de sobras (quando houve) foram secas separadamente, conforme descrito para fezes, posteriormente, transformadas em uma amostra composta para moagem e análise. Também foi determinada a digestibilidade do amido através de duas equações propostas por Zinn et al. (2007); a primeira levou em consideração apenas a concentração de amido nas fezes e, a segunda além da concentração de amido foi usada a quantidade de N nas fezes e a porcentagem

de amido na dieta, sendo essa equação recomendada para dietas com digestibilidade do amido superiores a 95%. Nos mesmos dias da coleta de fezes também foi realizada a coleta total de urina, com auxílio de um aparato de coleta ligado a um balde plástico com tampa contendo 500 mL de ácido sulfúrico (20 %). Após a coleta diária, amostras de 10 mL de urina foram diluídas em 40 mL de H₂SO₄ 0,018 N e, posteriormente, congeladas a -20°C para determinação dos teores de alantoína e ácido úrico (Chizzotti et al., 2008) e 50 mL da urina concentrada foram armazenados para a determinação da quantidade de nitrogênio (N) total. A alantoína foi determinadas pelo método colorimétrico, conforme Fujihara et al. (1987), como descrito por Chen e Gomes (1992). O método calorimétrico também foi usado para determinar a concentração de ácido úrico na urina (Labtest Diagnostic S.A., Lagoa Santa, Brasil). Os derivados de purina (DP, mmol/dia) foram obtidos pela soma total da excreção de alantoína e ácido úrico, obtidos pela multiplicação das suas concentrações pelo volume total urinário diário. As purinas absorvidas (PA) foram estimadas pelos derivados de purinas totais (DP) pela fórmula $PA = [DP - (0,301 PC^{0,75})]/0,80$, onde PC é o peso corporal, $0,301 PC^{0,75}$ representa excreção endógena de DP e 0,80 é a recuperação de purinas absorvidas (Barbosa et al., 2011). A síntese de N microbiano (NMic) foi calculada pela PA usando-se a formula $NMic = [(70 \times PA)/(0,93 \times 1000 \times 0,137)]$, onde 70 representa a concentração de N nas purinas (mg/mmol), 0,93 é a digestibilidade das purinas e 0,137 taxa média de N-RNA pelo N-total para as bactérias isoladas no rúmen (Barbosa et al., 2011). O balanço dos compostos nitrogenados (BN) foi obtido no período de digestibilidade pela diferença entre o total de N ingerido e o total de N excretado nas fezes e na urina.

No último dia do período experimental, foi realizada a coleta de líquido ruminal nos tempos 0, 3, 6, 12 e 18 horas após a alimentação matinal. Essa alíquota foi destinada à determinação do pH ruminal, no momento da retirada, nitrogênio amoniacal, sendo para isso

separada uma alíquota de 50 mL, acondicionada em recipiente de plástico contendo 1,0 mL de H₂SO₄ (1:1), identificada e congelada a -20°C para posterior análise laboratorial e, para a determinação dos ácidos graxos de cadeia curta, foi utilizada uma amostra do conteúdo sem acidificação, e a análise foi feita por cromatografia gasosa (Erwin et al 1961). Uma amostra composta do fluido ruminal, dos cinco horários de coleta, foi utilizada para a determinação da contagem de protozoários, sendo a identificação e a quantificação dos gêneros de ciliados feita em câmara Sedgewick-Rafter, segundo Dehority (1984), com modificação da forma de coloração proposta por D'Agosto e Carneiro (1999).

Experimento 2

Foram utilizados 180 animais da raça Nelore, não castrados, com peso médio de 310±17 kg, divididos em 30 baias (4,15 m x 15 m) com 6 animais cada, sendo 6 baias por tratamento, usando-se como critério de blocagem o peso vivo. A adaptação foi de 35 dias, sendo fornecida, durante 30 dias a dieta da adaptação, e por mais 5 dias a dieta de adaptação (Tabela 1) de manhã e dieta final à tarde. No total, os animais foram confinados por 119 dias. A dieta era fornecida duas vezes ao dia (7:30 e 13:30 horas), em quantidades iguais, com sobra de 1-3%. As sobras eram retiradas e pesadas pela manhã para ajuste do fornecido e cálculo de consumo, e amostradas duas vezes por semana para determinação da MS. Foi realizada amostragem do bagaço de cana a cada dois dias e, dos ingredientes e silagens de milho, uma vez por semana para a determinação da MS.

A dieta e os tratamentos foram os mesmos do Experimento 1 (Tabela 1), contudo a forma de confecção dos silos foi diferente. As silagens de milho grão úmido foram feitas passando os grãos de milho colhidos úmidos pela quebradora de grãos da máquina embolsadora (INGRAIN60, Marcher, Gravataí, RS, Brasil) com imediata confecção dos silos. Para as silagens de MR, o milho seco (18 % de umidade) foi seco em secador comercial até atingir 14%

de umidade e moído em moinho de rolo e, posteriormente, foi colocado em um vagão de mistura total com balança acoplada (Siltomac) onde recebeu água à temperatura ambiente, com o objetivo de atingir teor de umidade de 35 % com mistura constante para garantir a uniformização do material. O material foi então ensilado em silos bag com o auxílio da máquina embutidora de grãos (Tabela 2). A aplicação dos inoculantes foi realizada com bomba acoplada à máquina embutidora com 3 L por tonelada de milho úmido ou reidratado.

Aos 108 dias de confinamento, foi feita uma coleta de fezes de 5 animais de cada baia. Uma amostra representativa do bolo fecal foi coletada logo após os animais defecarem, sendo feita uma amostra composta por baia. As fezes foram secas em estufa de ventilação forçada a 55° C por 72 horas e, posteriormente, moídas a 1 mm. Essas amostras foram usadas para a determinação da digestibilidade do amido Zinn et al. (2007), energia líquida de manutenção do milho ($EL_{m_{milho}}$) e energia líquida de ganho do milho ($EL_{g_{milho}}$), segundo as equações propostas por Zinn et al. (2007), sendo levada em consideração a concentração de amido nas fezes.

Ao final do período experimental, foi utilizado o ultrassom para a determinação da área de olho de lombo (AOL), AOL por 100 kg de PV, ratio, marmoreio, espessura de gordura subcutânea (EGS), EGS por 100 kg de PV e espessura de gordura na picanha. A pesagem final, assim como a inicial, foi realizada com jejum de sólidos e líquidos por 16 horas e, após a pesagem final, foi feito o embarque para o abate. O abate foi realizado em frigorífico comercial, na cidade de Barretos/SP, distante 20 km. Os animais foram abatidos seguindo as normas estabelecidas pelo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) editadas pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo obtido, em todos os animais, o peso de carcaça quente e de dois animais por baia, escolhidos por sorteio, o peso dos rins e da gordura renal pélvica e inguinal (GRPI).

Tabela 1. Inclusão dos ingredientes e análise da composição das dietas contendo milho seco moído (MSC), silagem de milho grão úmido (MU), silagem de milho grão úmido inoculado com *L. buchneri* (MUB; NCIMB 40788 na de 1×10^5 ufc/g), silagem de milho reidratado (MR), silagem de milho reidratado inoculado com *L. buchneri* (MRB; NCIMB 40788 na de 1×10^5 ufc/g) do *Experimento 1* e *Experimento 2*

Itens	MSC	MU	MUB	MR	MRB
Dieta de adaptação					
Ingredientes, %					
Bagaço de cana	20,9	20,9	20,9	20,9	20,9
Milho	47,4	47,4	47,4	47,4	47,4
Polpa cítrica	16,2	16,2	16,2	16,2	16,2
Farelo de amendoim	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0
Núcleo ¹	3,49	3,49	3,49	3,49	3,49
Análise da composição nutricional, %					
MO	93,2	93,4	93,4	93,4	93,4
PB	16,9	16,9	16,9	16,9	16,9
FDN	33,8	32,5	32,0	31,1	31,4
FDA	21,5	21,3	20,8	20,6	20,7
EE	2,65	3,02	2,94	2,82	2,72
CNF	43,3	44,4	44,9	45,9	45,8
Dieta final					
Ingredientes, %					
Bagaço de cana	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Milho	62,6	62,6	62,6	62,6	62,6
Polpa cítrica	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0
Farelo de amendoim	3,99	3,99	3,99	3,99	3,99
Núcleo ¹	3,99	3,99	3,99	3,99	3,99
Análise da composição nutricional, %					
MO	94,1	94,3	94,3	94,3	94,4
PB	14,4	14,6	14,7	14,7	14,6
FDN	26,0	24,3	23,7	22,6	22,9
FDA	15,4	15,0	14,4	14,1	14,2
EE	3,12	3,61	3,50	3,35	3,21
CNF	54,2	55,6	56,3	57,5	57,5

¹Níveis de garantia do núcleo: cálcio 99 g, cobalto 59 mg, cobre 453 mg, enxofre 31g, ferro 453 mg, fosforo 11,5 g, flúor 106 mg, magnésio 17,1 g, manganês 464 mg, selênio 6 mg, sódio 40 g, zinco 1495 mg, vitamina A 96770 UI, monensina sódica 493 mg, virginiamicina 641 mg. A ureia corresponde a 53,38% do núcleo.

A energia de ganho (EG, Mcal/dia) foi calculada pela equação $EG = GPD^{1.097} [0,0493 PC^{0.75}]$, onde PC é o peso corporal médio (NRC, 1984). A energia de manutenção (EM, Mcal/dia) foi calculada pela equação $EM = 0,077 PC^{0.75}$ (Lofgreen e Garrett, 1968). A energia líquida de ganho da dieta (ELg; Mcal/kg de MS) foi calculada em função da energia líquida de manutenção (ELm, Mcal/kg de MS) pela equação $ELg = 0,877 ELM - 0,41$ (Zinn e Shen, 1998) e a ELm da dieta foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$x = [-b \pm (b^2 - 4ac)^{0,5}] / 2c$$

Onde: $x = ELM$; $a = -0,41 \times EM$; $b = 0,877 \times EM + 0,41 \times CMS + EG$; $c = -0,877 \times CMS$ (Zinn e Shen, 1998).

Tabela 2. Perfil fermentativo, microbiano e estabilidade aeróbia da silagem de milho grão úmido (MU), silagem de milho grão úmido inoculado com *L. buchneri* (MUB; NCIMB 40788 na de 1×10^5 ufc/g), silagem de milho reidratado (MR), silagem de milho reidratado inoculado com *L. buchneri* (MRB; NCIMB 40788 na de 1×10^5 ufc/g) no *Experimento 1* e *Experimento 2*

Itens	MU	MUB	MR	MRB
<i>Experimento 1</i>				
Dias de estocagem	360		330	
pH	4,05 ±0,06	4,33 ±0,17	4,03 ±0,07	3,93 ±0,08
Nitrogênio amoniacal, % da MS	0,10 ±0,004	0,14 ±0,009	0,13 ±0,016	0,14 ±0,020
Ácido láctico, % da MS	2,96 ±0,86	2,04 ±0,84	3,16 ±0,53	3,81 ±0,40
Bactérias ácido lácticas, log ufc/g	4,86 ±1,00	4,42 ±1,06	5,50 ±1,12	4,93 ±0,39
Leveduras, log ufc/g	4,35 ±1,16	3,24 ±0,94	4,34 ±0,90	4,38 ±0,65
Fungos filamentosos, log ufc/g	1,36 ±0,57	0,60 ±0,9	2,06 ±1,36	1,71 ±0,70
Estabilidade aeróbia, h	55 ±66	239 ±85	5 ±9	118 ±147
<i>Experimento 2</i>				
Dias de estocagem	270		240	
pH	4,10 ±0,08	4,16 ±0,12	4,07 ±0,05	4,11 ±0,06
Nitrogênio amoniacal, % da MS	1,19 ±0,269	1,14 ±0,270	1,18 ±0,295	1,14 ±0,314
Ácido láctico, % da MS	2,43 ±0,28	2,28 ±0,26	2,84 ±0,25	2,82 ±0,33
Bactérias ácido lácticas, log ufc/g	2,67 ±2,04	1,66 ±1,60	1,43 ±1,63	1,80 ±1,4
Leveduras, log ufc/g	3,23 ±1,62	1,48 ±1,76	1,11 ±1,64	1,19 ±1,13
Fungos filamentosos, log ufc/g	1,15 ±1,67	0,45 ±1,00	1,02 ±1,43	0,67 ±0,96
Estabilidade aeróbia, h	39 ±59	162 ±105	29 ±24	216 ±84

Análises química-bromatológicas

As amostras obtidas (ingredientes da dieta, sobras e fezes) foram levadas à estufa de ventilação forçada a 55°C, por 72 horas para estimacão da MS (n° do método 934.01, AOAC, 1995) sendo moídas em moinho com peneira de crivo de 1 mm para posterior estimacão da proteína bruta (PB; n° do método 978.04; AOAC, 1995), extrato etéreo (EE; n° do método 920.39; AOAC, 1995), cinzas (MM, n° do método 942.05; AOAC, 1995), amido adaptado de Bach Knudsen et al. (1984), fibra em detergente neutro (FDN), segundo Mertens et al. (2002) sem adicão de sulfito de sódio, mas com adicão de amilase termoestável no detergente. Para a caracterizacão das silagens, foram determinados pH, nitrogênio amoniacal (N-NH₃; Noel e Hambleton, 1976) e ácido láctico (Pryce, 1969) obtidos por meio de extrato aquoso (1:10) com água destilada. O pH foi medido com potenciômetro (DM-22, Digimed, São Paulo, SP, Brasil). Também foi feita a caracterizacão microbiológica, pela contagem de BAL, fungos filamentosos e leveduras, e do perfil de estabilidade aeróbia (Tabacco et al., 2009).

Análises estatísticas

O *Experimento 1* foi constituído em um quadrado latino, e as variáveis analisadas uma vez em cada período pelo modelo: $Y_{ijkl} = \mu + Q_i + A_j(i) + P_k + M_l + e_{ijkl}$. Em que μ = média geral; Q_i = efeito de quadrado ($i = 1$ ou 2); $A_j(i)$ = efeito de animal aninhado em quadrado ($j = 1$ a 10); P_k = efeito de período ($k = 1$ a 5); M_l = efeito de tratamento ($l = MU, MUB, MR, MRB$ e MSC); e_{ijkl} = erro experimental. Os dados obtidos ao longo do tempo (amônia, pH ruminais e ácidos graxos voláteis) foram analisados como medidas repetidas sendo acrescentados os efeitos de tempo (0, 3, 6, 12 e 18 h) e a interaçã entre tempo e tratamento. As matrizes para cada variável foram escolhidas de acordo com o critério BIC (Bayesian Information Criteria). O *Experimento 2* foi constituído de um delineamento em blocos casualizados, e as variáveis foram

analisadas pelo modelo: $Y_{ij} = \mu + M_i + B_j + e_{ij}$. Em que μ = média geral; M_i = efeito de tratamento ($i = MU, MUB, MR, MRB$ e MSC); B_j = efeito do bloco ($j = 1$ a 6); e_{ij} = erro experimental. As variáveis foram analisadas pelo procedimento MIXED do SAS (2000), e as médias foram comparadas pelo teste t a 10% de probabilidade de erro.

RESULTADOS

Experimento 1

Os animais que consumiram as silagens de milho (MU, MUB, MR e MRB) apresentaram menor CMS ($P = 0,02$) durante os dias de coleta de fezes em relação ao animais consumindo MSC (Tabela 3). As digestibilidades da MS, MO e PB foram maiores ($P < 0,05$) para os animais consumindo silagens, em média 5,7; 5,2 e 5,0 % respectivamente, em relação àqueles que consumiram MSC. Não houve diferença ($P = 0,69$) entre as dietas na digestibilidade do FDN. Independentemente da forma com que foi calculada, por coleta total de fezes ou equações, a digestibilidade do amido foi sempre maior ($P < 0,01$) para os animais que consumiram silagens em comparação com àqueles que consumiram MSC. O consumo das diferentes dietas não alterou ($P > 0,10$) o balanço de N, a eficiência no uso de N, a produção de purinas totais e de proteína microbiana no rúmen (Tabela 4).

Houve interação entre pH e horas após a alimentação ($P < 0,01$). O pH do conteúdo ruminal foi maior nos animais que consumiram MSC (Figura 1), sendo o menor valor de pH observado às 12 horas após a alimentação; já nos animais alimentados com as silagens, os menores valores de pH foram observados às 6 horas. Houve interação entre os valores de N-NH₃ e horas após o consumo (Figura 1). Os animais alimentados com MSC apresentaram maiores valores de N-NH₃, às 3 e 6 horas após a alimentação, sendo superior aos teores de N-

NH₃ do conteúdo ruminal dos animais consumindo silagens. A dieta que continha MU apresentou menores valores de N-NH₃ que MSC e MUB, 3 horas após a alimentação e que todos os outros tratamento 6 horas após a alimentação.

Tabela 3. Consumo e digestibilidade de bovinos Nelore terminados em confinamento alimentados com milho grão seco moído (MSC), silagem de milho grão úmido (MU), silagem de milho grão úmido inoculado com *L. buchneri* (MUB; NCIMB 40788 na de 1×10^5 ufc/g), silagem de milho reidratado (MR), silagem de milho reidratado inoculado com *L. buchneri* (MRB; NCIMB 40788 na de 1×10^5 ufc/g)

Itens	MSC	MU	MUB	MR	MRB	EPM	P - valor
CMS, kg/dia	6,90 a	6,41 b	6,20 b	6,39 b	6,50 b	0,35	0,02
Digestibilidade da MS, %	76,4 b	80,6 a	81,2 a	81,0 a	80,3 a	0,92	0,01
Digestibilidade da MO, %	79,1 b	83,2 a	83,7 a	83,5 a	82,7 a	0,80	< 0,01
Digestibilidade da PB, %	77,4 b	80,1 a	81,9 a	82,3 a	80,6 a	1,22	0,03
Digestibilidade da FDN, %	56,6	60,3	60,1	57,4	58,1	2,33	0,69
Digestibilidade do amido ¹ , %	96,1 b	99,8 a	99,7 a	99,0 a	99,8 a	0,32	< 0,01
DGA ² , % do ingerido	95,1 b	99,6 a	99,8 a	99,8 a	99,7 a	0,48	< 0,01
DGA ³ , %	95,8 b	99,6 a	99,7 a	99,8 a	99,7 a	0,34	< 0,01

¹Digestibilidade no trato digestivo total calculada pela diferença do ingerido com o excretado de amido, dividido pelo ingerido; ²DGA = digestibilidade do amido em função da % do ingerido, calculado pela equação $DGA, \% \text{ do ingerido} = 100 \times \{1 - [(0,938 - 0,497 \times NF + 0,0853 \times NF^2) \times AF/AD]\}$, onde NF é a % de N fecal, AF é % de amido nas fezes e AD é a % do amido na dieta (Zinn et al., 2007); ³DGA = digestibilidade do amido, calculado pela equação $DGA, \% = 99,9 - 0,413 \times AF - 0,0131 \times AF^2$, onde AF é % de amido nas fezes (Zinn et al., 2007); Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste t.

Não houve interação ($P > 0,10$) entre os tratamentos e horas após a alimentação na concentração de ácidos do conteúdo ruminal, com exceção da relação entre acetato/propionato (A/P; $P = 0,02$). Os animais alimentados com MSC apresentaram maior razão A/P, antes do trato em relação aos demais, não diferindo das silagens de MU e MUB nos demais horários (Figura 1). Em geral, MR e MRB apresentaram menor razão A/P em relação aos demais tratamentos em todos os horários. Os animais alimentados com MSC apresentaram menor concentração de propionato ($P = 0,02$) em relação ao MU, MR e MRB, e menor concentração de valerato ($P = 0,03$) em relação as silagens de MU e MR (Tabela 5). Não houve diferenças

na concentração de acetato ($P = 0,27$), butirato ($P = 0,35$) e isovalerato ($P = 0,24$) entre os tratamentos.

Tabela 4. Balanço de N e produção de proteína microbiana de bovinos Nelore terminados em confinamento alimentados com milho grão seco moído (MSC), silagem de milho grão úmido (MU), silagem de milho grão úmido inoculado com *L. buchneri* (MUB; NCIMB 40788 na de 1×10^5 ufc/g), silagem de milho reidratado (MR), silagem de milho reidratado inoculado com *L. buchneri* (MRB; NCIMB 40788 na de 1×10^5 ufc/g)

Itens	MSC	MU	MUB	MR	MRB	EPM	<i>P</i> - valor
Balanço de N, g/dia	51,8	47,0	46,0	50,5	58,0	6,89	0,46
Eficiência de N, %	40,3	37,9	38,6	38,8	44,7	3,91	0,53
Excreção de derivados de purinas totais, mmol/L	99,0	113	107	108	103	12,0	0,76
Proteína microbiana, g/dia	268	327	303	308	290	50,6	0,76

Não houve diferença ($P > 0,10$) na contagem de protozoários no conteúdo ruminal, com exceção do Eremoplastron (Tabela 6), que apresentou maior população nos animais alimentados com MSC ($P = 0,05$).

Tabela 5. Ácidos graxos de cadeia curta (mmol/L) do rúmen de bovinos Nelore terminados em confinamento alimentados com milho grão seco moído (MSC), silagem de milho grão úmido (MU), silagem de milho grão úmido inoculado com *L. buchneri* (MUB; NCIMB 40788 na de 1×10^5 ufc/g), silagem de milho reidratado (MR), silagem de milho reidratado inoculado com *L. buchneri* (MRB; NCIMB 40788 na de 1×10^5 ufc/g)

Itens	MSC	MU	MUB	MR	MRB	EPM	<i>P</i> - valor ¹		
							Trat	H	Trat×H
Acetato	59,6	62,4	58,0	62,3	62,3	2,13	0,27	< 0,01	0,27
Propionato	19,9 c	23,9 ab	21,6 bc	26,3 a	26,8 a	2,60	0,02	< 0,01	0,45
Butirato	10,6	13,4	12,4	12,8	12,5	1,17	0,35	< 0,01	0,61
Valerato	1,78 a	2,13 b	1,91 ab	2,29 b	2,04 ab	0,14	0,03	< 0,01	0,31
Isovalerato	2,58	2,23	2,15	2,21	2,18	0,17	0,24	0,97	0,78
Total	94,5 b	104 a	96,4 b	106 a	106 a	4,19	< 0,01	< 0,01	0,24

¹Trat = efeito de tratamento, H = efeito de horários de colheita após o trato; Trat×H = efeito da interação entre tratamento e horários de colheita após o trato. Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste t.

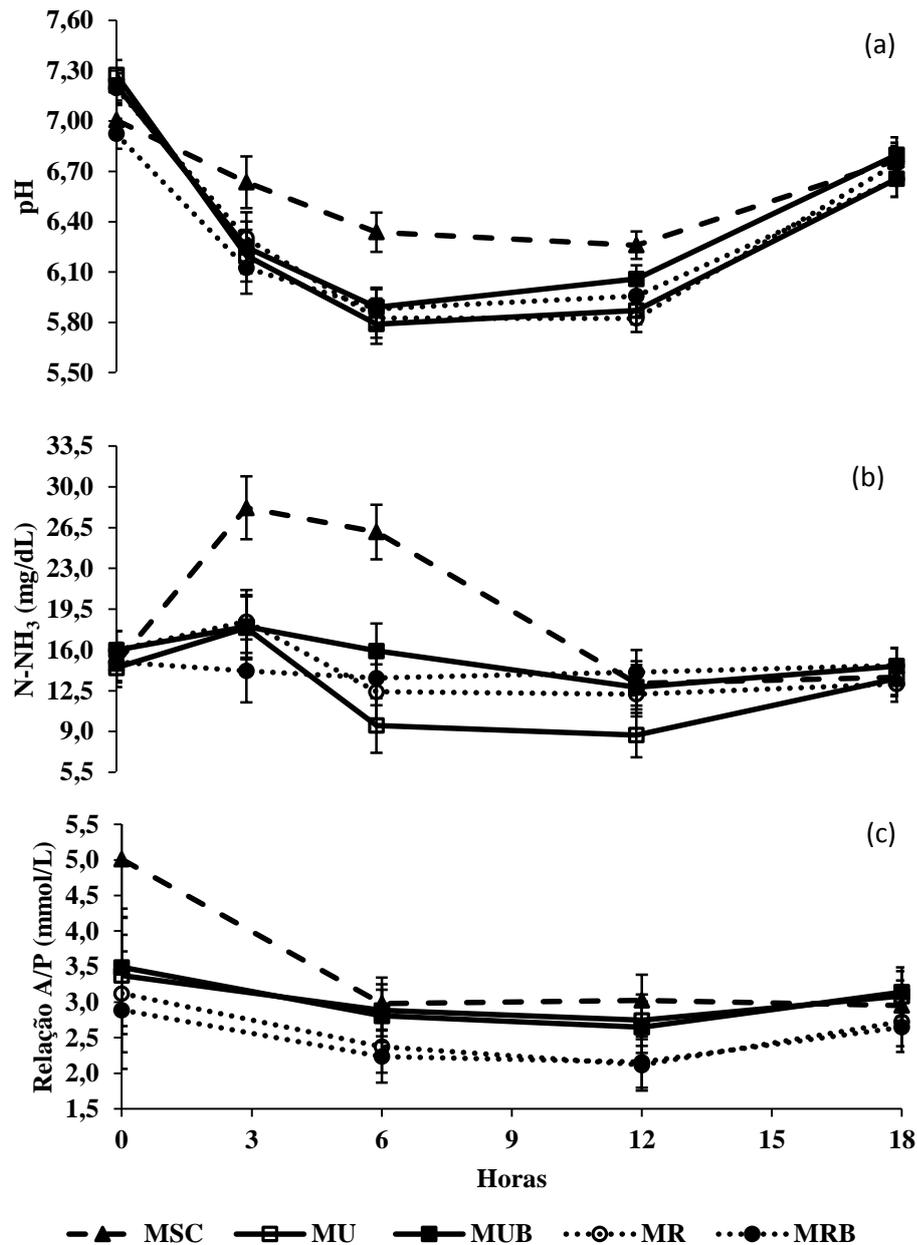


Figura 1. pH (a), nitrogênio amoniacal (N-NH₃) (b) e razão acetato/propionato (A/P) (c) no rúmen de bovinos Nelore terminados em confinamento alimentados com milho grão seco moído (MSC), silagem de milho grão úmido (MU), silagem de milho grão úmido inoculado com *L. buchneri* (MUB; NCIMB 40788 na dose de 1×10^5 ufc/g), silagem de milho reidratado (MR), silagem de milho reidratado inoculado com *L. buchneri* (MRB; NCIMB 40788 na dose de 1×10^5 ufc/g). (a) EPM = 0,11. Efeito de tratamento, $P = 0,02$; efeito de horários de colheita após o trato, $P < 0,01$; efeito da interação entre tratamento e horários de colheita após o trato, $P < 0,01$. (b) EPM = 2,02. Efeito de tratamento, $P < 0,01$; efeito de horários de colheita após o trato, $P < 0,01$; efeito da interação entre tratamento e horários de colheita após o trato, $P = 0,01$. (c) EPM = 0,48. Efeito de tratamento, $P = 0,02$; efeito de horas de coleta após o trato, $P < 0,01$; efeito da interação entre tratamento e horários de colheita após o trato, $P < 0,01$.

Tabela 6. Contagem (log) de protozoários por mililitro de conteúdo ruminal de bovinos Nelore terminados em confinamento alimentados com milho grão seco moído (MSC), silagem de milho grão úmido (MU), silagem de milho com alta umidade inoculado com *L. buchneri* (MUB; NCIMB 40788 na de 1×10^5 ufc/g), silagem de milho reidratado (MR), silagem de milho reidratado inoculado com *L. buchneri* (MRB; NCIMB 40788 na de 1×10^5 ufc/g)

Itens	MSC	MU	MUB	MR	MRB	EPM	<i>P</i> -valor
Total de protozoários	6,12	5,91	5,86	5,97	6,12	0,17	0,33
Entodinium	6,02	5,85	5,83	5,96	6,11	0,20	0,52
Dasytricha	1,53	1,05	1,19	0,70	0,70	0,57	0,71
Isotricha	3,93	4,14	4,03	4,09	3,98	0,12	0,53
Metadinium	0,38	0,35	0,35	0,35	0,35	0,37	1,00
Eremoplastron	1,24	0,00	0,00	0,45	0,00	0,35	0,05
Eudiplodinium	1,75	0,79	0,78	1,10	1,50	0,66	0,49
Polyplastron	1,14	1,01	1,19	1,58	0,75	0,58	0,89
Epidinium	0,82	1,25	0,73	0,76	0,45	0,53	0,18
Elytroplastron	1,80	1,55	0,79	1,57	1,46	0,65	0,54

Experimento 2

O CMS foi menor ($P < 0,01$) para os animais que consumiram silagem em comparação aos que consumiram MSC (Tabela 7). A redução no consumo dos animais que receberam silagens iniciou-se próximo aos 13 dias de confinamento, permanecendo durante todo o tempo de confinamento (Figura 2). Entre as silagens, o CMS dos animais consumindo dietas com MU e MUB foi maior que àqueles que se alimentados com MR e MRB. Animais que consumiram MSC e silagem de MUB apresentaram maiores GMD ($P = 0,09$), peso corporal final ($P = 0,08$), e peso de carcaça quente ($P = 0,06$) em relação àqueles que se alimentaram com MRB. Animais consumindo MSC apresentaram maior conversão alimentar ($P < 0,01$) e menor eficiência alimentar ($P < 0,01$) em relação aos demais tratamentos.

A digestibilidade do amido calculado pela concentração de amido fecal foi maior ($P < 0,01$) para os animais consumindo dietas contendo MU, MUB, MR e MRB em comparação com as dietas que continham MSC (Figura 3) nas duas equações. Os animais consumindo MR apresentaram maior ($P < 0,01$) ELM e Elg da dieta em comparação com àqueles que

consumiram MU e MSC, quando as equações levaram em consideração o CMS, GPD e PC, e maior ($P < 0,01$) ELm_{milho} e Elg_{milho} que MUB e MSC, quando as equações levaram em consideração a concentração de amido fecal (Tabela 8). As dietas contendo MSC apresentaram menor ($P < 0,01$) ELm e Elg da dieta e menor ($P < 0,01$) ELm_{milho} e Elg_{milho} em comparação com as dietas que continham silagem.

Tabela 7. Desempenho e características da carcaça de bovinos Nelore terminados em confinamento alimentados com milho grão seco moído (MSC), silagem de milho grão úmido (MU), silagem de milho grão úmido inoculado com *L. buchneri* (MUB; NCIMB 40788 na de 1×10^5 ufc/g), silagem de milho reidratado (MR), silagem de milho reidratado inoculado com *L. buchneri* (MRB; NCIMB 40788 na de 1×10^5 ufc/g)

Variáveis	MSC	MU	MUB	MR	MRB	EPM	P - valor
CMS, kg/dia	9,81 a	7,88 b	7,89 b	7,34 c	7,32 c	0,24	< 0,01
PC inicial, kg	311	310	310	311	310	7,26	0,24
PC final, kg	514 a	505 ab	510 a	505 ab	493 b	7,17	0,08
PCQ, kg	290 a	282 ab	286 a	282 ab	275 b	6,49	0,06
GMD, kg	1,73 a	1,66 ab	1,69 a	1,64 ab	1,55 b	0,05	0,09
RC, %	56,3	55,9	56,2	56,0	55,9	0,31	0,84
CA, kg	5,70 a	4,76 b	4,67 bc	4,48 c	4,72 bc	0,12	< 0,01
EA	0,176 c	0,211 b	0,215 ab	0,224 a	0,213 ab	0,005	< 0,01
AOL, cm ²	76,0 b	75,5 b	78,0 a	79,6 a	75,3 b	2,60	< 0,01
AOL, cm ² /100 kg PC	15,0 b	15,2 b	15,5 b	16,2 a	15,5 b	0,34	0,02
RATIO	0,518	0,533	0,530	0,528	0,515	0,006	0,15
Marmoreio	2,75	2,93	2,85	2,51	2,80	0,12	0,12
EGS, mm	5,55	6,20	5,81	5,90	5,59	0,21	0,23
EGS, mm/100 kg PC	1,09 b	1,24 a	1,16 b	1,20 ab	1,15 b	0,04	0,08
EGP8, mm	7,99	7,70	7,77	7,64	7,71	0,31	0,94
Rins, kg	0,827	0,764	0,797	0,778	0,767	0,032	0,57
GRPI, kg	6,53 a	5,37 b	5,93 ab	5,62 b	5,22 b	0,32	0,06

CMS = consumo de matéria seca; PC = peso corporal; PCQ = peso de carcaça quente; GMD = ganho médio diário; RC = rendimento de carcaça; CA = conversão alimentar; EA = eficiência alimentar; Elm = energia líquida de manutenção; Elg = energia líquida de ganho; AOL = área de olho de lombo; RATIO = razão entre altura e largura da AOL; EGS = espessura de gordura subcutânea; EGSP8 = espessura de gordura na altura da picanha; GRPI = gordura renal pélvica e inguinal. Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste t.

A AOL ($P < 0,01$) foi maior nos animais consumindo silagem de MR e MUB e a AOL por 100 kg PC ($P = 0,02$) foi maior nos animais consumindo silagem MR, em relação aos demais tratamentos. A EGS por 100 kg de PC foi maior ($P = 0,08$) nos animais alimentados com MU em relação aos alimentados com MSC e silagens de MUB e MRB. Animais alimentados com MSC apresentaram maior ($P = 0,06$) GPRI em relação aos alimentados com silagens de MU, MR e MRB. Não houve diferença entre as fontes de milho para marmoreio ($P = 0,12$), RATIO ($P = 0,15$), EGS ($P = 0,23$), EGP8 ($P = 0,94$) e rins ($P = 0,57$).

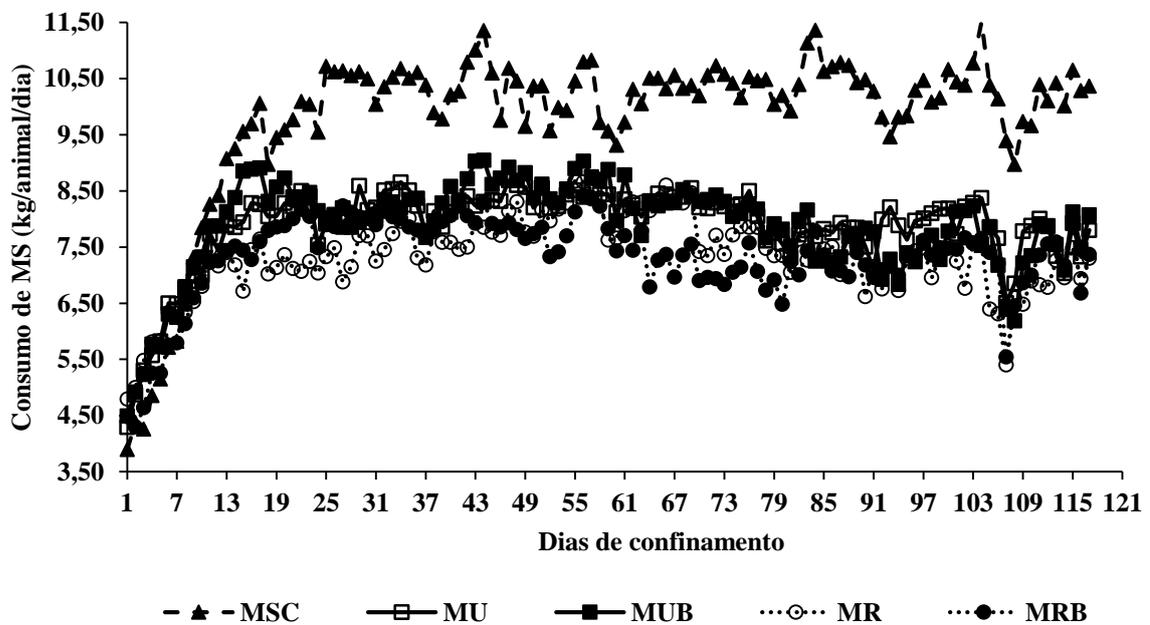


Figura 2. Consumo de MS (kg/dia) de bovinos Nelore terminados em confinamento alimentados com milho grão seco moído (MSC), silagem de milho grão úmido (MU), silagem de milho grão úmido inoculado com *L. buchneri* (MUB; NCIMB 40788 na de 1×10^5 ufc/g), silagem de milho reidratado (MR), silagem de milho reidratado inoculado com *L. buchneri* (MRB; NCIMB 40788 na de 1×10^5 ufc/g).

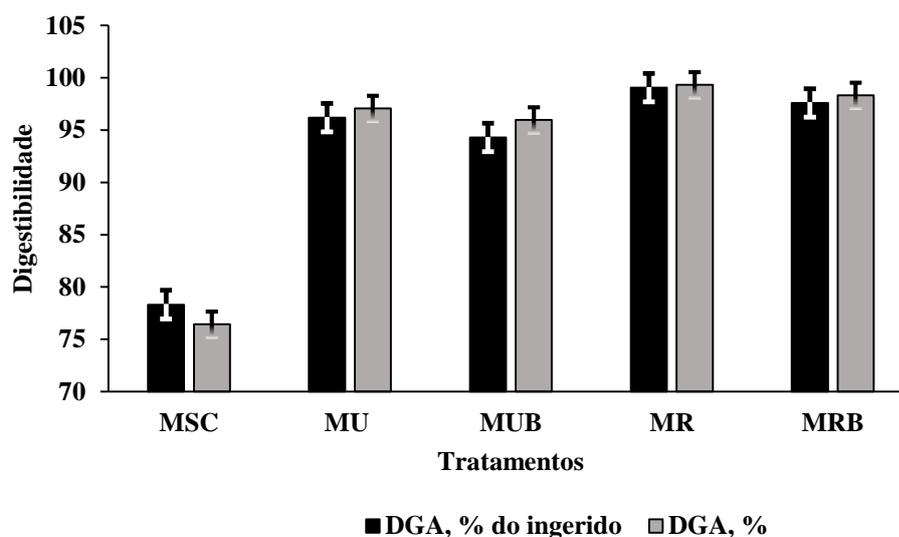


Figura 3. Digestibilidade do amido nas dietas de bovinos Nelore terminados em confinamento alimentados com milho grão seco moído (MSC), silagem de milho grão úmido (MU), silagem de milho grão úmido inoculado com *L. buchneri* (MUB; NCIMB 40788 na de 1×10^5 ufc/g), silagem de milho reidratado (MR), silagem de milho reidratado inoculado com *L. buchneri* (MRB; NCIMB 40788 na de 1×10^5 ufc/g). DGA,% do ingerido = digestibilidade do amido em função da % do ingerido, calculado pela equação DGA, % do ingerido = $100 \times \{1 - [(0,938 - 0,497 \times NF + 0,0853 \times NF^2) \times AF/AD]\}$, onde NF é a % de N fecal, AF é % de amido nas fezes e AD é a % do amido na dieta ($P < 0,01$, Zinn et al., 2007); DGA,% = digestibilidade do amido, calculado pela equação DGA, % = $99,9 - 0,413 \times AF - 0,0131 \times AF^2$ onde AF é % de amido nas fezes ($P < 0,01$, Zinn et al., 2007).

Tabela 8. Valores de energia líquida de manutenção e de ganho da dieta e do milho para bovinos Nelore terminados em confinamento alimentados com milho grão seco moído (MSC), silagem de milho grão úmido (MU), silagem de milho grão úmido inoculado com *L. buchneri* (MUB; NCIMB 40788 na de 1×10^5 ufc/g), silagem de milho reidratado (MR), silagem de milho reidratado inoculado com *L. buchneri* (MRB; NCIMB 40788 na de 1×10^5 ufc/g)

Variáveis	MSC	MU	MUB	MR	MRB	EPM	P - valor
Elm ¹ , Mcal/kg	1,97 c	2,30 b	2,34 ab	2,44 a	2,34 ab	0,05	< 0,01
Elg ² , Mcal/kg	1,32 c	1,61 b	1,64 ab	1,73 a	1,65 ab	0,05	< 0,01
Elm _{milho} ³ , Mcal/kg	1,87 c	2,41 ab	2,38 b	2,47 a	2,44 ab	0,03	< 0,01
Elg _{milho} ⁴ , Mcal/kg	1,23 c	1,70 ab	1,67 b	1,76 a	1,73 ab	0,03	< 0,01

¹Elm = energia líquida de manutenção da dieta (Zinn e Shen, 1998); ²Elg = energia líquida de ganho da dieta (Zinn e Shen, 1998); ³Elg_{milho} = energia líquida de ganho do milho, calculado pela equação $ELg = 0,877 \times ELM_{milho} - 0,41$ (Zinn et al., 2007); ⁴ELm_{milho} = energia líquida de manutenção do milho, calculado pela equação $ELm = 2,49 - 0,0127 \times AF - 0,000292 \times AF^2$ (Zinn et al., 2007), onde AF é a % de amido nas fezes.

DISCUSSÃO

Experimento 1

A redução de 7,7% no CMS dos animais consumindo as silagens em comparação com os que consumiram MSC pode ser associada à maior digestibilidade da MS e MO dessas silagens. A única diferença entre as dietas é o processamento do milho, MSC, MU e MR, portanto as diferenças de digestibilidade da MS e MO ocorrem em função da digestibilidade desses grãos, principalmente da sua fração amido. O milho que foi utilizado neste estudo tem maior porcentagem de endosperma vítreo, sendo classificado como duro. Esse tipo de endosperma apresenta grânulos de amido mais adensados, e a matriz proteica hidrofóbica que recobre os grânulos de amido é mais espessa, o que reduz a digestão dos grãos de milho, como foi observado por Correia et al. (2002) e Philippeau et al. (2000) ao comparar milhos com diferentes vitreosidades de endosperma. Isso ocorre porque a matriz proteica é hidrofóbica e impede a chegada das enzimas, dificultando a colonização dos microrganismos ruminais aos grânulos de amido, dificultando sua digestão (Owens et al., 1986). Contudo, os ácidos produzidos durante o processo fermentativo das silagens podem solubilizar a matriz proteica. Outro processo comum, durante a ensilagem, é a proteólise advinda das enzimas da própria planta ou dos microrganismos da silagem, que pode quebrar a matriz proteica que recobre os grânulos de amido (Hoffman et al., 2011; Kung et al., 2014). Esses processos podem aumentar a degradabilidade *in situ* das silagens de milho grão úmido e milho reidratado (Silva, dados não publicados – Capítulo 3) e a digestibilidade *in vivo*, como se pode observar no presente estudo com o aumento da digestibilidade da MS, da MO e do amido, nas dietas contendo silagens de grãos em comparação com a dieta que continha MSC. A digestibilidade total do amido do milho é correlacionada positivamente com a digestibilidade ruminal do amido (Ferraretto et al., 2013).

Embora a digestão intestinal do amido seja mais eficiente energeticamente, devido à redução das perdas energéticas em comparação com a digestão no rúmen, pela ausência da produção de metano e menor produção de calor no intestino (Owens et al., 1986; McLeod et al., 2001), o escape de amido do rúmen tem correlação negativa com a digestibilidade no trato digestivo total (Ferraretto et al., 2013). A redução na digestão pós-ruminal do amido em função do aumento do fluxo de amido no duodeno está relacionada à alta taxa de passagem através dos intestinos, que leva um tempo insuficiente para completar a hidrólise do amido (Owens et al., 1986) ou a uma insuficiente atividade da enzima amilase pancreática (Huntington, 1997).

Apesar do menor CMS, a redução nos valores de pH ruminal dos animais alimentados com MU, MUB, MR e MRB indica maior fermentação ruminal de amido nessas dietas, em função da maior produção de ácidos de cadeia curta no rúmen dos animais consumindo MU, MR e MRB. A fermentação do amido no rúmen ocorreu mais intensamente nas primeiras 6 horas após o trato e é maior nas dietas contendo silagem, uma vez que o valor mais baixo de pH para essas silagens ocorre nesse horário, enquanto a fermentação do MSC foi menos intensa, com ocorrência de valores mais baixos de pH 12 horas após o trato, porém superiores aos das dietas contendo silagens. A velocidade de degradação do amido foi maior nas silagens em função da maior disponibilidade do amido, o que levou à maior queda de pH e ao aumento da concentração de ácidos graxos de cadeia curta em menor tempo. Isso se deve à quebra na matriz proteica constante durante o tempo de estocagem (Silva, dados não publicados – Capítulo 3), o que aumenta a velocidade de degradação do amido. Outro indício de maior fermentação é que a concentração de propionato foi maior nos animais consumindo silagens em relação aos que consumiram MSC. A redução da razão A:P no rúmen dos animais consumindo dietas que continham silagem ocorreu devido ao aumento da produção de propionato. A redução da razão A:P e do proprionato foram maiores para as silagens de MR e MRB. Esses resultados indicam

que houve maior fermentação ruminal de amido nas dietas com silagens, o que refletiu no aumento da digestibilidade da MS, MO e do amido das dietas. Propionato e lactato são responsáveis por 62 e 17% do suprimento de precursores gliconeogênicos (Huntington et al., 2006). Portanto, o aumento da digestibilidade ruminal do amido aumenta o aporte energético para o animal pelo incremento nos produtos da fermentação. O aumento do aporte energético das silagens foi comprovado no *Experimento 2* com o aumento da ELg e ELm das dietas contendo silagens.

O aumento da digestibilidade ruminal do amido pode aumentar a produção de proteína de origem microbiana (Santos et al., 2011). Em animais consumindo silagem, o aumento da fermentação ruminal de carboidratos nas horas iniciais após o trato, fato comprovado pela redução do pH até às 6 horas e pelo aumento do propionato, reduziu a concentração de amônia ruminal às 3 e 6 horas após o trato. Com a maior disponibilidade de energia para os microrganismos do rúmen, houve maior retirada de N-NH₃ do meio, uma vez que 41,8% da proteína da dieta era de origem não proteica prontamente disponível para os microrganismos. Isso deveria aumentar a produção de proteína de origem microbiana, entretanto não foi observado no presente estudo diferenças para a produção de proteína microbiana. Os animais fistulados utilizados neste estudo tinham PC inicial médio de 602±94 kg e encerraram o experimento com 606±90 kg, o que demonstra que o CMS atingiu apenas a exigência de manutenção, não imprimindo ganho de peso. Isso pode ser confirmado pela produção de proteína microbiana de média de 299 g/dia, próxima à observada para animais recebendo dietas com nível de manutenção (Gionbelli, 2010). A melhor utilização do nitrogênio no rúmen reduziu a excreção de nitrogênio nas fezes aumentando a digestibilidade da PB para as dietas com o uso de silagens.

A semelhança entre as porcentagens de digestão do amido calculado pela coleta total de fezes e pelas equações demonstra que o uso da concentração de amido fecal pode ser um bom parâmetro para a determinação da digestibilidade do amido. Podendo ser usado em experimentos com baias coletivas, como o *Experimento 2* e, futuramente, como métrica de avaliação de grau de processamento em propriedades comerciais.

Experimento 2

A redução no CMS para os animais consumindo dietas com MU e MR em comparação com MSC de 19,6 e 25,2%, respectivamente, ocorreu devido ao aumento da digestão do amido em consequência da maior fermentação do amido no rúmen, como observado no *Experimento 1*. O aumento da digestão das dietas com MU e MR levou a um incremento na ELM da dieta de 17,6 e 21,2%, respectivamente, e na ELg da dieta de 23,1 e 27,7%, respectivamente, em relação às dietas contendo MSC. Os valores de incremento nos teores de ELM e ELg da dieta foram próximos ao da redução no CMS. Ruminantes controlam o CMS por meio de dois mecanismos de regulação: metabólico ou físico. Os animais consomem energia suficiente para suprir suas exigências de manutenção e ganho (regulação metabólica do consumo), momento em que cessam o CMS. Com o aumento da ELM e ELg das dietas com silagens os animais reduziram o CMS, uma vez que o menor CMS atingiu a saciedade química dos animais. A redução no CMS também pode ser explicada pelo aumento na produção de propionato das dietas com silagem. O propionato é rapidamente absorvido, e taxas elevadas de metabolização podem estimular sua oxidação no fígado, aumentando o *status* energético dos hepatócitos, gerando um sinal de saciedade para o término da refeição (Allen et al., 2009). O aumento do fluxo de propionato para o fígado, principalmente em períodos curtos, pode levar à redução no CMS. Porém a redução do CMS observado neste experimento, apesar de brusca de maneira geral não reduziu

os ganhos de peso desses animais. Observou-se menor peso corporal final e PCQ nos animais consumindo dietas com MRB em comparação com MUB e MSC de 19,1 e 12,6 kg, respectivamente. Já, entre os animais consumindo MSC em comparação aos que consumiram MU, MUB e MR, a diferença média foi de apenas 5,9 kg no PCQ. Redução no CMS e com poucas diferenças no peso corporal final e PCQ foram observados por Ladely et al. (1995) e Huck et al. (1998) comparando silagem de grão úmido de milho com milho laminado, e Silva et al. (2007) comparando silagem de milho grão úmido com milho seco moído fino. A redução no CMS na MR e MRB está ligada à maior fermentação dessas silagens, como foi observado no *Experimento 1* com aumento da produção de proprionato, redução da razão A:P e digestão do amido, em função provavelmente do seu menor tamanho de partícula. Ferraretto et al. (2013) observou aumento da digestibilidade no trato digestivo total de silagens de milho grão úmido com a redução do tamanho de partícula; e Silva (dados não publicados – Capítulo 3) observou aumento da degradabilidade *in situ* das silagens de milho reidratado em comparação com as silagens de milho grão úmido, quando incubados com tamanho de partícula igual ao da ensilagem.

A EA foi maior para os animais que consumiram silagens em comparação com os que consumiram MSC, em função da redução no CMS gerado pelo maior ELM e ELG das dietas contendo silagens. O aumento de EA dos animais consumindo silagens foi de 29,4% em relação aos que consumiram MSC. Essa diferença é maior do que a apresentada nos trabalhos de Huck et al. (1998) e Corrigan et al. (2009) comparando silagem de milho úmido e milho laminado seco (3,4 e 12,3%); e Scott et al. (2003) comparando silagem de milho úmido e milho finamente moído (3,16%). Com relação a esses trabalhos, a menor diferença de EA, quando comparada a este trabalho é devido a diferença no tipo de milho, uma vez que o milho utilizado por esses autores foi o milho dentado que apresenta maior digestibilidade dos grãos, o que faz com que

as diferenças com o processamento sejam menores. Ladely et al. (1995) observaram diferenças na EA ao compararem dietas com milho laminado ou silagem de grão úmido com híbridos de milho de lenta (0,147 e 0,167) e alta (0,151 e 0,168) degradação, resultados inferiores ao do presente estudo feito com grãos duros de lenta digestão. O incremento de EA observado neste trabalho (29,4%) também é superior ao observado nos trabalhos de Costa et al. (2002), Silva et al. (2007) e Henrique et al. (2011) (15,1; 21,1 e 6,3%, respectivamente) realizados com milho duro comparando silagem de milho grão úmido de milho seco moído. Mesmo em trabalhos nos quais se comparam dietas com milho duro (laminado e grão inteiro) com dietas em que o método de processamento utilizado foi a floculação, os ganhos de incremento ainda são inferiores aos desse estudo (Carareto et al., 2011; Marques et al. 2011; Peres, 2011; 25,9; 20,7 e 25,5%, respectivamente). Esse grande incremento de EA no presente trabalhos pode estar ligado ao tempo prolongado de estocagem, 270 dias para MU e MUB e 240 dias para MR e MRB. Apesar dos maiores ganhos em digestibilidade, devido à quebra da matriz proteica que recobre os grânulos de amido, ocorrerem nos primeiros 30 a 70 dias de estocagem, ganhos mais baixos na ordem de 0,035 unidades percentuais/dia continuam ocorrendo a partir desses tempos, fazendo com que ao longo do tempo de estocagem o aumento de digestibilidade continue ocorrendo (Silva, dados não publicados – Capítulo 3). Portanto as diferenças altas de EA das silagens de grãos de milho em comparação com o MSC então ligadas à maior digestibilidade das silagens devido ao tempo prolongado de estocagem. Os ganhos elevados acima do esperado em ELg para as dietas contendo silagens se deve em parte ao seu menor CMS, uma vez que o aumento no tempo de retenção da dieta, em função da redução da taxa de passagem gerada com o menor CMS, contribui para o aumento da digestibilidade da dieta.

Poucas diferenças foram observadas entre a composição da carcaça: maior AOL nas dietas com MUB e MR, AOL/100 kg na dieta MR e EGS na dieta com MU, o que demonstra

que as diferenças de CMS e energia das dietas com MSC e silagens não influenciaram a composição da carcaça dos animais. Resultados semelhantes foram encontrados por Scott et al. (2003), Silva et al. (2007) e Henrique et al. (2011). Entretanto foi observado aumento de 15,2% de GPRI, nos animais consumindo MSC em comparação aos que receberam silagens de grãos de milho. Isso pode ser explicado porque a digestão pós-ruminal do amido que escapa do rúmen na dieta de MSC aumenta o suprimento de glicose no intestino delgado, podendo estimular o crescimento do tecido adiposo do animal, principalmente de gordura visceral e omental (McLeod et al., 2001). Pouco se conhece sobre os mecanismos de utilização da glicose digerida no intestino. Parte da glicose que desaparece do intestino não chega a ser recuperada na veia porta, possivelmente pelo seu uso pelos tecidos viscerais (Huntington et al., 2006) e conversão à gordura omental e visceral.

CONCLUSÃO

Recomenda-se o uso de silagens de grãos por propiciar melhor eficiência alimentar. A silagem de grão reidratado de milho é uma alternativa à silagem de milho grão úmido. O uso do inoculante nas silagens não afeta os parâmetros metabólicos e o desempenho dos bovinos Nelore.

REFERÊNCIAS

- Association of Official Analytical Chemist, AOAC. 1995. 16th. ed. Arlington: [AOAC], 1995.
- Bach Knudsen, K. E.; P. Aman, and B. O. Eggum. 1987. Nutritive Value of Danish-grown Barley Varieties, I, Carbohydrates and Other Major Constituents. *Journal of Cereal Science*, 6:173-186.
- Carareto, R., F. A. P. Santos, G. Mourão, A. M. Pedroso, A. M. Pedroso, C. Sitta, M. P. Soares, M. R. Paula, R. S. Marques, and M. C. Soares. 2011. Corn grain processing methods and forage levels on diets for finishing Nellore bulls. Proceedings in 2011 ADSA-PSA-AMPA-CSAS-ASAS Joint Annual Meeting, New Orleans. *Journal Animal Science*, v. 89, (E-Suppl. 1) p. 115.
- Chizzottia, M. L., S. C. Valadares Filho, R. F. D. Valadares, F. H. M. Chizzotti, and L. O. Tedeschi. 2008. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. *Livestock Sci.* 113:218–225.
- Correa, C. S., R. D. Shaver, M. N. Pereira, J. G. Lauer, and K. Kohn. 2002. Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. *J. Dairy Sci.* 85:3008–3012.
- Corrigan, M. E., G. E. Erickson, T. J. Klopfenstein, M. K. Luebbe, K. J. Vander Pol, N. F. Meyer, C. D. Buckner, S. J. Vanness, and K. J. Hanford. 2009. Effect of corn processing method and corn wet distillers grains plus solubles inclusion level in finishing steers. *J. Anim. Sci.* 87:3351–3362.
- Costa, C.; M B. Arrigoni, A. C. Silveira, H. N de Oliveira. 2002. Desempenho de bovinos superprecoces alimentados com silagem de milho ou feno de aveia e grãos de milho ensilados ou secos. *Acta Scientiarum* 24:1175-1183.
- D'Agosto, M., and M. E. Carneiro. 1999. Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. *Revista Bras. Zool.*, 16: 725-729.

- Dehority, B. A. 1984. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 182-185.
- Erwin, E. S., G. J. Marco, and E. M. Emery. 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44:1768-1771.
- Ferraretto, L. F., P. M. Crump, and R. D. Shaver. 2013. Effect of cereal grain type and corn grain harvesting and processing methods on intake, digestion, and milk production by dairy cows through a meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 96:533–550.
- Gionbelli, M. P. 2010. Desempenho produtivo e exigências nutricionais de fêmeas Nelore em crescimento. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.
- Henrique, W., J. A. Beltrame Filho, P. R. Leme, D. P. D. Lanna, G. F. Alleoni, J. L. V. Coutinho Filho, and A. A. M. SAMPAIO. 2007. Avaliação da silagem de grãos de milho úmido com diferentes volumosos para tourinhos em terminação. Desempenho e características de carcaça. *R. Bras. Zootec.* 36:83-190.
- Hoffman, P. C., N. M. Esser, R. D. Shaver, W.K. Coblenz, M. P. Scott, A. L. Bodnar, R. J. Schmidt, and R. C. Charley. 2011. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. *J. Dairy Sci.* 94:2465–2474.
- Huck, G. L., K. K. Kreikemeier, G. L. Kuhl, T. P. Eck, and K. K. Bolsen. 1998. Effects of Feeding Combinations of Steam-Flaked Grain Sorghum and Steam-Flaked, High-Moisture, or Dry-Rolled Corn on Growth Performance and Carcass Characteristics in Feedlot Cattle. *J. Anim. Sci.* 76:2984–2990.
- Huntington, G. B., D. L. Harmon, and C. J. Richards. 2006. Sites, rates, and limits of starch digestion and glucose metabolism in growing cattle. *J. Anim. Sci.* 84(E. Suppl.):E14–E24.
- Huntington, G. B. 1997. Starch utilization by ruminants: From basics to the bunk. *J. Anim. Sci.* 75:852–867.

- Kung, L., Jr., M. C. Windle, and N. Walker. 2014. The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of high-moisture corn. *J. Dairy Sci.* 97:1707–1712.
- Ladely, S. R., R. A. Stock, F. K. Goedecken, and R. P Huffman. 1995. Effect of corn hybrid and grain processing method on rate of starch disappearance and performance of finishing cattle. *J. Anim. Sci.* 73:360-364.
- Lofgreen, G. P., and W. N. Garrett. 1968. A system for expressing net energy requirements and feed values for growing and finishing beef cattle. *J. Anim. Sci.* 27:793-806.
- Marques, R. S., J. R. R. Dórea, A. M. Pedroso, A. W. Bispo, C. G. Martins, W. F. Angolini, and F. A. P. Santos. 2011. Effects of varying forage levels in diets containing whole flint corn and benefits of steam flaking the corn on finishing Nellore bulls performance, carcass characteristics, and liver abscesses. Proceedings in 2011 ADSA-PSA-AMPA-CSAS-ASAS Joint Annual Meeting, New Orleans. *J. Anim. Sci.* Vol. 89, E-Suppl. 1, p. 762.
- McLeod, K. R., R. L. Baldwin, D. L. Harmon, C. J. Richards, and W. V. Rumpler. 2001. Influence of ruminal and postruminal starch infusion on energy balance in growing steers. Page 385 in *Energy Metabolism in Animals*. A. Chwalibog and K. Jakobsen, ed. Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands, 2001.
- Mertens, D. R., M. Allen, J. Carmany, J. Clegg, A. Davidowicz, M. Drouches, K. Frank, D. Gambin, M. Garkie, B. Gildemeister, D. Jeffress, C. S. Jeon, D. Jones, D. Kaplan, G. N. Kim, S. Kobata, D. Main, X. Moua, B. Paul, J. Robertson, D. Tayson, N. Thiex, J. Williams, and M. Wolf. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 85:1217–1240.
- Millen, D. D., R. D. L. Pacheco, M. D. B. Arrigoni, M. L. Galyean, and J. T. Vasconcelos. 2009. A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. *J. Anim. Sci.* 87:3427–3439.

- NRC. 1984. Nutrient Requirements for Beef Cattle. 6th ed. National Academy Press, Washington, DC
- Owens, F. N., R. A. Zinn, and Y. K. Kim. 1986. Limits to starch digestion in the ruminant small intestine. *J. Anim. Sci.* 63:1634–1648.
- Peres, M. S. 2011. Processamento de grãos de milho do tipo flint ou duro e adequação protéica em rações para bovinos em terminação - desempenho animal e digestibilidade do amido. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Philippeau, C., J. Landry, and B. Michalet-Doreau. 2000. Influence of the protein distribution of maize endosperm on ruminal starch degradability. *J. Sci. Food Agric.* 80:404–408.
- Noel, R. J., L. G. Hambleton. 1976. Collaborative study of a semiautomated method for determination of crude protein in animal feeds. *J. AOAC Int.* 59:134-140.
- Pryce, J. D. 1969. A modification of the barker-summeson method for the determination of lactic acid. *Analyst*, 94:1151-1152.
- Santos, A. F. P., R. Carareto, and R. S. Marques. 2011. Processamento de grãos para bovinos de corte. Pages 403-432 in Proc. 9th Simpósio sobre Nutrição de Bovinos. April 27-29. Piracicaba, SP, Brasil. ISSN 2179-8761.
- Scott, T.L., C.T. Milton, G.E. Erickson, T. J. Klopfenstein; and R. A. Stock. 2003. Corn processing method in finishing diets containing wet corn gluten feed. *J. Anim. Sci.* 81:3182-3190.
- Sebastian, S, L. E. Phillip, V. Fellner, and E. S. Idziak. 1996. Comparative assessment of bacterial inoculation and propionic acid treatment on aerobic stability and microbial populations of ensiled high-moisture ear corn. *J. Anim. Sci.* 74:447-456.

- Silva, S. L., P. R. Leme, S. M. Putrino, A. C. Valinote, J. C. M. Nogueira Filho, and D. P. D. Lanna. 2007. Milho grão seco ou úmido com sais de cálcio de ácidos graxos para novilhos Nelore em confinamento R. Bras. Zootec. 36:1426-1434.
- Taylor, C. C., L. Kung, Jr. 2002. The effect of *Lactobacillus Buchneri* 40788 on the fermentation and aerobic stability of high moisture corn in laboratory silos. J. Dairy Sci. 85:1526–1532.
- Vasconcelos, J. T., and M. L. Galyean. 2007. Nutritional recommendations of feedlot consulting nutritionists: The 2007 Texas Tech University survey. J. Anim. Sci. 85:2772–2781.
- Vierstra, R. D. 1996. Proteolysis in plants: Mechanisms and functions. Plant. Mol. Biol. 32:275–302.
- Zinn, R. A., and Y. Shen. 1998. An evaluation of ruminally degradable intake protein and metabolizable amino acid requirements of feedlot calves. J. Anim. Sci. 76:1280–1289.
- Zinn, R. A., F. N. Owens, and R. A. Ware. 2002. Flaking corn: Processing mechanics, quality standards, and impacts on energy availability and performance of feedlot cattle. J. Anim. Sci. 80:1145–1156.
- Zinn, R. A., A. Barreras, L. Corona, F. N. Owens, and R. A. Ware. 2007. Starch digestion by feedlot cattle: Predictions from analysis of feed and fecal starch and nitrogen. J. Anim. Sci. 85:1727-1730.