

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

Estratégia de otimização combinando tempo de estocagem e aditivos no valor nutritivo e na estabilidade aeróbica de *snapple*

Larissa Maniero Nazato

Monografia para obtenção do título de bacharel em
Engenharia Agronômica.

Piracicaba
2020

Larissa Maniero Nazato

Estratégia de otimização combinando tempo de estocagem e aditivos no valor nutritivo e na estabilidade aeróbica de *snapple*

Orientado:
Prof Dr LUIZ GUSTAVO NUSSIO

Monografia para obtenção de título de bacharel em
Engenharia Agronômica

Piracicaba
2020

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

Nazato, Larissa Maniero

Estratégia de otimização combinando tempo de estocagem e aditivos no valor nutritivo e na estabilidade aeróbica de *snaplage* / Larissa Maniero Nazato. - - Piracicaba, 2020.

97 p: il.

Monografia - - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2020

1. Silage 2. Additive 3. Inoculant

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus.

A minha família, por todo o amor, dedicação e suporte, especialmente aos meus pais Luís e Ângela, ao meu irmão Felipe e minha cunhada Marcella. Amo vocês.

Ao Danilo, por todo o companheirismo, força e ajuda.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, por proporcionar condições para realização do meu sonho

Ao Professor Dr. Luiz Gustavo Nussio pela oportunidade, aprendizado e confiança. Obrigada Professor!

À Drª Greiciele de Moraes por toda a ajuda na reta final, auxiliando-me no término do trabalho com muita excelência.

Ao Dr Pedro Salvo e ao Guilherme Francetto pela ajuda inicial no trabalho.

A toda equipe do grupo de Qualidade e Conservação de Forragens (QCF) pelo aprendizado e apoio, principalmente meus amigos de escala e vida Juliana, Lucas, Andréia, Crispina (Laura), Daniel, Késia e Gustavo. Com vocês o caminho tornou-se mais leve.

Às minhas amigas Taty, Ermê, Uréia, Vindt e Vings. Vocês me inspiram e me ajudam a encontrar minha melhor versão todos os dias.

A FAPESP pelo auxílio financeiro e apoio a pesquisa.

Aos funcionários do departamento, que auxiliaram tanto na condução do trabalho a campo quanto ao laboratório.

E por fim, a todos que por ventura colaboraram de qualquer forma com o processo.

Sumário

RESUMO	5
ABSTRACT	6
INTRODUÇÃO	7
MATERIAL E MÉTODOS	9
ENSILAGEM	9
Bromatologia	9
Cromatografia	9
Perdas fermentativas	10
Estabilidade aeróbica	10
Análise estatística	11
RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	27

RESUMO

Estratégia de otimização combinando tempo de estocagem e aditivos no valor nutritivo e na estabilidade aeróbica de snaplage

A produção de silagens de espigas de milho, ou “snaplage”, vem ganhando espaço no mercado mundial e, mais recentemente, no Brasil. Isso ocorre pela conveniência logística oferecida por colhedoras automotrices de forragens adaptadas à colheita de espigas e por conta das vantagens nas formulações de rações, já que o snaplage combina componentes fibrosos e amido mais degradável que no milho seco, permitindo aumentar a capacidade de suporte da propriedade em cerca de 10%. Sabe-se que a degradabilidade do amido em silagens de grãos úmidos aumenta ao longo do tempo de armazenamento, com ganhos ótimos próximos de 60 dias. O objetivo desse trabalho foi avaliar se aditivos químicos e biológicos poderiam potencializar ou antecipar o alcance de degradabilidades do amido elevadas e ao mesmo tempo incrementar a estabilidade aeróbia no snaplage. Foram testados dois níveis de inoculação com *Lactobacillus buchneri*, 100000 ufc/g (LB100) e 500000 ufc/g de forragem (LB500), além do aditivo químico Lupro-Mix®, cujos compostos ativos principais são o ácido propiônico, formato de sódio e o ácido fórmico. As silagens foram armazenadas por 30 e 60 dias, com 3 repetições por tratamento. As proporções de grãos (68,6%) palha (14,5%) e sabugo (16,9%) resultaram em um snaplage com teores médios de amido e FDN iguais a 48,5% e 29,3%, respectivamente. O experimento apresentou maior porcentagem de amido digestível (66,6% vs 69,9%; P=0,02) e de proteína solúvel (37,8% vs 43,7; P<0,001) aos 60 dias de estocagem, não havendo efeito dos aditivos sobre a degradação do amido. As silagens de espigas fermentaram adequadamente, alcançando valores de pH inferiores a 4,1. A concentração do ácido propiônico foi maior para LUPRO, devido à sua formulação e o químico foi eficiente em controlar o crescimento microbiano, resultando também em menores perdas de matéria seca (4,84%; P= 0,04). A inoculação com *L.buchneri* e a adição do químico resultaram em silagens com estabilidades aeróbias semelhantes à do controle.

Palavras-chave: 1. Silagem 2. Aditivo 3. Inoculante

ABSTRACT

Optimization strategy combining length of storage and additives in the nutritional value and aerobic stability of *snaplage*

The production of corn cob silages, or “*snaplage*”, has been used on the world market and, more recently, in Brazil. This is due to the logistical convenience offered by self-propelled forage harvesters adapted to harvesting ears and because of the advantages in feed formulations, since *snaplage* combines fibrous components and more degradable starch than in dry corn, allowing to increase the property's carrying capacity about 10%. It is known that the degradability of starch in wet grain silages increases over the storage time, with optimal gains close to 60 days. The objective of this work was to evaluate whether chemical and biological additives could enhance or anticipate the achievement of high starch degradability and at the same time increase aerobic stability in *snaplage*. Two levels of inoculation were tested with *Lactobacillus buchneri*, 100000 cfu / g (LB100) and 500000 cfu / g forage (LB500), in addition to the chemical additive Lupro-Mix®, whose main active compounds are propionic acid, sodium and formic acid. The silages were stored for 30 and 60 days, with 3 replicates per treatment. The proportions of grains (68.6%) straw (14.5%) and cob (16.9%) resulted in a *snaplage* with average levels of starch and NDF equal to 48.5% and 29.3%, respectively. The experiment showed a higher percentage of digestible starch (66.6% vs 69.9%; P = 0.02) and soluble protein (37.8% vs 43.7; P <001) at 60 days of storage, no with the effect of additives on starch degradation. The ear silages fermented properly, reaching pH values below 4.1. The concentration of propionic acid was higher for LUPRO, due to its formulation and the chemical was efficient in controlling microbial growth, also resulting in lower losses of dry matter (4.84%; P = 0.04). The inoculation with *L. buchneri* and the addition of the chemical resulted in silages with aerobic stability similar to that of the control.

Keywords: 1. Silage 2. Additive 3. Inoculant

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas, a agricultura brasileira estabeleceu uma trajetória crescente de seus indicadores econômicos. A capacidade de absorção de novos conhecimentos e tecnologias pelos agricultores foi a grande responsável por esses resultados de melhora na produção (FILHO; FISHLOW, 2017).

Nesse contexto de busca por inovações, uma nova alternativa de silagem advinda da planta de milho vem tomando ampla proporção, o *snaplage*. Esse método tem como princípio a colheita e ensilagem da espiga do milho com pedúnculo, brácteas, sabugo, que compõe de 200 a 300 g/kg da MS, e grãos, responsável pela porção restante de MS (DANIEL et al, 2019). Extensamente difundida no EUA, ganha espaço no Brasil principalmente pela facilidade logística ao garantir o acoplamento em diferentes marcas de colhedoras autopropelidas com as frentes combinadas para colher espigas (*snapper head*), contando algumas vezes com processador de grãos embutido (FERRARETTO; SHAVEL; LUCK, 2018). Além disso, essa estratégia garante a colheita, de uma única vez, de componentes fibrosos da planta em associação aos grãos (MADER, 2012). Contendo FDN em torno de 200-250 g/kg MS, amido em torno de 500-600 g/kg MS e NDT perto de 800g/kg MS (DANIEL et al, 2019), torna-se uma opção para dietas de terminação de gado de corte, podendo excluir o uso de outras fontes de volumosos ou até mesmo concentrado.

A tomada de decisão do ponto de colheita do *snaplage* requer estratégia. A janela de colheita é larga já que os elementos da espiga acrescentam em torno de 6 pontos de umidade na silagem (MAHANNA, 2017). Nessa visão, temos uma margem de segurança em relação às intempéries naturais, o que não ocorre na colheita de grão úmido para silagem. No entanto, a fermentação é favorecida quando as espigas são colhidas com uma maturidade menor (370-450g/kg de umidade total e, portanto, 34-36% de umidade no grão) (DANIEL et al., 2019; MAHANNA, 2017; SODERLUND, 2016). Com a fermentação ocorrendo adequadamente, a degradação das prolaminas que protegem os grânulos de amido nas cultivares vítreas aumenta, melhorando a degradabilidade do amido no rúmen (HOFFMAN et al, 2011). Com o avanço da maturidade também há grande variação de digestibilidade de FDN na palha e sabugo, além da quantidade de amido presente. Gusmão et al (2019) analisaram os efeitos da colheita em três maturidades (57,1%; 63,2% e 68,7% de MS). À medida que as plantas amadureceram foram constatados maiores teores de FDN na palha (81,5%, 83,4% e 83,7% de MS) e no sabugo (76,0%, 79,5% e 81,6% de MS). O aumento da maturidade resultou em diminuição da digestibilidade da FDN da palha às 48h (45,5; 43,4 e 41,4% de MS) e do sabugo (47,3; 43,7 e 38,4% da MS). Houve acréscimo de amido a partir da maturidade de 63,2% MS, com média de 2,8 pontos percentuais de acréscimo. O aumento de FDN no sabugo e na palha com a maior maturidade também foi relatado por Soderlund et al (2006), assim como um aumento no amido.

O *snaplage* apresenta rendimentos entre 10 a 15% superiores em relação à opção de produzir separadamente a silagem de planta inteira de milho e a silagem grão úmido ou reidratado para níveis de desempenho animal semelhantes (DANIEL et al, 2019; SODERLUND, 2006; MAHANNA, 2017). A retirada da cultura com antecedência é um ponto importante na agricultura brasileira, já que facilita a implantação de duas safras anuais. Além disso, o *snaplage* permite o plantio direto da próxima safra, ao fornecer palhada ao solo. Essa prática diminui os tratos culturais, incorpora nutrientes e melhora a conservação do solo. Com isso, a captura de carbono orgânico no solo aumenta (SÁ et al, 2001).

Um aspecto negativo é o fato do *snaplage* ser mais suscetível à deterioração aeróbica iniciada por leveduras. Existem evidências de que sabugo e brácteas contêm população aumentada (1 a 2 log) de leveduras e fungos em relação aos grãos no momento da ensilagem, levando à maior instabilidade dessas silagens (JOBIM et al, 1999). Com isso,

aditivos inibidores desses microrganismos aeróbicos podem ser úteis para melhorar a estabilidade aeróbica desses produtos e conservar seus nutrientes (KUNG et al, 1998).

O ácido propiônico destaca-se por sua função antimicótica (WOOLFORD, 1995), impedindo a propagação de leveduras e mofos, impossibilitando o aquecimento da silagem (KUNG et al, 2000). Já o ácido fórmico é responsável por causar uma acidificação direta na massa, o que suprime o desenvolvimento de microrganismos deterioradores da silagem (NADEAU e AUERBACH, 2014). Contudo, esses ácidos na forma pura são corrosivos aos maquinários e aos manipuladores, sendo frequentemente tamponados com amônia e/ou sódio. A combinação de ácidos para formar um aditivo otimiza os custos devido à diferença de preço das matérias primas, além de ampliar o espectro de ação devido aos diferentes potências das substâncias, podendo criar um efeito sinérgico (AUERBACH e NADEAU, 2019). Para aditivos de ácido propiônico tamponado, quantidades abaixo de 0,75% da forragem fresca são recomendadas (KUNG et al, 1998).

No caso de uso de aditivos microbianos, as bactérias de ácido lácticas heterofermentativas (BAL^{he}), como *Lactobacillus buchneri*, são capazes de produzir ácidos antifúngicos durante a fermentação (DANNER et al., 2003). Assim, a *L. buchneri* garante quantidade considerável de ácido acético na forragem. Por sua vez, este ácido fraco tem como característica atravessar a membrana de microrganismos indesejáveis, como as leveduras das silagens de grãos. Esse processo ocorre quando o ácido dissocia-se dentro do citoplasma do organismo, causando variações metabólicas neste por conta da liberação de H⁺ (KROONEMAN et al, 2002).

Na ensilagem de grãos é importante ressaltar a ocorrência da proteólise no processo fermentativo, que é explicada majoritariamente pela ação de bactérias (60% do total) e enzimas da planta (30 % do total) (JUNGES et al., 2017). A proteólise também pode ser decorrente da ação de microrganismos indesejados na silagem, como os do gênero Clostridium, que quebram as proteínas em amônia, podendo elevar o pH a valores próximos 5 (ALBRECHT e BEAUCHEMIN, 2003). No entanto, silagens bem preservadas apresentam menores valores de pH e a proteólise está relacionada ao aumento do amido degradável devido à quebra de prolaminas (HOFFMAN et al, 2011; KUNG et al, 2018).

A degradabilidade do amido dos grãos é aumentada com o prolongamento do tempo de estocagem. Resultados antigos já mostravam diferenças na degradabilidade in vitro de silagens de grão de sorgo reconstituído, com valores crescentes à medida que os tempos de estocagem aumentavam (10, 20 e 30 dias) (NEUHAUS et al., 1971).

Portanto, objetivo desse trabalho foi avaliar se aditivos químicos e biológicos poderiam potencializar ou antecipar os benefícios da degradabilidade do amido do *sorghage* e, com isso, diminuir o tempo de estocagem necessário para a produção de uma silagem de qualidade, mantendo ou melhorando a estabilidade aeróbica desses alimentos quando expostos ao oxigênio.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Ensilagem

A área de cultivo de milho foi estabelecida no município de Altair, na Fazenda Santa Rosa, em São Paulo. A colheita foi realizada quando os grãos atingiram 53% de MS ou 47% de umidade, utilizando-se uma colhedora autopropelida com frente combinada para colher espigas. A ensilagem foi realizada em um trabalho conjunto com o Grupo de Qualidade e Conservação de Forragens (QCF), orientado pelo Professor Luiz Gustavo Nussio no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP/ESALQ). Foram utilizados baldes plásticos de 5 L, como silos experimentais. Durante a ensilagem foram colocadas camadas de 10 a 15 cm do material, compactadas manualmente até o alcance de densidades médias de 600 kg/m³.

Além da silagem controle (CONT) foram impostos os seguintes tratamentos: *Lactobacillus buchneri* 100000 ufc/g de forragem (LB100), *Lactobacillus buchneri* 500000 ufc/g de forragem (LB500) e o Lupro-Mix® NA (35% ácido propiónico, 21% de formato de sódio, 20% de ácido fórmico, 4% propionato de sódio e 20% de água), produzido pela empresa BASF®, na dosagem de 4 L/ton de forragem (LUPRO). Os aditivos foram combinados a dois tempos de estocagem (30 e 60 dias), caracterizando um experimento fatorial 4 x 2. Cada tratamento contou com 3 repetições,

Após o enchimento, os silos foram fechados com as tampas, identificados e pesados. Após a pesagem, os baldes foram vedados com fitas adesivas, para impedimento da entrada de ar. Os silos experimentais foram mantidos em local protegido, sob temperatura ambiente até os momentos de abertura.

2.2. Bromatologia

Na abertura dos silos experimentais, a camada superficial de cada silo (aproximadamente 15 cm) foi descartada e, abaixo dessa camada, toda a silagem foi recolhida, colocada em sacos plásticos e homogeneizada. Na sequência, uma amostra de 350g foi coletada em sacos de papel para a secagem na estufa de circulação forçada de ar a 55° por 72 horas. Após secagem, o material foi processado em moinho de facas tipo Willey com peneira de malha de 1 mm e armazenado em potes plásticos devidamente vedados para as demais análises.

A determinação do teor absoluto de matéria seca foi realizada por secagem em estufa a 105°C durante 16 h (AOAC, 2000). O amido, proteína bruta (PB), proteína solúvel (PS), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram analisados por espectroscopia no infravermelho próximo (Foss NIRsystems 5000-M, n° série 6349), que também emitiu as estimativas de energias líquidas para ganho e para produção de leite.

2.3. Cromatografia e caracterização fermentativa

Com o uso de uma sub-amostra fresca das forragens, foi preparado o extrato aquoso para determinação do nitrogênio amoniacal (N-NH₃), ácido lático e dos produtos de fermentação por cromatografia. Foram adicionados 25 g de silagem em 225g de água deionizada, seguido de homogeneização durante 4 min em aparelho do tipo *stomacher*. Após isso, o extrato foi filtrado com três folhas de gaze e centrifugado a 10.000 X g por 15 minutos a -4 °C.

Para a mensuração do N-NH₃ foi usado o método colorimétrico descrito por Chaney e Marbach (1962), adaptado para uso em placas de microtúbulos e mensuração em colorímetro – Elisa Reader (absorbância de 550 nanômetros). A concentração de ácido lático foi analisada por espectrometria com leitura em 565 nm, de acordo com metodologia adaptada de Pryce (1969).

O perfil fermentativo foi analisado por meio do cromatógrafo a gás com detector de massas (GCMS QP 2010 plus, Shimadzu, Kyoto, Japan) usando colunas de capilariedade (Stabilwax, Restek, Bellefonte, PA; 60 m, 0.25 mm, i.d., 0.25 m).

2.4. Perdas fermentativas

A perda de matéria seca (PMS) foi calculada através da pesagem dos balde antes e depois dos tempos de fermentação de 30 e 60 dias. Assim, foi obtida a diferença entre o peso bruto de MS inicial e final dos silos, em relação à quantidade de forragem ensilada (MS). Deve ser descontado o peso do balde na ensilagem e na abertura, conforme equação descrita por Schmidt (2006).

$$MS = \frac{[(MS_i - MS_f)]}{MS_i} \times 100$$

Onde:

PMS= Perda Total de MS;

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

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

A medida de perdas por gases no processo de ensilagem foi mesurada com base na pesagem dos silos experimentais na ensilagem e na abertura, utilizando a equação descrita por Mari (2003), ou seja:

$$PG = \frac{[(PS_f - PS_a)]}{MFF \times MS_f} \times 100$$

Onde:

PG= Perda de gases durante o armazenamento (% da MS inicial);

PS_f= Peso do silo na ensilagem;

PS_a= Peso do silo na abertura;

MFF= massa da silagem na ensilagem;

MS_f= teor de MS da forragem na ensilagem.

2.5. Estabilidade aeróbica

A estabilidade aeróbia (EA) foi determinada para o tempo de abertura de 30 dias, por meio do controle da temperatura das massas ao longo de 10 dias de exposição ao ar, conforme Kung et al. (2000). Amostras de 3 kg das silagens foram colocadas sem compactação em balde plásticos sem tampa e mantidos em sala climatizada a 25±1°C. As temperaturas das silagens foram mensuradas a cada 30 minutos com o uso de sistema eletrônico de aquisição de dados modelo Novus Tag Temp inseridos no centro geométrico da massa em cada balde.

A estabilidade aeróbia foi definida como o tempo que a silagem levou para que sua massa alcançasse temperatura superior à do ambiente em 2°C.

2.6. Análise estatística

O experimento foi delineado de forma inteiramente casualizada, em torno dos fatores Aditivo (N = 4: Ausente (CONT), LB100, LB500 e LUPRO) e Tempo de armazenamento (N = 2: 30 e 60 dias), configurando um arranjo fatorial 4 x 2, com 3 repetições por tratamento.

Os dados de Bromatologia, Cromatografia e caracterização fermentativa e de Perdas foram analisados pelo procedimento Mixed, do SAS®, com um modelo estatístico que incluiu os efeitos de Aditivo, de Tempo e a interação entre estes fatores. Considerou-se como significativas as diferenças com P-valores inferiores a 0,05. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

Os dados de Estabilidade aeróbia estão inseridos em um Delineamento inteiramente casualizado e o modelo testou o efeito de Aditivo (N = 4: Ausente (CONT), LB100, LB500 e LUPRO), visto que essa variável foi analisada apenas no tempo de abertura de 30 dias. As médias também foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor médio de matéria seca (MS) das espigas no momento da ensilagem foi de 60,96%, portanto, dentro do intervalo de 36 a 42% de umidade descrito como ideal por Soderlund et al (2006). A proporção de grãos, palha e sabugo está apresentada na figura 1. A participação entre os componentes da espiga encontrada neste trabalho está próxima das proporções identificadas para amostras brasileiras, segundo dados do ESALQLab (2020, Comunicação pessoal), em que os grãos, sabugo e palha responderam por 57,1%, 25,8% e 17,2% da espiga, respectivamente. No entanto, as proporções diferem das amostras americanas documentadas por Mahanna et al (2010), com destaque para a elevada participação de grãos na *snaplage* (84%, 9,4% e 6,3 %, para grão, sabugo e palha, respectivamente). Uma explicação plausível para essa diferença é o uso da segunda safra para produção de milho no Brasil na qual há o plantio de híbridos precoces, visando época de plantio flexível com intuito de evitar a seca ou geada no florescimento do milho (CRUZ et al, 2011). Russel et al (1992) demonstrou que híbridos precoces apresentam menor produção de grãos do que híbridos de ciclo normal (5,978 vs. 6,721 kg MS/ha).

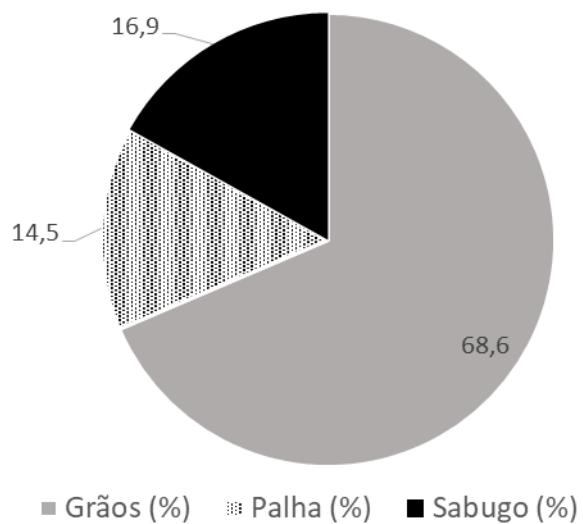


Figura 1. Participação de grãos, palha e sabugo na composição do *snaplage*. Desvio padrão: grão (0,01); palha (0,04); sabugo (0,04)

Os teores de MS das silagens foram diferentes entre os aditivos ($P= 0,039$), sendo o maior teor observado para o tratamento LUPRO (58,3%) e o menor para o LB500 (56,1%), como representado na Figura 2. Entretanto, os valores de todos os tratamentos estão próximos e adequados para uma fermentação de qualidade (MAHANNA et al, 2010).

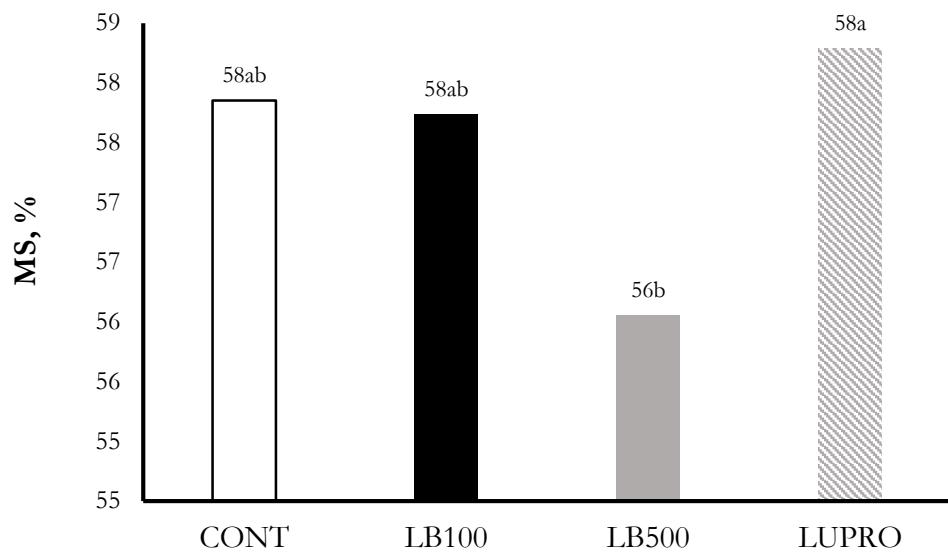


Figura 2. Teores de matéria seca de *snaplage* sem aditivos (CONT) ou contendo 100.000 ufc/g (LB100) ou 500.000 ufc/g (LB500) de *Lactobacillus buchneri* ou o aditivo químico LuproMix® (LUPRO). Efeito de aditivo: $P = 0,039$; EPM = 0,54

A descrição bromatológica do *snaplage* está apresentada na tabela 1. A proteína bruta foi influenciada pelos aditivos aplicados ($P = 0,02$), ainda que os mecanismos de ação dos mesmos não apontem razão biológica para essa variação. No geral, os valores estão de acordo com a PB encontrada para silagens e grãos de milho.

Os teores de amido, FDN e FDA não foram afetados pelos tratamentos, mas nota-se que os *snaplaces* vêm apresentando grande variação qualitativa, tanto comparando com amostras nacionais como de outros países. A partir dos teores de amido e FDN encontrados nos trabalhos de Salvo (2019) – 41,6 %MS de amido e 34,6 %MS de FDN e Mahanna (2010) – 59,04 % MS de amido e 18,13 %MS de FDN, observa-se que os teores de amido e fibra deste experimento foram intermediários, colaborando com o entendimento de que se trata de uma silagem com características bastante variáveis. Os teores de amido foram semelhantes entre as silagens e coerentes com a participação de grãos encontrada na espiga ($68,6\% \pm 0,01$) uma vez que 70% dos grãos de milho são compostos por amido. A composição química do *snaplage* vai determinar a quantidade de energia para ganho de peso ou produção de leite, que neste trabalho não foram afetadas pelos tratamentos.

Tabela 1. Composição química e energia líquida de leite (NEL) e de ganho (NEg) de *snapple* sem aditivos (CONT) ou contendo 100.000 ufc/g (LB100) ou 500.000 ufc/g (LB500) de *Lactobacillus buchneri* ou o aditivo químico LuproMix® (LUPRO), nos tempos de abertura de 30 (30d) ou 60 dias (60d)

	PB ¹	FDN ¹	FDA ¹	AMIDO ¹	EE ¹	NEL ²	NEg ²
30d							
CONT	9,00	28,5	16,0	48,7	4,17	1,7	1,06
LB100	9,30	28,3	15,4	48,8	4,07	1,7	1,06
LB500	9,60	28,8	15,4	55,1	3,93	1,69	1,05
LUPRO	9,07	29,4	15,9	45,8	3,87	1,68	1,03
60d							
CONT	8,87	29,7	16,8	48,3	25,5	1,65	1,00
LB100	9,13	27,8	15,2	49,7	4,13	1,71	1,07
LB500	9,4	33,2	18,6	44,1	3,70	1,62	0,97
LUPRO	9,17	29,2	16,2	47,8	4,00	1,66	1,01
Ef. Tempo							
30d	9,24	28,7	15,7	49,6	4,00	1,69	1,05
60d	9,14	30,0	16,7	47,5	9,32	1,66	1,01
Ef. Aditivo							
CONT	8,93 ^b	29,1	16,4	48,5	14,8	1,67	1,03
LB100	9,22 ^{ab}	28,0	15,3	49,2	4,10	1,70	1,06
LB500	9,50 ^a	31,0	17,0	49,6	3,82	1,65	1,01
LUPRO	9,12 ^{ab}	29,3	16,0	46,8	3,93	1,67	1,02
EPM	0,12	1,23	0,62	2,22	5,66	0,02	0,02
P-valor							
Aditivo	0,02	0,39	0,25	0,79	0,42	0,31	0,22
Tempo	0,40	0,31	0,10	0,34	0,34	0,08	0,06
A X T	0,79	0,46	0,21	0,15	0,44	0,40	0,30

¹Dados em %MS ²Dados em Mcal/kg³

Ganhos em digestibilidade do amido do milho em função da ensilagem são indispensáveis para uma silagem com alto valor nutritivo. A degradação das prolaminas que envolvem os grânulos de amido é fundamental para atingir esses ganhos (HOFFMAN et al, 2011). A concentração de proteína solúvel (PS) é um indicativo da proteólise dessa barreira protetora. Como observado na figura 4, o aumento no tempo de estocagem proporcionou maiores concentrações de os ($P=0,01$), o que é confirmado por outros autores em relação à silagens de grão úmido (BENTON et al, 2005; JUNGES et al, 2017). Essa proteólise ocorre majoritariamente por bactérias (60%) seguida pela ação das enzimas do grão (30%), segundo Junges et al (2017). Isso explica as baixas concentrações de PS no tratamento LUPRO (38,2 %), já que o ácido é fortemente tóxico aos microrganismos da silagem (KUNG et al, 2000). Como complemento, a figura 3 demonstra que o tempo de estocagem ($P=0,02$) aumentou a degradabilidade do amido, com 66,6% para 30d e 69,9% para 60d, o que é esperado por conta da degradação das prolaminas ao longo do tempo, mesmo em uma silagem sem aditivos (OWENS et al, 1986; HOFFMAN et al, 2011).

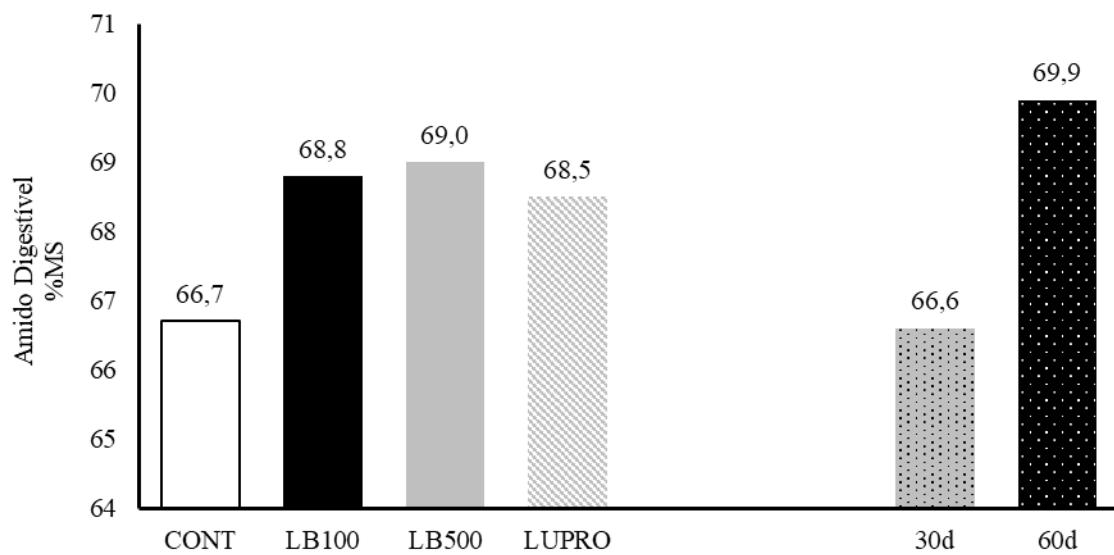


Figura 3. Amido digestível em %MS em *snaplage* sem aditivos (CONT) ou contendo 100.000 ufc/g (LB100) ou 500.000 ufc/g (LB500) de *Lactobacillus buchneri* ou o aditivo químico LuproMix® (LUPRO), nos tempos de abertura de 30 (30d) e 60 dias (60d). Efeito de aditivo: P= 0,56; efeito de tempo de estocagem: P= 0,02; EPM= 1,33

O tratamento LUPRO também apresentou maior teor NNH3 aos 60d ($P < 0,001$). Aumentos de NNH3 sãs normais em silagens tratadas com aditivos a base de ácido propiônico já que a amônia é usada como principal agente tamponante (KUNG e MILL, 2002). É importante ressaltar que essas concentrações altas não possuem relação com proteólises ou deaminação. Contudo, esses resultados representam uma partição entre as frações de nitrogênio, o que impacta a formulação das dietas com o *snaplage* contendo o aditivo químico, já que haverá maior parcela de nitrogênio não-proteico na forragem.

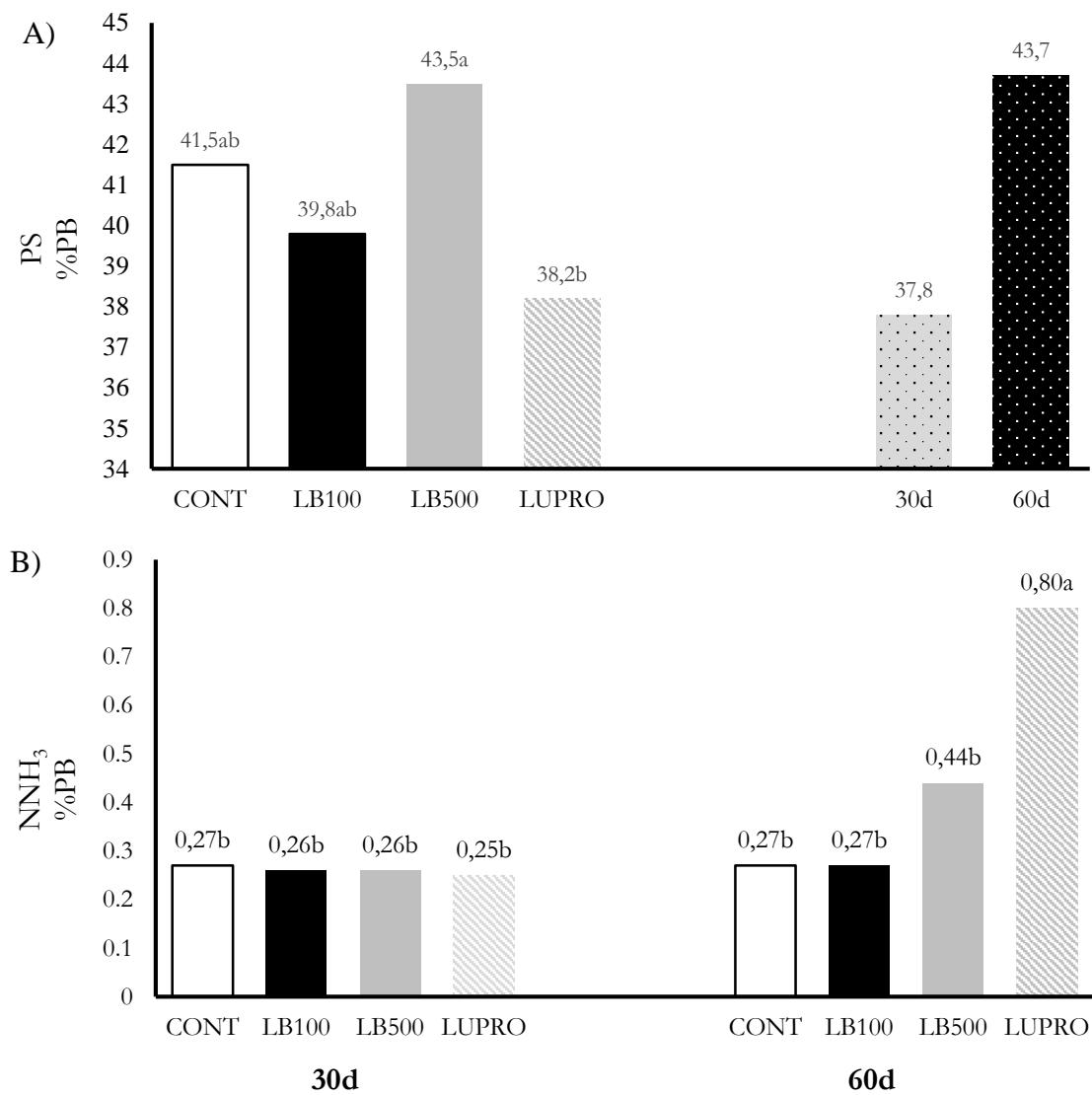


Figura 4. Frações nitrogenadas do *snaplage* sem aditivos (CONT) ou contendo 100.000 ufc/g (LB100) ou 500.000 ufc/g (LB500) de *Lactobacillus buchneri* ou o aditivo químico LuproMix® (LUPRO), nos tempos de abertura de 30 (30d) e 60 dias (60d). A) Proteína solúvel (PS) - Efeito de aditivo: P= 0,03; efeito de tempo de estocagem: P <001; EPM= 1,19. B) Nitrogênio amoniacal (NNH₃) - Efeito da interação aditivo*tempo: P <001; EPM= 0,05

Os níveis de ácido lático apresentados na figura 5 são compatíveis com o que se espera para silagens de grãos úmidos. Aos 30 dias, os teores de ácido lático foram maiores para a silagem controle e tratadas com *L. buchneri*, apesar da inclusão elevada de heterofermentativas, via inoculante. Essa resposta pode ser explicada pelo fato de sinais robustos da inoculação com *L. buchneri* serem percebidos a partir de 50 dias de ensilagem (KUNG e MUCK, 2015), já que essas bactérias possuem crescimento lento (KLEINSCHMITT e KUNG, 2006). Sinais desse metabolismo tardio foram confirmados aos 60 dias pelo abaixamento nos teores de ácido lático indicando um perfil heteroláctico de fermentação nos tratamentos LB100 e LB500, como esperado pela ação da *Lactobacillus buchneri* (DRIEHUIS et al, 1999). Como descrito por Elferink et al (2001), em ambiente anerobiótico, *Lactobacillus buchneri* degrada 2 moles de ácido lático em 1 mol de ácido acético e 1 mol de 1,2-propanediol. Esse estudo ainda ressalta que esse mecanismo não resulta no crescimento da população da heterofermentativa e, portanto, entende-se como um mecanismo de defesa em relação ao pH e aos ácidos orgânicos dissociados, responsáveis por penetrar e modificar as membranas celulares.

O efeito do aditivo químico foi evidente aos 30 dias e o menor teor de ácido láctico pode ser explicado pelo forte efeito antibacteriano, que resultou no decréscimo de bactérias do ácido láctico (NADEAU et al, 2007; LINDQVIST et al, 2011). Os níveis de ácido láctico continuaram baixos até a abertura de 60 dias.

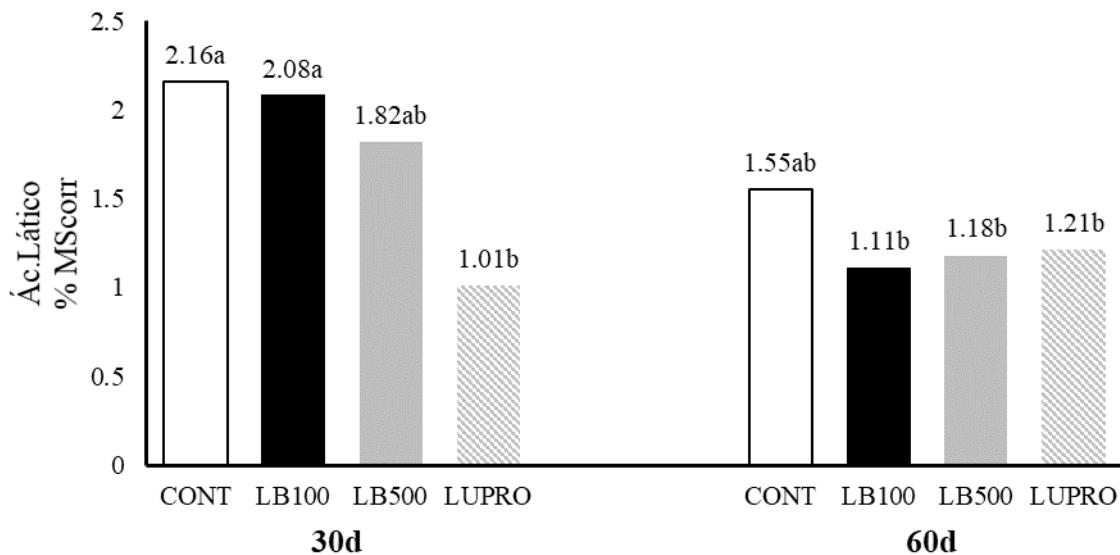


Figura 5. Concentrações de ácido láctico em *silage* sem aditivos (CONT) ou contendo 100.000 ufc/g (LB100) ou 500.000 ufc/g (LB500) de *Lactobacillus buchneri* ou o aditivo químico LuproMix® (LUPRO), nos tempos de abertura de 30 (30d) e 60 dias (60d). Efeito da interação aditivo*tempo: P= 0,01; EPM= 0,16

Em relação ao ácido acético, o efeito estatístico de aditivo confirmou a eficácia da inoculação com *L. buchneri*, já que os tratamentos LB100 e LB500 apresentaram valores de ácido acético estatisticamente semelhantes e superiores ao da silagem controle (0,40 e 0,37 vs 0,33; P <001), como mostrado na figura 6. No entanto, esperava-se um incremento do ácido acético no inoculante de maior dose. Ressalta-se que a dose utilizada no tratamento LB100 é a dose comercial, comprovando sua eficácia em diferenciar a silagem inoculada de uma silagem não tratada.

Como explicado anteriormente, o tratamento LUPRO apresentou ação irrestrita de controle microbiano, afetando a população epífctica da silagem. Como consequência, os produtos de fermentação são reduzidos em relação às silagens sem o químico. Em relação ao tempo de abertura, a sucessão microbiana mostra-se eficiente em gerar uma silagem com perfil mais heteroláctico ao longo do tempo, comprovado pelo aumento de ácido acético aos 60 dias.

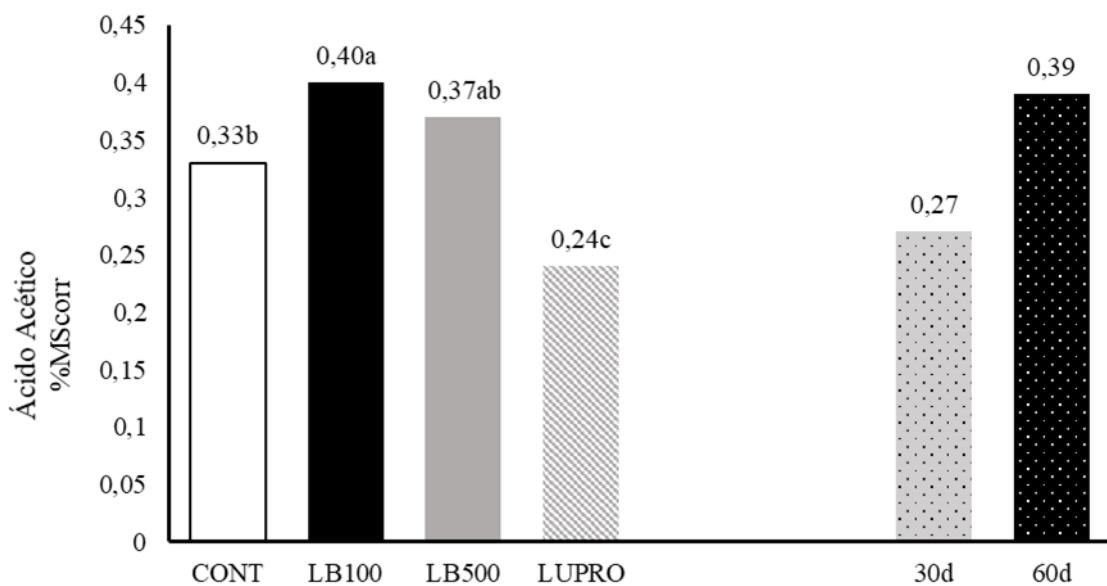


Figura 6. Concentrações de ácido acético em *silage* sem aditivos (CONT) ou contendo 100.000 ufc/g (LB100) ou 500.000 ufc/g (LB500) de *Lactobacillus buchneri* ou o aditivo químico LuproMix® (LUPRO), nos tempos de abertura de 30 (30d) e 60 dias (60d). Efeito de aditivo: P <001; efeito de tempo de estocagem: P <001; EPM= 0,02

Analizando-se os dados de ácido propiônico na figura 7, nota-se que o aditivo químico adicionou grande quantidade desse ácido orgânico, em função da formulação do produto. O ácido propiônico possui uma forte capacidade antimicrobiana, pois, segundo o modo de ação desenhado por Lambert e Stratford (1999), o ácido difunde-se na membrana do microrganismo e, ao entrar no citoplasma, se dissocia. O acúmulo de prótons H⁺ torna o ambiente ácido, inibindo a glicólise (Krebs et al., 1983) e o transporte ativo (FREESE et al., 1973).

Apesar de não haver diferença estatística, pode-se destacar o aumento numérico no teor de ácido propiônico da silagem LB100, acompanhando o melhor desempenho da inoculação nesse tratamento, que respondeu com maiores teores de ácido acético. Driehuis et al. (1999) observaram uma predominância do álcool 1-propanol e não do 1,2-propanodiol em silagens de milho planta inteira, inoculadas com *L. buchneri*, sugerindo a possibilidade de haver outro microrganismo envolvido na degradação anaeróbica do 1,2-propanodiol nas silagens inoculadas com *L. buchneri*. Isso foi comprovado no estudo de Krooneman et al. (2002), que isolaram duas cepas de *Lactobacillus diolivorans* em silagens de milho, capazes de degradar o 1,2-propanodiol a 0,53 mol de 1-propanol e 0,45 mol de ácido propiônico. Daí o aumento indireto de ácido propiônico em silagens que contenham *L. buchneri*.

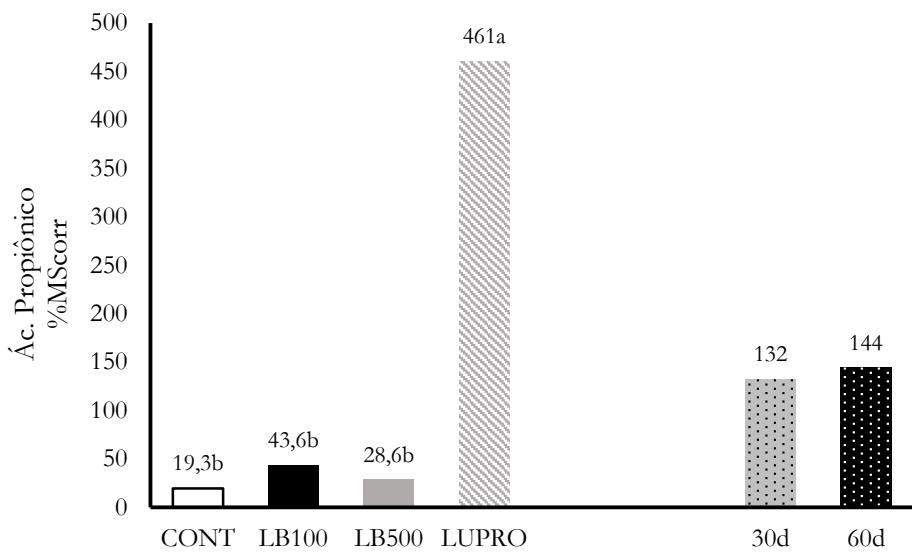


Figura 7. Concentrações de ácido propiônico em *snaplage* sem aditivos (CONT) ou contendo 100.000 ufc/g (LB100) ou 500.000 ufc/g (LB500) de *Lactobacillus buchneri* ou o aditivo químico LuproMix® (LUPRO). Efeito de aditivo: $P < 0,001$; efeito de tempo de estocagem: $P = 0,83$; EPM = 61,1.

Os valores de pH das silagens de espigas indicam a ocorrência de fermentações adequadas para todos os tratamentos (Figura 8). Como o valor máximo alcançado foi de 4,01 para o químico, nota-se que as silagens deste trabalho tiveram pHs dentro do intervalo esperado de 3,5 a 4,5, segundo Kung et al. (2018). Podia-se esperar maior queda de pH para o tratamento LUPRO, já que é observado níveis abaixo de 3,95 em silagens de milho planta inteira (KUNG et al., 2000) e em silagens de grão de milho reidratado (OLIVEIRA, 2020). Contudo, Woofford (1975) constatou que no pH 4, com menos de 70 mmol.L⁻¹ de ácido propiônico, há inibição completa do crescimento de fungos e bactérias.

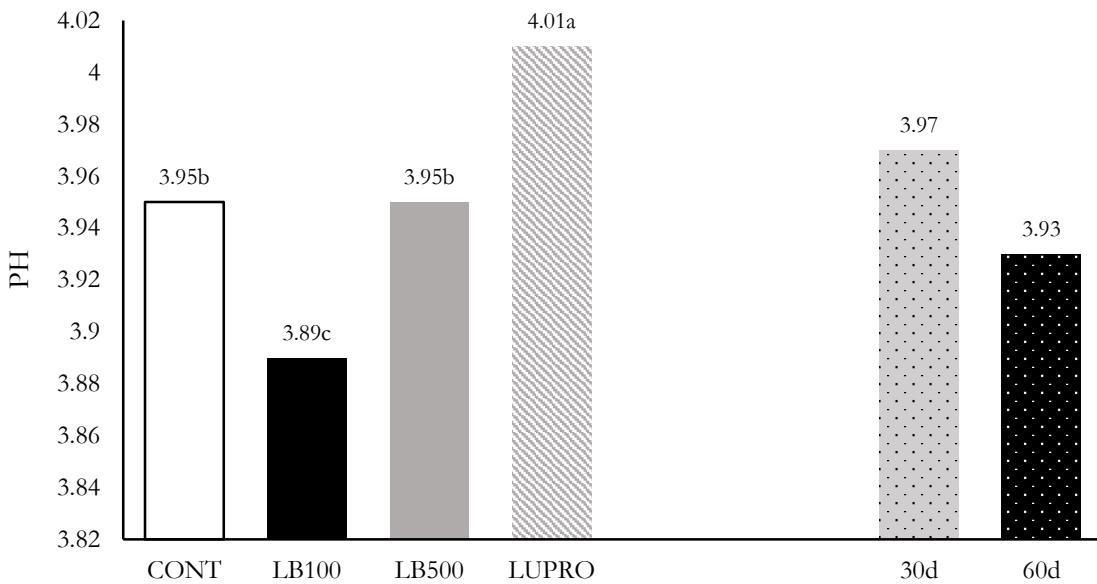


Figura 8. Níveis de pH mensurados em *snaplage* sem aditivos (CONT) ou contendo 100.000 ufc/g (LB100) ou 500.000 ufc/g (LB500) de *Lactobacillus buchneri* ou o aditivo químico LuproMix® (LUPRO), nos tempos de abertura de 30 (30d) e 60 dias (60d). Efeito de aditivo: $P < 0,001$; efeito de tempo de estocagem: $P < 0,001$; EPM = 0,01.

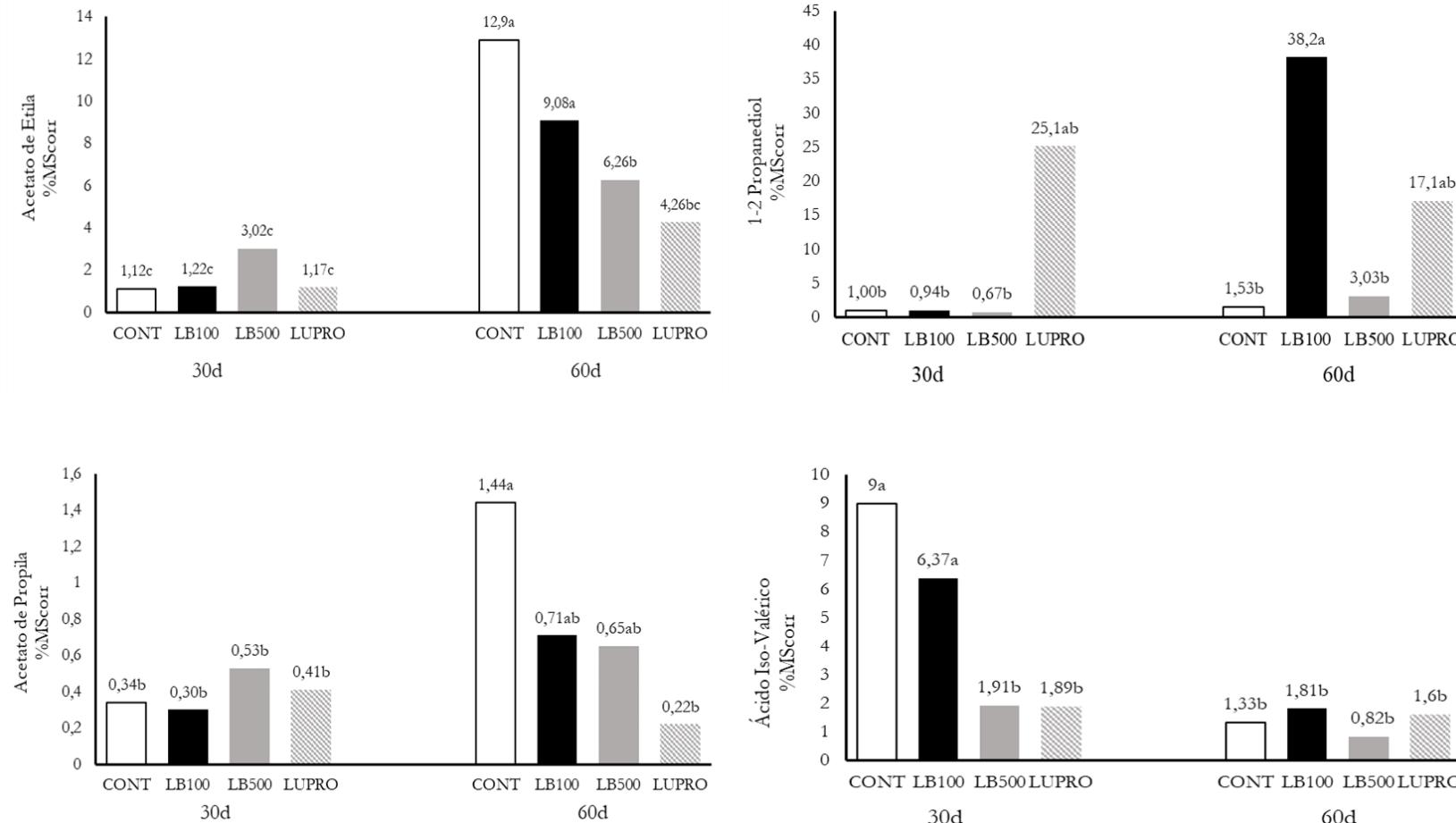
Na tabela 2 e na figura 9 temos o complemento do perfil fermentativo e a matéria seca corrigida para voláteis do *snaplage*. Constatou-se maior produção de ácido isobutírico ($P < 0,001$) aos 30 dias, enquanto para o metanol e a

acetona as maiores concentrações ocorreram aos 60 dias ($P <001$ e $P=0,01$, respectivamente). O metanol é o produto da desmetilação da pectina (FALL e BENSON,1996) e não é associado a bactérias ou fungos da silagem, mas sim ao *Clostridium thermoaceticum* (HIPPE et al., 1992). A acetona é um possível produto do metabolismo de Clostridium, estando presente também no metabolismo de bactérias do ácido láctico (ROOKE, 2003). Da mesma forma, o ácido isobutírico está associado ao metabolismo de clostrídios, sendo também encontrado como um produto da ação de *L. brevis* em plantas de milho (ROOKE e HATFIELD, 2003; SUZZY et al, 1990). Para o ácido butírico não houve diferença estatística entre tratamentos ($P= 0,37$), porém as quantidades se assemelham àquelas encontrada em silagens de grãos úmidos sem aditivos nos trabalhos de Oliveira (2020) e Fernandes, 2014). Esse AGV é produto de clostrídios, mas algumas leveduras e bacilos podem ser responsáveis pela produção de pequenas quantidades. O ácido isovalérico foi observado em maiores quantidades no tratamento CONT e LB100 aos 30d ($P= 0,01$) e também está relacionado à ação de clostrídios (ROOKE e HATFIELD, 2003). Todavia, vale ressaltar que as silagens de espiga deste trabalho não apresentaram características favorecedoras do desenvolvimento desse gênero, uma vez que os pHs foram inferiores a 4,01 e o pH crítico restringir o desenvolvimento de clostrídios seria 4,2 (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Em todos os tratamentos, os níveis de etanol foram baixos, mas o LUPRO apresentou a menor quantidade ($P <001$; 0,03 % MSCorr). O etanol é um composto encontrado no metabolismo da glicose via fosfogluconato / fosfocetolase (ROOKE e HATFIELD, 2003). Os éteres lactato e acetato de etila são relacionados com a produção de etanol (WEISS, 2009) por microrganismos presentes na silagem (HEFNER et al, 2013) e também mostraram diminuição no tratamento LUPRO, confirmado o controle microbiano do aditivo. Já o 1-2 propanodiol refere-se ao metabolismo de degradação do ácido láctico por *L. bucheneri* (ROOKE e HATFIELD, 2003) e, por isso, foi encontrado em maior quantidade no tratamento LB100 ($P= 0,02$).

Tabela 2. Perfil fermentativo de *snapple* sem aditivos (CONT) ou contendo 100.000 ufc/g (LB100) ou 500.000 ufc/g (LB500) de *Lactobacillus buchneri* ou o aditivo químico LuproMix® (LUPRO), nos tempos de abertura de 30 (30d) e 60 dias (60d)

	MScorr	Ácido butírico	Acetona	Metanol	Álcool Iso-propílico	Etanol	2-Butanol	1-Propanol	Lactato de Etila	2,3-Butanediol	Ácido Iso-butírico
30d											
CONT	58,5	1,46	2,58	5,70	1,63	0,03	0,65	3,27	19,3	269	3,34
LB100	58,1	1,70	8,61	7,26	1,46	0,03	1,29	2,43	17,4	264	3,77
LB500	57,1	1,75	6,50	7,29	6,65	0,04	1,89	1,82	17,9	291	5,01
LUPRO	58,9	0,92	9,31	5,71	0,74	0,02	0,55	1,60	4,20	138	7,12
60d											
CONT	57,9	1,91	18,3	18,5	10,6	0,08	3,45	3,04	34,5	625	2,55
LB100	58,2	1,32	13,2	18,1	9,58	0,07	0,77	3,33	35,9	623	1,36
LB500	55,7	0,89	7,13	15,4	9,89	0,06	0,83	3,40	31,3	491	1,66
LUPRO	58,2	0,59	10,2	11,8	2,78	0,04	0,54	1,57	16,0	331	1,58
Ef Tempo											
30d	58,1	1,46	5,21	6,49	2,62	0,03	1,10	2,28	14,7	240	4,81
60d	57,5	1,18	12,2	16,0	8,23	0,06	1,40	2,83	29,4	517	1,79
Ef. Aditivo											
CONT	58,2 ^{ab}	1,69	10,4	12,1	6,14 ^a	0,05 ^a	2,05	3,16	26,9 ^a	447 ^a	2,40
LB100	58,1 ^{ab}	1,51	8,61	12,7	5,52 ^a	0,05 ^a	1,03	2,88	26,7 ^a	443 ^a	2,56
LB500	56,4 ^b	1,32	6,50	11,3	8,27 ^a	0,05 ^a	1,36	2,61	24,6 ^a	391 ^a	3,34
LUPRO	58,6 ^a	0,76	9,31	8,76	1,76 ^b	0,03 ^b	0,55	1,58	10,1 ^b	234 ^b	4,35
EPM		0,26	2,43	1,45	1,41	<001	0,80	0,57	2,00	33,4	0,93
P-valor											
aditivo	0,04	0,08	0,68	0,24	0,03	<001	0,58	0,24	<001	<001	0,54
tempo	0,24	0,26	0,01	<001	<001	<001	0,70	0,33	<001	<001	<001
A X T	0,77	0,37	0,13	0,37	0,22	0,09	0,33	0,63	0,64	0,14	0,33



As perdas de matéria seca das silagens estão apresentadas na figura 10. As perdas fermentativas estão relacionadas ao consumo de nutrientes decorrente das fermentações principais, bem como dos processos secundários desencadeados por microrganismos indesejáveis, como as leveduras e os clostrídios (PAHLOW et al, 2003). Sabe-se que o metabolismo heteroláctico de *L. Buchneri* é responsável pela formação de gás carbônico e compostos voláteis, conduzindo a incrementos nas perdas (KUNG et al, 2018). Nesse estudo, a atividade de *L. buchneri* não gerou perdas significativas em relação à silagem controle, apesar do maior valor numérico obtido para LB500. Contradicoramente também, a *snapple* LB100 apresentou maior consistência de respostas quanto à efetividade da inoculação com heterolácticas, o que não se revelou nas perdas que poderiam ter sido superiores. As baixas perdas obtidas para o tratamento químico estão condizentes com sua eficácia em paralisar as reações metabólicas na silagem, preservando nutrientes.

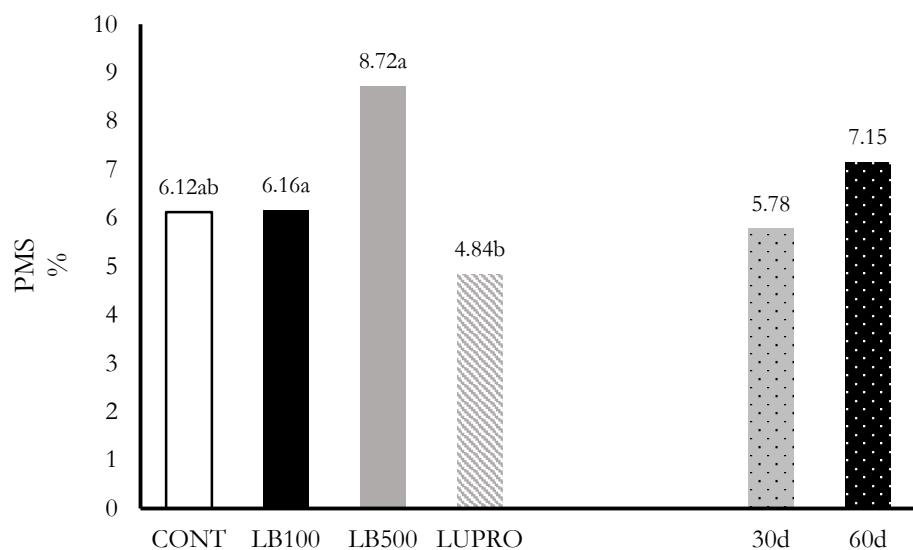


Figura 10. Porcentagens de perda de material seco em *snapple* sem aditivos (CONT) ou contendo 100,000 ufc/g (LB100) ou 500,000 ufc/g (LB500) de *Lactobacillus buchneri* ou o aditivo químico LuproMix® (LUPRO). Efeito de aditivo: $P= 0,04$; efeito de tempo de estocagem: $P= 0,13$; EPM= 0,89.

Perdas de gases apresentaram resultado inesperado para o efeito do aditivo ($P <001$) já que se esperava maiores perdas nos tratamentos LB100 e LB500. Contudo, os mesmos se igualaram ao tratamento LUPRO (Figura 11). Em relação ao efeito de tempo de estocagem, as perdas por gases aos 60 dias foram maiores que 30 ($P= 0,01$). Essa evolução pode ser fundamentada pelo tempo necessário para a ação dos inoculantes (KUNG E MUCK, 2015) e também pelo aumento de atividade microbiana no tratamento controle.

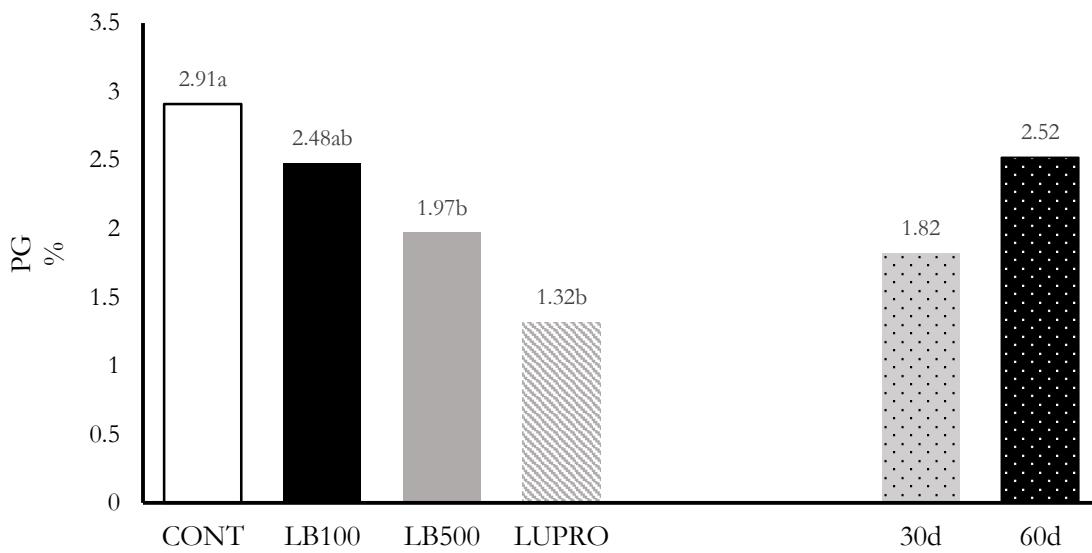


Figura 11. Perdas em gases em *silage* sem aditivos (CONT) ou contendo 100.000 ufc/g (LB100) ou 500.000 ufc/g (LB500) de *Lactobacillus buchneri* ou o aditivo químico LuproMix® (LUPRO), nos tempos de abertura de 30 (30d) e 60 dias (60d). Efeito de aditivo: $P < 0,001$; efeito de tempo de estocagem: $P = 0,01$; EPM = 0,24

A quebra da estabilidade aeróbica está relacionada ao aumento da temperatura da silagem e é um fator que indica o início da deterioração, ou oxidação dos nutrientes da massa. As leveduras que toleram ambientes ácidos são responsáveis pelo início do processo, oxidando os produtos de fermentação da silagem, o que causa o abaixamento do pH e aquecimento da massa (DRIEHUIS; ELFERINK; SPOELSTRA, 1999). Com isso, outros microrganismos consumidores de substratos começam a proliferar (LINDGREN et al, 1985). Esse processo é comum no momento de fornecimento da silagem aos animais, pois ocorre o contato com o oxigênio que é usado como acceptor de elétrons para as reações aeróbicas (BORREANI et al, 2018; ELFERINK et al 2001).

No presente experimento, a estabilidade foi realizada aos 30 dias com foco na antecipação da abertura dos silos e, por isso, a avaliação no tempo mais curto de fermentação. Mesmo assim, os valores de estabilidade foram estatisticamente semelhantes entre os tratamentos e superiores a 211 horas (Figura 12). A figura 13 ilustra o padrão de aquecimento das silagens, evidenciando uma queda de temperatura geral nas primeiras 24 horas do ensaio. Notam-se picos modestos de temperatura antes dos 6 dias, não suficientes para exceder a temperatura ambiente em 2 °C. Somente após 8 dias de ensaio é que as silagens assumem comportamento de temperatura ascendente, porém, o tempo de 240 h não foi suficiente para registrar as quebras de estabilidade em todos os tratamentos.

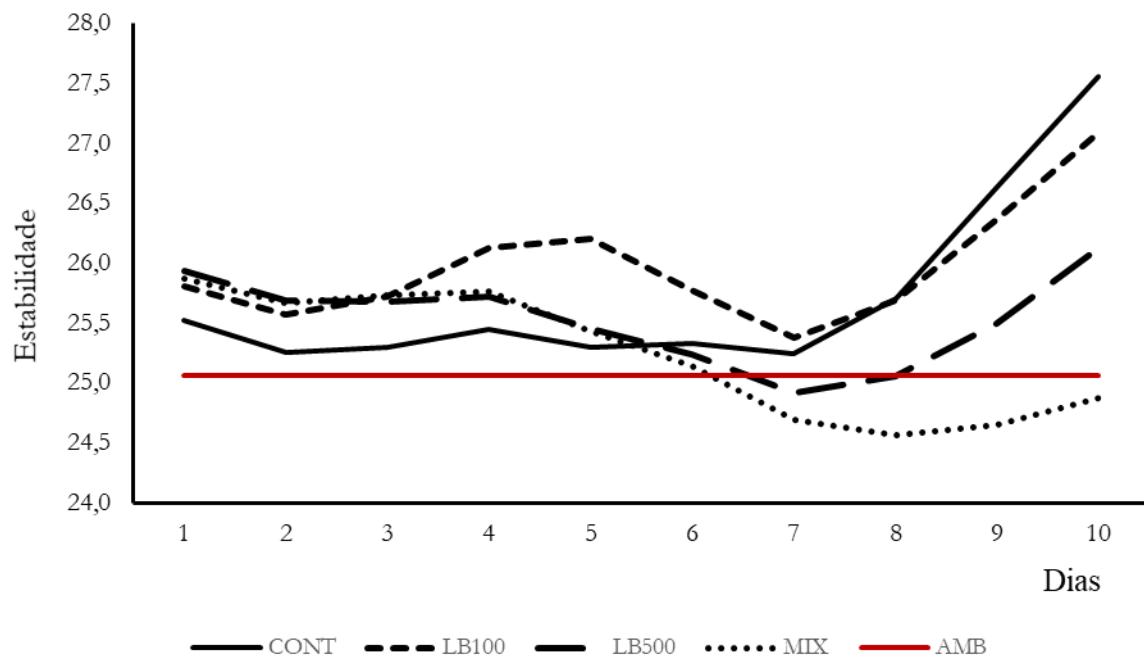


Figura 12. Curvas de aquecimento de *snaplage* conservada por 30 dias sem aditivos (CONT) ou contendo 100.000 ufc/g (LB100) ou 500.000 ufc/g (LB500) de *Lactobacillus buchneri* ou o aditivo químico LuproMix® (LUPRO) ao longo dos 10 dias de ensaio de estabilidade aeróbia

4. CONCLUSÃO

O tempo de armazenamento do *snapple* exerce maior influência sobre a disponibilidade do amido do que a aplicação de aditivo químico a base de ácido propiônico tamponado ou da inoculação com *L. buchneri* nas doses 100 e 500 mil ufc/g de forragem.

A estabilidade aeróbia de *snapple* armazenado por 30 dias não variou em função da aplicação de aditivos microbianos e químico, com tempos superiores a 211 horas.

O tempo de armazenamento de 60 dias conjuga melhores resultados nutricionais e fermentativos para *snapple*, com aumento do amido digestível e o do ácido acético, importante por controlar fungos e leveduras.

REFERÊNCIAS

- ADESOGAN, A.T.; KRUEGER, N.; SALAWU, M.B.; DEAN, D.B.; STAPLES C.R. 2004. The influence of treatment with dual-purpose bacterial inoculants or soluble carbohydrates on the fermentation and aerobic stability of Bermuda grass. *J. Dairy Sci.* 87:3407–3416.
- ALBRECHT, K. A.; BEAUCHEMIN, K. A. 2003. Alfalfa and other perennial legume silage. In: D. R. Buxton, R. E. Muck, J. H. Harrison, editors, *Silage Science and Technology*, Agron. Monogr. 42. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI. p.633-664. doi:10.2134/agronmonogr42.c14
- AOAC. 2000. Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International. 17th ed. Gaithersburg, USA.
- AUERBACH, H.; & Nadeau, E. 2019. Chemical additives for silages: When to use it and what are the options. In: Proceedings of the International Symposium on Forage Quality and Conservation., FEALQ/ESALQ, Piracicaba, SP, Brazil, p 91-108.
- AXELSSON, L. 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. *Food science and technology-new york-marcel dekker-*, 139, 1-66.
- AXELSSON, L. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen, S., Wright, A.V. and Ouwehand, A., Eds., *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 3rd Edition, Marcel Dekker, New York, 1-67. <https://doi.org/10.1201/9780824752033.ch1>
- BENTON, J.R.; KLOPFENSTEIN, T.J.; ERICKSON, G.E. 2005. Effects of corn moisture and length of ensiling on dry matter digestibility and rumen degradable protein. *Nebraska Beef Cattle Reports*.151.<https://digitalcommons.unl.edu/animalscinbcr/151>
- CHANAY, A.L.; MARBACH, E.E.P. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical chemistry* 8:130–132. doi:10.1021/AC60252A045.
- DANNER, H.; HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; BRAUN, R. 2003. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 69, p. 562-567.
- DRIEHUIS .F; ELFERINK, S.J.W.H. Oude; SPOELSTRA 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.* 1999 Oct;87(4):583-94. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00856.x. PMID: 10583687.

- ELFERINK, S.J.O.; KROONEMAN, J.; GOTTSCHAI, 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*. *Applied and Environmental microbiology*, 67(1), 125-132.
- FALL R.; BENSON A. A. 1996. Leaf methanol: the simplest natural product from plants. *Trends in Plant Science*, Volume 1, Issue 9, 1996, Pages 296-301, ISSN 1360-1385, [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(96\)88175-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(96)88175-0).
- FERNANDES, J. 2014. Influência de genótipo, maturidade e tempo de armazenamento na qualidade de silagens de grãos de milho com alta umidade. P. 1-98, Master Dissertation, University of São Paulo. ESALq-USP, Piracicaba, Brazil.
- FERRARETTO, L.F.; SHAVER, R.D.; LUCK, B.D. 2018. Silage review: Recent advances and future technologies for whole-plant and fractionated corn silage harvesting. *Journal of dairy science*, v. 101, n. 5, p. 3937-3951, 2018.
- FREESE, E., SHEU, C.W.; GALLIERS, E. 1973. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature*. 241:321-325.
- GUSMÃO, J.; BASTOS, M.; LIMA, L.; CARDOSO, M.; BERNARDES, T. 2019. PSXI-30 The effects of hybrid and maturity on the nutritive value of *snaplage*. *Journal of Animal Science*, 97(Supplement_3), 404-405.
- HAFNER, S.D.; HOWARD, C.; MUCK, R.E.; FRANCO, R.B.; MONTES, F.; GREEN, P.G.; ROTZ, C.A. 2013. Emission of volatile organic compounds from silage: Compounds, sources, and implications. *Atmospheric Environment*, 77, 827-839.
- HIPPE, H.; ANDREESEN, J.; GOTTSCHALK, G. 1992. The genus *Clostridium*—nonmedical The Prokaryotes (second ed.), Springer-Verlag, New York, pp. 1800-1866
- HOFFMAN, P.C.; ESSER, N.M.; SHAVER, R.D.; COBLENTZ, W.K.; SCOTT, M.P.; BODNAR, A. L.; CHARLEY, R.C. 2011. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. *Journal of dairy science*, 94(5), 2465-2474.
- JOBIM, C.C.; REIS, R.A.; SCHOKEN-ITURRINO, R.P.; ROSA, B. 1999. Microbial development during the utilization of high moisture corn and earlage. *Acta Scientiarum*, 21, 671-676.
- JUNGES, D.; MORAIS, G.; SPOTO, M.H.F.; SANTOS, P.S.; ADESOGAN, A.T.; NUSSIO, L.G.; DANIEL, J.L.P. 2017. Short communication: Influence of various proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. *J. Dairy Sci.* 100:9048–9051. doi:10.3168/jds.2017-12943.

- KLEINSCHMIT, D.H.; KUNG, L. Jr. 2006. The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage. *J Dairy Sci.* Oct;89(10):3999-4004. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72443-2. PMID: 16960076.
- KREBS, H.A.; WIGGINS, D.; STUBBS, M.; SOLS, A.; BEDOYA, F. 1983. Studies on the mechanism of the antifungalaction of benzoate. *Biochem. J.* 214:657-663.
- KROONEMAN, J.; FABER, F.; ALDERKAMP, A.C.; OUDE ELFERINK, S.J.H.W.; DRIEHUIS, F.; CLEENWERCK, I.; SWINGS, J.; GOTTSCHAL, J.C.; VANCANNEYT, M. *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, v. 52, p. 639-646, 2002.
- KUNG Jr, L.; ROBINSON, J.R.; RANJIT, N.K.; CHEN, J.H.; GOLT, C.M.; PESEK, J.D. 2000. Microbial populations, fermentation end-products, and aerobic stability of corn silage treated with ammonia or a propionic acid-based preservative. *Journal of dairy science*, 83(7), 1479-1486.
- KUNG Jr, L.; SHEPERD, A.C.; SMAGALA, A.M.; ENDRES, K.M.; BESSETT, C.A.; RANJIT, N.K.; GLANCEY, J.L. 1998. The effect of preservatives based on propionic acid on the fermentation and aerobic stability of corn silage and a total mixed ration. *Journal of dairy science*, 81(5), 1322-1330.
- KUNG JR,L.; SHAVER R.D.; GRANT R.J., SCHMIDT R.J. 2018. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Journal of Dairy Science*, Volume 101, Issue 5, Pages 4020-4033,ISSN 0022-0302https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909.
- KUNG, L.; MUCK, R.E. 215. Silage additives: where are we going. In: Proceedings of the XVII international silage conference, July. p. 1-3.
- LAMBERT, R.J.; STRATFORD, M. 1999. Weak-acid preservatives: Modeling microbial inhibition and response. *J. Appl.Microbiol.* 86:157-164.
- LINDGREN, S.; PETTERSSON, K.; KASPERSSON, A.; JONSSON, A.; LINGVALL. P. 1985. Microbial dynamics during aerobic deterioration of silages.
- MADER, T.L. 2012. Distillers Grains With Solubles and Ground Ear Corn in Feedlot Diets.
- MAHANNA B. 2017. Silage zone manual. Du Point Pionner. n. 2
- MARI, L.J. 2003. Intervalo entre cortes em capim-marandu (*Brachiaria brizantha* (Hochst ex. A.Rich.) Stapf cv. Marandu): produção valor nutritivo e perdas associadas à fermentação da silagem. *Dissertação (Mestrado em Agronomia)*. - Escola Superior Agrícola “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 159p.

- McDONALD, P.; HENDERSON, N.; S. HERON. 1991. The Biochemistry of Silage. 2nd ed. Chalcombe Publications, Marlow, UK.
- MILLS, J. A.; KUNG Jr, L. 2002. The effect of delayed ensiling and application of a propionic acid-based additive on the fermentation of barley silage. *Journal of dairy science*, v. 85, n. 8, p. 1969-1975.
- NADEAU E, AUERBACH H. 2014. Effects of particle size and chemical additives on fermentation and aerobic stability of grass-clover silage. 5th Nordic Feed Science Conference.
- NEUHAUS V., TOTUSEK R. 1971. Factors Affecting the In Vitro Digestibility of High Moisture Sorghum Grain. *Journal of Animal Science*, Volume 33, Issue 6, December , Pages 1321–1326, <https://doi.org/10.2527/jas1971.3361321x>
- OWENS, F.N., ZINN, R. A.; KIM, Y. K. 1986. Limits to starch digestion in the ruminant small intestine. *J. Anim. Sci.* 63:1634–1648.
- PAHLOW G.; MUCK R.E.; DRIEHUIS F.; ELFERINK S.J.W.H.; SPOELSTRA S.F. 2003. Microbiology of ensiling. In: D. R. Buxton, R. E. Muck, J. H. Harrison, editors, *Silage Science and Technology*, Agron. Monogr. 42. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI. p. 31-93. doi:10.2134/agronmonogr42.c2.
- PRYCE, J.D. 1969. A modification of the barker -summerson method for the determination of lactic acid. *Analyst* 94:1151–1152.
- ROOKE, J.A.; HATFIELD, R.D. 2003. Biochemistry of ensiling. *Silage science and technology*, v. 42, p. 95-139, 2003.
- RUSSELL, J.R.; IRLBECK, N.A.; HALLAUER, A.R.; BUXTON, D.R. 1992. Nutritive value and ensiling characteristics of maize herbage as influenced by agronomic factors. *Animal feed science and technology*, 38(1), 11-24.
- SÁ , J.C.M.; CERRI, C.C.; Dick, W.A.; Lal, R.; Filho, S.P.V.; Piccolo, M.C.; Feigl, B.E. 2001. Organic matter dynamics and carbon sequestration rates for a tillage chronosequence in a Brazilian Oxisol. *Soil Science Society of America Journal*, 65(5), 1486-1499.
- SCHMIDT, P. 2006. Perdas fermentativas na ensilagem, parâmetros digestivos e desempenho de bovinos de corte alimentados com rações contendo silagens de cana-de-açúcar. Piracicaba. Universidade de São Paulo, 2006. 228p. Tese (Doutorado em Agronomia). USP. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- SODERLUND, J. U.; CURRAN B.; NUZBACK, L. 2006. Influence of maturity on yield and quality of HMEC. S.D. DuPont Pioneer Nutritional Insights. Ed. 2.

- SUZZI, G., L. GRAZIA, AND G. FERRI. 1990. Studies on isobutyric acid-producing bacteria in silage. *Lett.Appl. Microbiol.* 10:69-72.
- TAYLOR, C.C.; KUNG, L. Jr. 2002. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation and aerobic stability of high moisture corn in laboratory silos. *J Dairy Sci.* Jun;85(6):1526-32. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74222-7. PMID: 12146485.
- VIEIRA FILHO, J.E.R.; FISHLOW, A. 2017. Agricultura e indústria no Brasil: inovação e competitividade.
- WEISS, K.; 2009. Novel results on the occurrence of volatile compounds in maize silages. In: *Proceedings of the XVth International Silage Conference*. Madison, WI.
- WOOLFORD, M.K. 1975. Microbiological screening of the straight chain fatty acids (C1-C12) as potential silage additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 26, n. 2, p. 219-228,