



**JULIANA FÁVARO DO PRADO**

**EFEITO DE INOCULANTE BACTERIANO E ADITIVO  
QUÍMICO EM SILAGENS DE GRÃOS DE MILHO  
REIDRATADO**

**LAVRAS – MG  
2023**

**JULIANA FÁVARO DO PRADO**

**EFEITO DE INOCULANTE BACTERIANO E ADITIVO QUÍMICO EM SILAGENS  
DE GRÃOS DE MILHO REIDRATADO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Universidade Federal de Lavras, como parte  
das exigências do Curso de Zootecnia, para a  
obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Thiago Fernandes Bernardes  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2023**

**JULIANA FÁVARO DO PRADO**

**EFEITO DE INOCULANTE BACTERIANO E ADITIVO QUÍMICO EM SILAGENS  
DE GRÃOS DE MILHO REIDRATADO**

**EFFECT OF BACTERIAL INOCULANT AND CHEMICAL ADDITIVE ON  
REHYDRATED CORN GRAIN SILAGES**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Universidade Federal de Lavras, como parte  
das exigências do Curso de Zootecnia, para a  
obtenção do título de Bacharel.

Dr. Prof. Thiago Fernandes Bernardes UFLA

Msc Robson Leandro Ferreira

Dr Luciana Miranda Lima

UFLA

INSILO CONSULTORIA

Dr. Prof. Thiago Fernandes Bernardes  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2023**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida por sempre iluminar o meu caminho e por ter concedido a oportunidade e possibilidade de chegar onde estou. À minha família por tudo que fizeram para realização deste sonho, meus pais Ricardo e Cintia, que com muita paciência e amor não mediram esforços durante minha trajetória e sempre estiveram comigo em todas as escolhas. As minhas irmãs Taciana e Isabela, obrigada pela amizade e apoio. Ao meu avô Rafael e minha avó Janete muito obrigada por me acolherem a todo o momento. Ao Nicolas, você fez com que tudo fosse mais leve e estive todo tempo ao meu lado, obrigada.

À Universidade Federal de Lavras e ao departamento de zootecnia, que possibilitou minha formação profissional, obrigada pelos aprendizados durante todos esses anos. Ao meu orientador Thiago Fernandes Bernardes o qual aprendi muito, obrigada pelas oportunidades, ensinamentos e conselhos. Ao NEFOR, núcleo que me dediquei durante esses anos e pude aprender muitas coisas e conhecer muitas pessoas que levarei junto comigo, em especial ao amigos que fiz, Marcus, Sérgio e Vinícius.

À república Saia Justa, minha segunda família. Obrigada pelos melhores momentos que vivi em Lavras, estarei sempre aqui para o que precisarem. À 035 produções, Lelé, Igor, Thiago, Leandrinho, Cirilo, Keila, Drop, Beijo, levarei amizade de vocês pra sempre. À Barall Consultoria, Varal, obrigada pelos ensinamentos que compartilhou comigo durante a trajetória, sou muito grata. Julice, que por anos dividiu e compartilhou a vida comigo, você vai fazer falta. E a todos que possibilitaram esta empreitada, o meu muito obrigada.

## RESUMO

As silagens de grãos reconstituídos de milho são alimentos altamente propensos ao processo de deterioração, acarretando grandes perdas do alimento durante o desabastecimento. Dentre as tecnologias para prevenir a deterioração aeróbia está o uso de aditivos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de um inoculante bacteriano e um sal de ácido orgânico sobre as características fermentativas, produtos da fermentação, contagem de microrganismos e estabilidade e deterioração aeróbia em silagens de grãos de milho reconstituídos. O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Lavras. O grão apresentou matéria seca (MS) de 90% no momento da ensilagem. Os tratamentos incluíram silagem de grão de milho reconstituído sem aditivo (CONTROLE), silagem de grão de milho reconstituído inoculada com cepas de bactérias *L. plantarum*MTD/1 e *L. buchneri*PJB/1 em duas dosagens: padrão (ECO-STD; 1 g inoculante / ton de massa ensilada) e 1,5\*STD (ECO-1,5); e silagem de grão de milho reconstituído com aditivo químico (benzoato de sódio; BS) na dosagem 2 g aditivo / kg massa ensilada. A taxa de reidratação foi de 400 L H<sub>2</sub>O/ton de grão. Foi compactado, média, 5,479 ± 0,138 kg de milho moído em silos experimentais de 5 L, alcançando uma densidade média de 1,034 ± 26,04 kg.m<sup>-3</sup>. As silagens confeccionadas permaneceram estocadas durante 90 dias. Após a estocagem, os silos foram pesados, abertos e coletada amostras para determinação dos teores de matéria seca (MS), pH (abertura e pós-estabilidade), perdas de MS (PMS na abertura e pós-estabilidade), produtos finais da fermentação, contagem de microrganismos (leveduras, fungos filamentosos e bactérias do ácido lático), estabilidade e deterioração aeróbia. As PMS calculadas por diferença entre o peso inicial e final das silagens no início e no final do processo de ensilagem e do teste de estabilidade aeróbia. O delineamento foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e sete repetições. Os dados foram analisados utilizando o PROC MIXED do programa estatístico SAS. As médias foram estimadas pelo “LSMEANS” e a comparação foi realizada pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. O pH na abertura e contagem de fungos filamentosos não diferiram entre as silagens ( $P > 0,05$ ). O teor de MS ( $P = 0,001$ ), PMS na ensilagem ( $P < 0,001$ ) e pós-abertura ( $P = 0,001$ ), contagem de leveduras ( $P < 0,0001$ ), concentração de etanol ( $P < 0,0001$ ) e deterioração aeróbia ( $P < 0,0001$ ) foram menores para o tratamento BS em relação aos demais tratamentos. A associação dos resultados dessas variáveis demonstra que silagens inoculadas com benzoato de sódio tiveram menores perdas durante e após o processo de ensilagem. A contagem de bactérias do ácido lático (BAL) foi maior ( $P < 0,0001$ ) nas silagens inoculadas do que às silagens CONTROLE e BS. Contudo, não foi observado diferença entre as silagens ECO-STD e ECO-1.5. As concentrações de ácido lático ( $P < 0,0001$ ) e acético ( $P < 0,0001$ ) foram maiores para as silagens inoculadas com cepas de BAL. Observou-se maior ( $P < 0,0001$ ) concentração de 1,2-propanodiol na silagem ECO-1.5 em comparação às demais. O tempo de estabilidade aeróbia não diferiu ( $P < 0,0001$ ) entre as silagens inoculadas. Ambos os aditivos se mostraram eficazes em melhorar a estabilidade aeróbia e controlar o crescimento de leveduras na silagem. A silagem BS mostrou ser mais eficaz em reduzir as perdas durante e após o processo de ensilagem em comparação às silagens inoculadas com cepas de BAL.

**Palavras-chave:** Estabilidade aeróbia. *Lactobacillus buchneri*. Reidratação. Sal de ácido orgânico. Silagem de milho.

## ABSTRACT

Rehydrated corn grain silages are feeds that have a low aerobic stability during feed-out phase, where the deterioration process reduces the silage nutritive value. Additives are commonly used to prevent the deterioration process in silages. The aim with this study was to evaluate the effect of a bacterial inoculant and a chemical additive on fermentative profile, fermentation end-products, microorganisms count, and deterioration and aerobic stability of rehydrated corn grain silages. The experiment was prepared at Universidade Federal de Lavras. The treatments were: silage without inoculant (CONTROL); silage inoculated with *L. plantarum* MTD/1 and *L. buchneri* PJB/1 on two doses: standard (ECO-STD; 1 g inoculant / ton of grain) and 1.5\*STD (ECO-1.5); and silage inoculated with sodium benzoate (SB; 2 g chemical additive / kg of grain). The rehydration rate was 400 L H<sub>2</sub>O / ton of grain. An average of 5.479 ± 0.138 kg of corn grain were packed in experimental silos (5L), reaching an average density of 1.034 ± 26,04 kg.m<sup>-3</sup>. The storage time was 90 days. The silos were weighted, opened and samples were collected to determine dry matter (DM) concentration, pH, DM loss, fermentation end-products, microorganisms count, (yeasts, molds, lactic acid bacteria), deterioration and aerobic stability. A completely randomized design was used with four treatments and seven replications. The data were analyzed by PROC MIXED on SAS statistical program. The means were estimated by “LSMEANS” and the average were compared by Tukey test with 5% of significance. All silages had similar pH values in the silos opening and molds count ( $P > 0.05$ ). The DM content ( $P = 0,001$ ), DM loss during storage time ( $P < 0,001$ ) and post-opening ( $P = 0,001$ ), yeast count ( $P < 0,0001$ ), ethanol ( $P < 0,0001$ ) and aerobic deterioration ( $P < 0,0001$ ) were lower in SB silages. The association among those results demonstrated that inoculation with SB provides silages with lower losses during and after the ensiling process. Lactic acid bacteria (LAB) count, lactic acid ( $P < 0,0001$ ), and acetic acid ( $P < 0,0001$ ) concentration were higher in inoculated silages with LAB strains ( $P < 0,0001$ ). Regarding LAB count, no difference was observed between ECO-STD and ECO-1.5 silages. Silages ECO-1.5 produced more 1,2-propanediol ( $P < 0,0001$ ) in comparison to other silages. The inoculation with LAB strains and SB provided silages with similar aerobic stability ( $P < 0,0001$ ). The bacterial and chemical additive inoculation were effective to improve the aerobic stability and reducing the yeast count in silages. The losses during the ensiling process and after the silos opening were better reduced with SB inoculation than LAB strains.

**Keywords:** Aerobic stability. *Lactobacillus buchneri*. Rehydration. Organic acid salts. Corn silage.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
<b>2.1 Silagem de milho</b> .....	9
<b>2.2 Fatores que influenciam na deterioração aeróbia em silagens</b> .....	10
<b>2.3 Aditivos químicos e inoculantes bacterianos para silagens</b> .....	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
<b>3.1 Preparo das silagens e tratamentos</b> .....	15
<b>3.2 Análises e preparo das amostras</b> .....	17
<b>3.3 Análise estatística</b> .....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	19
5 CONCLUSÃO.....	23
REFERÊNCIAS .....	24

## 1 INTRODUÇÃO

A busca por fontes de alimentos que supram às exigências nutricionais dos animais e que sejam economicamente viáveis é fundamental para uma maior eficiência produtiva e econômica na pecuária mundial. A técnica de reidratação do grão de milho tem possibilitado melhorias no padrão de fermentação e nos aspectos nutritivos, além de trazer como vantagem sua produção em qualquer época do ano, uma vez que o grão pode ser adquirido comercialmente, estocado e posteriormente reidratado na própria fazenda.

A silagem de grãos reconstituídos de milho é um alimento que passa por um intenso processo de fermentação, produzindo ácido láctico e se tornando um alimento propício ao processo de deterioração (PAHLOW et al., 2003). As leveduras são os principais responsáveis por esse processo, pois degradam o ácido láctico da silagem durante a etapa de desabastecimento do silo, formando etanol (ALLEN et al., 2003). Redução do valor nutritivo, aumento das perdas de MS, formação de outros compostos orgânicos como etanol são alguns dos efeitos negativos que podem ser observados em silagens durante o processo de deterioração (BORREANI et al., 2018). Logo, tal processo em silagens de grãos de milho reconstituídos é tido como o principal problema que afeta o alimento que será fornecido aos animais.

Atualmente, algumas tecnologias estão disponíveis no mercado para minimizar tal processo durante o desabastecimento do silo, que é o caso de inoculantes bacterianos e aditivos químicos (sais de ácidos orgânicos). Inoculantes bacterianos que contém bactérias heterofermentativas em sua composição são desejáveis durante o processo de ensilagem, bem como sais de ácidos orgânicos, pois atuam sobre os microrganismos deterioradores no pós-abertura (MUCK et al., 2018). Somado a isso, sais de ácidos orgânicos como o benzoato de sódio também apresentam o mesmo efeito antifúngico quando aplicados na silagem. Porém, pouquíssimos são os trabalhos na literatura que avaliam tais aditivos (bacteriano vs químico) em silagens de grãos reconstituídos.

Diante disso, objetivou-se avaliar o efeito de um inoculante bacteriano composto pela combinação entre *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus buchneri* um sal de ácido orgânico (benzoato de sódio) sobre as características fermentativas, contagem de microrganismos, estabilidade e deterioração aeróbia em silagens de grãos de milho reconstituídos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Silagem de milho

A cultura do milho (*Zea mays*) é uma importante fonte de forragem para ruminantes (BERNARDES E RÊGO, 2014). É uma forragem de alta energia e baixa proteína comumente usada para crescimento e terminação de bovinos de corte, como energia suplementar para produção de vacas e bezerros, para vacas leiteiras em crescimento e para vacas leiteiras em lactação. Além disso, a silagem de milho também fornece uma fibra fisicamente efetiva para os animais.

Uma grande vantagem da silagem é que a produção de matéria seca (MS) é frequentemente maior do que a maioria das forragens alternativas. Os altos rendimentos reduzem a área de terra necessária para a produção de forragem, permitindo o cultivo de safras alternativas ou a alimentação de um maior número de animais. Em áreas onde a seca e as geadas prematuras não são um problema frequente, os riscos associados à produção de silagem são relativamente baixos em comparação com algumas outras culturas forrageiras. Além disso, a qualidade da forragem da safra não diminui tão rapidamente com a maturidade como algumas outras safras forrageiras (ALLEN et al., 2003).

Como a colheita da silagem ocorre algumas semanas antes da colheita dos grãos em muitas áreas, a silagem fornece um período prolongado para colher a safra de milho e distribuir as necessidades de mão de obra no outono. A colheita e o manuseio da silagem podem ser altamente mecanizados e os custos de mão-de-obra para a colheita são reduzidos porque ela é colhida uma vez, em comparação com várias vezes por ano para forragens perenes. Outra grande vantagem do milho como cultura forrageira é que os produtores têm certa flexibilidade na colheita do milho para forragem ou grãos. Nos anos em que a safra é boa, o excesso de milho pode ser colhido para grãos; da mesma forma, quando os rendimentos de milho são baixos, a maior parte da safra pode precisar ser colhida para silagem.

Do ponto de vista fermentativo, o milho é a cultura que possui características consideradas ideais (concentração de MS, teor de carboidratos solúveis e baixo poder tampão) para um adequado perfil de fermentação durante a estocagem do material (ALLEN et al., 2003). Além disso, o milho também possui uma grande flexibilidade para produção de outras silagem, tais como: silagem de planta-inteira e silagem de grãos (úmidos, reidratados e espigas) de milho.

Em relação à silagem de grãos de milho, esta tem ganhado bastante destaque nos sistemas de produção animal de corte e leite, principalmente pelas vantagens econômicas e nutricionais que esse alimento proporciona na dieta (BERNARDES et al., 2018). A inclusão de um alimento com melhor digestibilidade do amido e a substituição de concentrado na dieta pela silagem são os principais benefícios que esse tipo de alimento consegue proporcionar na propriedade (BERNARDES et al., 2018).

Diferente da silagem de planta inteira, como propriamente dito, a silagem de grãos corresponde ao processo de ensilagem apenas dos grãos da planta. O fato de ensilar apenas os grãos traz uma ligeira desvantagem no que diz respeito a disponibilidade de carboidratos solúveis em água para fermentação. Diante disso, as BAL utilizam de vias alternativas de metabolização de outros compostos a serem utilizados como substratos para o seu metabolismo. A atividade proteolítica das BAL é o principal mecanismo utilizado para a obtenção do substrato, a partir da quebra da proteína do grão do milho (JUNGES et al., 2017; HOFFMAN et al., 2011).

Dentre os pontos negativos desse tipo de alimento, um dos fatores mais preocupantes consiste no processo de deterioração. Silagens de grãos de milho são fortemente acometidos por atividades de microrganismos deterioradores durante o pós-abertura, devido a atividade metabólica de leveduras e fungos filamentosos. Diante disso, tecnologias devem ser adotadas durante o planejamento da ensilagem com o propósito de reduzir a perda do alimento durante o desabastecimento do silo. Diversas são as tecnologias e métodos de manejo que podem ser adotadas durante a retirada da silagem, dentre elas, o uso de aditivos para silagem.

## **2.2 Fatores que influenciam na deterioração aeróbia em silagens**

A ação de microrganismos deterioradores depende diretamente de condições relacionadas ao alimento e ao ambiente o qual estão inseridos, podendo classificar os fatores que agem sobre a multiplicação dos microrganismos em intrínsecos e extrínsecos, respectivamente, bem como a interação entre eles no crescimento e desenvolvimento microbiano (GAVA et al., 2008).

Entre as características inerentes as silagens de grãos de milho, podem ser destacados como fatores intrínsecos a atividade de água, o pH, substratos disponíveis para fermentação (carboidratos e ácidos), contagem inicial de microrganismos, entre outros fatores, que influenciam no processo de deterioração (FIORDA; SIQUEIRA, 2009). Entre os fatores inerentes ao meio, a multiplicação dos microrganismos pode ser influenciada por fatores do

ambiente, tais como: temperatura, umidade e a presença de oxigênio, visto que os principais microrganismos que iniciam o processo de deterioração são considerados aeróbios (PAHLOW et al., 2003; FRANCO; LANDGRAF, 2005).

A atividade de água nos alimentos é um dos fatores considerados determinantes no processo de deterioração e na intensidade em que esta ocorre (CELESTINO, 2010). Diferentemente do teor de umidade presente na silagem, a atividade de água é a quantidade de água disponível (água livre) para o crescimento dos microrganismos e indispensável para as funções biológicas da célula microbiana, como reações enzimáticas e químicas (SOUZA et al., 2013), e não necessariamente apresenta uma relação direta com a umidade presente na silagem.

O pH do meio também é tido como outro fator determinante no crescimento, sobrevivência ou destruição das células microbianas, onde cada espécie possui uma faixa de pH considerada ótima para seu crescimento. A grande maioria dos microrganismos deterioradores apresentam uma faixa de pH ótima próximo à neutralidade (6,6 – 7,5) (SOARES et al., 2010; TORTORA et al., 2017).

As variações no pH podem diminuir a velocidade com que ocorrem as reações químicas em função da destruição de enzimas celulares, afetando o crescimento e a sobrevivência do microrganismo (ORIJ et al., 2011). Diferentes ácidos podem ter maior ou menor eficiência sobre as células microbianas, permitindo o seu crescimento mesmo em ambientes mais ácidos. Um dos fatores determinantes para a atuação dos ácidos está no seu valor de pKa, o qual influencia na concentração do ácido na forma não dissociada capaz de penetrar a célula e alterar o metabolismo dos microrganismos (McDONALD et al., 1991).

A presença de nutrientes disponíveis na silagem é outro fator importante no crescimento dos microrganismos, pois estes assimilam os nutrientes para a geração de energia, biossíntese e divisão celular (BOER et al., 2010). De modo geral, os principais nutrientes utilizados pelos microrganismos para produção de energia são os açúcares simples, como a glicose, sendo que algumas espécies de leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, são capazes de degradar carboidratos mais complexos como o amido (PAHLOW et al., 2003; COUTINHO et al., 2013). Em se tratando de silagens de milho, o ácido lático é o principal substrato utilizado no metabolismo de leveduras. A contagem de microrganismos, por sua vez, pode acarretar numa maior intensidade do processo de deterioração em virtude de uma maior diversidade de microrganismos presentes nos ingredientes que compõem a dieta (HAO et al., 2015), bem como do nível de contaminação inicial dos alimentos.

A temperatura ambiente é o fator ambiental que mais afeta no crescimento e multiplicação da população microbiana, pois é um fator que apresenta forte relação com a velocidade específica máxima de crescimento e a fase lag do crescimento microbiano (OLIVEIRA et al., 2013). Assim como os outros fatores, a temperatura também apresenta faixas consideradas ótimas para o crescimento microbiano.

A taxa de crescimento tende a aumentar rapidamente à medida que a temperatura chega ao valor ótimo de um determinado microrganismo, porque a velocidade das reações enzimáticas da célula cresce diretamente proporcional ao aumento da temperatura, ocorrendo uma maior taxa de divisões celulares (RATKOWSKY et al., 1982). Em regiões de clima quente, a temperatura ambiente pode intensificar o metabolismo das células microbianas, catalisando essas reações enzimáticas.

O processo de deterioração depende, em geral, da interação entre os microrganismos e os fatores considerados importantes para a atividade metabólica das células microbianas. Contudo, a preservação da silagem quando fornecida pode ser realizada, principalmente, a partir da interferência dos fatores inerentes ao alimento, conseqüentemente na atuação dos microrganismos deterioradores com o uso de aditivos químicos ou inoculantes bacterianos no processo de ensilagem.

### **2.3 Aditivos químicos e inoculantes bacterianos para silagens**

Aditivos químicos e inoculantes bacterianos podem ser entendidos como produtos que irão atuar em algum processo ou etapa durante ou após a produção de silagem. De modo geral, aditivos químicos consistem em compostos orgânicos (e.g. ácidos acético e propiônico) ou sais (e.g. benzoato de sódio), enquanto inoculantes bacterianos é formado por um conjunto de bactérias que irão atuar tanto na fermentação durante a estocagem da forragem quanto na etapa de desabastecimento da silagem.

A silagem é um alimento que parte da fermentação dos açúcares presentes na forragem no momento da colheita por microrganismos desejáveis que conservam a massa em condições de baixo pH e ausência de oxigênio (anaerobiose) (PAHLOW et al., 2003). Diferentes forragens proporcionam diferentes padrões de fermentação (McDONALD et al., 1991), contudo, é sabido e bastante elucidado na literatura que as bactérias do ácido lático (BAL) são os principais microrganismos que dominam o processo de fermentação nas mais diversas silagens.

Em se tratando de silagens de grãos reconstituído, o bom manejo das etapas de ensilagem garante um bom padrão de fermentação quando são ensilados, o que não necessariamente demandará de recursos para melhorar o seu perfil de fermentação ao longo da estocagem. Por outro lado, um dos principais problemas que acometem as silagens refere-se as perdas do alimento que ocorrem quando esta é exposta ao oxigênio. Dentre as etapas de ensilagem, o período de desabastecimento é a mais crítica, possibilitando maiores perdas de silagem em comparação às etapas iniciais em situações de mal manejo (BORREANI et al., 2018).

O processo de perdas ocorre em função da atividade metabólica de diversos microrganismos aeróbios deterioradores considerados indesejáveis ao processo de ensilagem, principalmente leveduras e fungos filamentosos na etapa de desabastecimento (PAHLOW et al., 2003). As leveduras são os principais microrganismos responsáveis por esse processo, por degradarem o ácido lático produzido durante a estocagem (WOOLFORD, 1984). Aliado a isso, silagens de grãos de milho reconstituídos podem ter uma tendência a um processo de deterioração mais intenso, devido as elevadas concentrações de ácido lático produzido durante o armazenamento, conseqüentemente maior contagem de microrganismos deterioradores (CARVALHO et al., 2017). Uma das principais formas de controlar o processo de deterioração consiste no uso de inoculantes ou aditivos químicos na ensilagem.

As BAL homofermentativas são o grupo de bactérias mais antigos utilizados como inoculante bacteriano para silagem. As principais cepas que pertencem a esse grupo são as *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecium* e espécies de *Pediococcus* (MUCK et al., 2018). A fermentação láctica basicamente consiste na oxidação anaeróbia com a produção final de ácido lático além de outras substâncias orgânicas. É processo microbiano de grande importância na conservação de alimentos, visto que as BAL são o principal grupo de microrganismos que atuam nesse processo (McDONALD, 1991; ROOKE e HATFIELD, 2003). A principal via metabólica desses microrganismos segue o esquema de Embden-Meyerhof nas etapas para piruvato seguido por uma desidrogenação deste produto para produzir lactato, onde a via glicolítica é o principal mecanismo da fermentação homoláctica (NELSON e COX, 2014).

Os principais efeitos que podem ser observados com esse tipo de inoculação consistem em: menores valores de pH, maiores concentrações de ácido lático e maior recuperação de matéria seca em comparação a silagens não inoculadas (MUCK et al., 2018). O mesmo efeito pode ser observado também em silagem de grãos reidratados de milho, ainda que algumas diferenças particulares possam ser observadas.

Inoculantes bacterianos composto por cepas de BAL heteroláticas (facultativas ou obrigatórias) consistem em grupos de microrganismos que possuem a via heterolática ou homo/heterolática e sua grande maioria pertencem ao gênero *Lactobacillus*. Essas bactérias podem ser divididas em quatro grupos, sendo o grupo das *Lactobacillus buchneri* o mais avaliado em relação a seus efeitos sobre a fermentação da silagem (MUCK et al., 2018). Dependendo do substrato e da via de fermentação, diferentes tipos e proporções dos produtos finais da fermentação são produzidos.

Em se tratando da fermentação da glicose por BAL heterofermentativas, a via da hexose monofosfato é a principal rota utilizada pelos microrganismos. (WOOLFORD, 1984). Nessa, se a glicose for o substrato, um mol de glicose é dividido assimetricamente para produzir um mol de lactato, etanol e dióxido de carbono; por outro lado, se a frutose for usada, então a cada três moles de frutose será produzido um mol de lactato, acetato e dióxido de carbono e dois moles de manitol.

Outra via metabólica de degradação de glicose que também pode ser utilizada por BAL é a fosfoctolase. O metabolismo da glicose através dessa via produz uma molécula de piruvato, uma molécula de acetil fosfato e uma molécula de CO<sub>2</sub>. Após a glicólise de Embden-Meyerhof, essa via é a mais importante na produção de silagem e é a rota primária para o catabolismo de açúcares pentose (ROOKEe HATFIELD, 2003).

É importante ressaltar a presença de outra via metabólica que pode ser utilizada pelas BAL para degradação de pentoses, denominada via da pentose fosfato (NELSONeCOX 2014; WOOLFORD, 1984). Diferentemente da via da fosfoctolase, a pentose fosfato inicia-se com uma molécula de pentose e não a glicose, por exemplo, um mol de arabinose ou xilose produz um mol de lactato e acetato. Vale destacar também que, independentemente da rota metabólica e do tipo de substrato, a formação de CO<sub>2</sub> é comum para todas as bactérias, característico da via de fermentação heterolática desses microrganismos.

Os principais efeito que pode ser observado com a inoculação de BAL heterolática consiste no aumento da estabilidade aeróbia das silagens, maiores concentrações de ácido acético, inibição de microrganismos deterioradores e redução das perdas de MS no pós-abertura (MUCK et al., 2018). Em se tratando especificamente do metabolismo de *L. buchneri*, OudeElferink et al. (2001) mostraram que o aumento do ácido acético não ocorre através da via clássica da fosfoctolase, mas através da conversão anaeróbia de ácido láctico em ácido acético e 1,2-propanodiol.

De modo geral, a ação antifúngica tanto do ácido acético quanto do ácido benzoico fundamenta-se no princípio de que as moléculas de ácido não dissociado são lipofílicas e

passam facilmente através da membrana plasmática por difusão; no citoplasma, com o pH próximo a 7, as moléculas de ácido são dissociadas em ânions carregados e prótons (McDONALD et al., 1991). Por estarem desprotonadas depois que entram da célula, não podem atravessar a bicamada lipídica e se acumulam no citoplasma, diminuindo assim o pH interno, acidificando-o e inibindo o metabolismo, em particular, as enzimas da glicólise (SALMOND et al., 1984).

Os aditivos químicos são produtos formados de forma sintética formado por ingredientes ativos, que incluem os ácidos orgânicos e os sais de ácidos orgânicos. Diferentemente dos inoculantes bacterianos, os aditivos químicos possuem em sua composição os principais produtos finais da fermentação das bactérias, e que não precisam ser metabolizados, visto que são prontamente adicionados na silagem. Similar aos inoculantes bacterianos, os aditivos químicos possuem forte dependência da taxa de aplicação, o que irá influenciar nos resultados posteriores. Além disso, diferentes composições dos aditivos químicos acarretarão efeitos específicos em silagens.

O ácido benzoico é um dos conservantes químicos mais antigos usados nas indústrias de alimentos e posteriormente foi introduzido em estudos envolvendo sua utilização em silagens. O benzoato de sódio, bem como outros sais de ácido benzoico (e.g. benzoato de potássio e de cálcio), são produzidos industrialmente a partir do ácido benzoico por neutralização com seus hidróxidos correspondentes ou por aquecimento com seus carbonatos concentrados correspondentes (OLMO et al., 2017).

De modo geral, esses compostos são usados principalmente como agentes antifúngicos, onde a maioria das leveduras e fungos filamentosos são inibidos (CHIPLEY, 2021). De forma similar ao ácido acético, a atividade antimicrobiana do ácido benzóico está relacionada à sua capacidade especificamente de reduzir o pH intracelular (SALMOND et al., 1984). Aliado ao fato da molécula não-dissociada do ácido benzóico ser o responsável pela atividade antimicrobiana contra bactérias em meio ácido, apenas os ácidos orgânicos lipofílicos apresentam essa característica.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Preparo das silagens e tratamentos**

O experimento aconteceu no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no estado de Minas Gerais. A obtenção do grão de milho foi de forma comercial, em que ele apresentava teor de umidade de 10% e moído em peneira de 5 mm.

Os tratamentos incluíram silagem de grão de milho reconstituído sem aditivo (CONTROLE), silagem de grão de milho reconstituído inoculada com cepas de bactérias *L. plantarum*MTD/1 e *L. buchneri*PJB/1 em duas dosagens: padrão (ECO-STD; 1 g inoculante / ton de massa ensilada) e 1,5\*STD(ECO-1,5); e silagem de grão de milho reconstituído com aditivo químico (benzoato de sódio; BS) na dosagem 2 g aditivo / kg massa ensilada. As silagens confeccionadas permaneceram estocadas durante 90 dias.

A aplicação dos inoculantes foi realizada logo após a moagem do milho, antes da compactação das silagens. Para os tratamentos com cepas de BAL foi realizada uma pré-diluição do produto adicionando 600 ml de água em 100 g de inoculante. Posteriormente, foi retirada uma alíquota de 0,24 ml do inoculante pré-diluído para os tratamentos com ECO-STD e 0,36 ml para o tratamento ECO-1,5, adicionados em 16 litros de água e aplicados no milho moído, alcançando um teor de matéria seca de 66%. Para o tratamento BS, o aditivo foi diluído diretamente na água para reidratação obedecendo a dosagem posteriormente citada.

Foram utilizados 40 kg de milho por tratamento e a aplicação do inoculante foi realizada por irrigação manual, juntamente com a reidratação, seguida da homogeneização do material. Para a reidratação foi utilizada a relação de 400 litros de água para cada tonelada de massa verde. Realizou-se duas coletas de cada tratamento antes dos grãos de milho serem compactados para posterior análise.

Após a aplicação dos tratamentos, foi compactado, em média,  $5,479 \pm 0,138$  kg de milho moído em silos experimentais com capacidade de 5 litros, alcançando uma densidade média de  $1.034 \pm 26,04 \text{ kg.m}^{-3}$ . Foram preparadas sete repetições para cada tratamento. A compactação foi realizada de forma manual e os silos experimentais foram vedados com tampa e silicone e, por fim, pesados. Passados os 90 dias de estocagem, os silos foram pesados e abertos. A camada superficial com sinais de deterioração de cada unidade experimental foi completamente removida e descartada e a silagem de grão de milho reconstituído remanescente foi retirada e homogeneizada.

Determinados em duplicadas as amostras coletadas foram analisadas quanto as concentrações de MS, perdas de matéria seca (PMS) na ensilagem e pós-abertura, pH (abertura e pós-estabilidade), produtos finais da fermentação e contagem de microrganismos. Posteriormente a silagem foi submetida a um teste de estabilidade e deterioração aeróbia, utilizando 3 kg de silagem para cada unidade experimental, expostas ao ar durante 7 dias, em

temperatura ambiente (24,5 °C), utilizando caixas de isopor, com dimensões de 25,5 cm x17,5 cm.

Uma folha de alumínio foi colocada em cada caixa de isopor para reduzir a perda excessiva de umidade e possíveis contaminações por elementos externos. A temperatura, tanto da sala quanto das silagens, foi registrada a cada 15 minutos por meio de dataloggers, sendo 1 datalogger para cada caixa de isopor e 3 para o ambiente. A estabilidade aeróbia foi definida como o tempo total, em horas, antes de atingir uma temperatura de 2 °C acima da temperatura ambiente (MORAN et al., 1996). A deterioração aeróbia das silagens foi definida como o somatório da temperatura acumulada, em °C, a partir do momento em que houve a quebra da estabilidade das silagens (CONAGHAN et al., 2010).

### **3.2 Análises e preparo das amostras**

O material pré-ensilado e as silagens foram divididas em duas subamostras. Uma subamostra foi pré-seca em estufa com circulação forçada de ar a 55 – 60°C por 72 horas para determinação da concentração de MS. A segunda subamostra do material pré-ensilado e das silagens foram armazenadas como amostras úmidas em freezer a –20°C. Na determinação dos valores de pH, foi retirado um extrato aquoso de cada amostra e feito a leitura em um potenciômetro (HI 2221, Hanna Instruments), utilizando um aparelho multiparâmetro (A214 pH / ISE Thermo Scientific Orion Star). Para obter o extrato aquoso, foram pesados 30 g de amostra e adicionados 270 ml de água destilada, homogeneizados durante 4 minutos, a 200 rpm, em um homogeneizador (Stomacher 400, Seward, London, UK), e então filtrados 50 ml do extrato aquoso para realizar a leitura do pH de cada amostra.

Na determinação dos produtos finais da fermentação, foram retirados 2 ml de amostra obtida a partir do extrato aquoso, onde foram centrifugadas, filtradas e injetadas em cromatógrafo de fase líquida de alta precisão (Shimadzu LC- 10Ai; ShimadzuCorp. Tokyo, Japão). Foram realizadas duas centrifugações de 10 minutos cada, a 10.000 rpm, a 4 °C. Os ácidos foram detectados pela absorbância do UV (210nm), e os álcoois foram identificados usando o detector de índice de refração (RID; 10ASPD-10Ai). O aparelho foi equipado com uma coluna de exclusão de íon (SUPELCO –SUPELCOGEL 8H-5cm-4,8mm) 28, operado a 30 °C com um fluxo de corrida de 0,5 ml/min com fase móvel água e ácido sulfúrico 0,005M.

A contagem de microrganismos (fungos filamentosos, leveduras e bactérias lácticas) foi realizado a partir do extrato aquoso obtido pela homogeneização de 30 g de amostra com 270 ml de água peptonada, agitada em um aparelho homogeneizador (Stomacher 400, Seward,

London, UK) por 4 minutos, a 200 rpm. Foi utilizada a técnica de plaqueamento em superfície para contagem dos microrganismos. Como meio de cultura para a contagem de fungos filamentosos e leveduras foi utilizado o meio YGC Agar (Fluka, Sigma Aldrich Química Brasil LTDA) e foram preparadas diluições em séries de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  em duplicata (TABACCO et al., 2009).

As placas permaneceram em uma câmara de germinação, a 28 °C, durante três e cinco dias para as contagens de leveduras e fungos filamentosos, respectivamente. Para a contagem de bactérias lácticas, foi utilizado o meio de cultura MRS Agar (de MAN, ROGOSA and SHARPE, Merck KGaA) juntamente com um agente antifúngico (nistatina), na relação de 4 ml por litro de meio de cultura, onde foram preparadas diluições em séries de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$ , também em duplicata (TABACCO et al., 2009). As placas permaneceram em estufa, a 37 °C, durante três dias para a contagem das bactérias. As colônias foram contadas com base nas suas características macromorfológicas.

As perdas de matéria seca ocorridas no processo de fermentação e pós-abertura foram calculadas por diferença entre o peso inicial e final das silagens no início e no final do processo de ensilagem e do teste de estabilidade aeróbia.

### 3.3 Análise estatística

Os dados de contagem de microrganismos foram transformados em  $\log_{10}$ . O delineamento experimental foi inteiramente casualizados, com quatro tratamentos e sete repetições, totalizando 28 unidades experimentais. Os dados foram analisados utilizando o PROC MIXED do programa estatístico SAS. As médias dos tratamentos foram estimadas pelo “LSMEANS” e a comparação foi realizada pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Sendo,

$Y_{ij}$  = valor da variável referente à repetição que recebeu o tratamento  $i$ ;

$\mu$  = média geral;

$T_i$  = efeito fixo do tratamento  $i$

$e_{ij}$  = erro aleatório associado a cada observação  $Y_{ij}$

#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

As concentrações de MS, pH, perdas de MS na ensilagem, contagem de microorganismos e produtos finais da fermentação estão apresentados na Tabela 1. Os valores de pH e a contagem fungos filamentosos não diferiram entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ).

**Tabela 1** – Valores de MS, PMS na ensilagem, pH, contagem de microrganismos e produtos finais da fermentação de silagens de grãos de milho reconstituídos e tratados com inoculante bacteriano e aditivo químico.

Variáveis	Tratamentos <sup>1</sup>				EPM	P-valor
	CONTROLE	ECO-STD	ECO-1.5	BS		
<b>Matéria seca (%)</b>	63,8 a	64,2 a	64,1 a	62,6 b	1,11	0,001
<b>pH (abertura)</b>	3,86	3,86	3,88	3,90	0,01	0,07
<b><sup>2</sup>PMS ensilagem (% MS)</b>	1,07 a	1,02 ab	0,92 b	0,41 c	0,03	<0,001
<b>Leveduras (log UFC.g<sup>-1</sup>)</b>	3,468 a	2,540 b	2,762 b	< 2,000 c	0,18	<0,0001
<b>F. filamentosos (log UFC.g<sup>-1</sup>)</b>	1,58	1,28	1,58	1,58	0,11	0,17
<b>BAL (log UFC.g<sup>-1</sup>)</b>	3,98 b	6,48 a	6,83 a	4,59 b	0,17	<0,0001
<b>Ácido Lático (% MS)</b>	4,38 b	6,09 a	6,49 a	4,91 b	0,24	<0,0001
<b>Ácido Acético (% MS)</b>	1,06 b	1,88 a	2,07 a	0,93 b	0,07	<0,0001
<b>Etanol (% MS)</b>	1,48 a	1,15 b	1,06 b	0,22 c	0,04	<0,0001
<b>1,2-propanodiol (% MS)</b>	0,00 b	0,05 b	0,13 a	0,02 b	0,01	<0,0001

<sup>1</sup>CONTROLE = silagem sem inoculante; ECO-STD = silagem inoculada com cepas de *Lactobacillus plantarum* *Lactobacillus buchneri* dosagem padrão (1 g inoculante / ton de massa ensilada); ECO-1.5 = silagem inoculada com cepas de *Lactobacillus plantarum* *Lactobacillus buchneri* dosagem padrão x 1.5; BS = silagem com adição de benzoato de sódio (2 g aditivo /kg de massa ensilada); <sup>2</sup>Perdas de MS por gases;

No momento da abertura do silo, o teor de MS das silagens foi menor ( $P = 0,001$ ) para o tratamento BS em relação aos demais tratamentos. O benzoato de sódio é um sal de ácido orgânico solúvel em água e, ao contrário do ácido láctico, o ácido benzoico liberado não é responsável por redução de pH do meio, mas sim em controlar crescimento de microrganismos (CHIPLEY, 2021). Somado a isso, o ácido benzoico possui apenas função parcial no controle de bactérias, não controlando totalmente o crescimento desses microrganismos (CHIPLEY, 2005). Essas características provavelmente podem ter impactado na redução da concentração de MS das silagens no momento da abertura, visto que bactérias aeróbias possivelmente podem ter contribuído no aumento de PMS nos primeiros dias de ensilagem. O ácido láctico é um composto químico que consegue reduzir o pH do meio e, através disso, controlar a atividade metabólica da maioria dos microrganismos (WOLFORD, 1984). A inoculação com cepas de BAL homofermentativas possivelmente contribuiu com esse fato nas primeiras horas do período de estocagem.

Diferente dos sais de ácidos orgânicos, as cepas de bactérias BAL necessitam realizar a fermentação dos açúcares presentes no alimento ensilado. No caso das heterofermentativas (*L. buchneri*), essas bactérias apresentam a via de fermentação heterolática produzindo  $\text{CO}_2$  como um dos produtos finais da fermentação (WOOLFORD, 1984), o que reflete em perdas de MS durante a estocagem. Isso possivelmente explica a maior quantidade de PMS nas silagens inoculadas (ECO-STD e ECO-1.5) em comparação com as silagens BS ( $P < 0,001$ ).

A contagem de leveduras foi menor ( $P < 0,0001$ ) para o tratamento BS, sendo que as silagens ECO-STD e ECO-1.5 não diferiram entre si, mas tiveram menor contagem do que a silagem CONTROLE. Sais de ácidos orgânicos como o benzoato de sódio e bactérias heteroláticas são elucidados na literatura como aditivos que inibem o crescimento de microrganismos indesejáveis na fermentação, principalmente leveduras e fungos filamentosos (MUCK et al., 2018).

Bactérias heterofermentativas produzem o ácido acético a partir da metabolização de carboidratos solúveis ou, no caso da *L. buchneri*, pela conversão anaeróbia do ácido láctico em ácido acético, principal responsável por inibir o crescimento de leveduras em silagens (OUDE-ELFERINK et al., 2001). Como dito anteriormente, o benzoato de sódio é um sal e não precisa de um processo metabólico para liberar o seu ácido correspondente, no caso, o ácido benzoico. Ainda que ambos os ácidos apresentem função antifúngica, a menor contagem de leveduras nas silagens BS pode estar atrelado ao fato da liberação mais rápida do ácido benzoico durante a ensilagem, em comparação ao ácido acético. Bactérias heterofermentativas necessitam de um tempo mínimo para produzir o ácido acético em

concentrações mínimas, porém suficientes, para inibir o crescimento de leveduras, o que não consiste num efeito imediato após a aplicação do inoculante, como possivelmente pode ser observado na adição do benzoato de sódio durante a ensilagem (MUCK et al., 2018). Diante disso, a liberação mais rápida do ácido benzoico possivelmente contribuiu para a menor contagem de leveduras nas silagens.

Como esperado, a contagem de bactérias do ácido láctico (BAL) foi maior ( $P < 0,0001$ ) nas silagens inoculadas do que às silagens CONTROLE e BS. Contudo, não foi observado diferença entre as silagens ECO-STD e ECO-1.5. A não diferença entre as silagens inoculadas com cepas de BAL em diferentes doses pode estar atrelado à concentração de substratos solúveis disponíveis no material ensilado. A concentração de carboidratos não foi analisada no presente experimento, mas é sabido que silagens de grãos reidratados apresentam baixas concentrações de carboidratos durante a ensilagem (CARVALHO et al., 2017), o que possivelmente contribuiu para a mesma contagem de BAL nessas silagens.

As concentrações de ácido láctico ( $P < 0,0001$ ) e acético ( $P < 0,0001$ ) foram maiores para as silagens inoculadas com cepas de BAL. Tais resultados também eram esperados, visto que BAL são as principais responsáveis pelo aumento de ambos os ácidos em silagens. Bactérias homoláticas e heteroláticas produzem ácido láctico e ácido acético, respectivamente, como produtos finais da fermentação, o que justifica as maiores concentrações desses ácidos nessas silagens (WOOLFORD, 1984).

A concentração de etanol foi menor ( $P < 0,0001$ ) nas silagens BS. Produto oriundo da fermentação durante a ensilagem, o etanol pode ser formado a partir do metabolismo de leveduras e de BAL heterofermentativas (WOOLFORD, 1984). Nas silagens BS, a menor concentração de etanol possivelmente resulta da menor metabolização de carboidratos por leveduras, podendo ser evidenciado pela menor contagem desses microrganismos nas mesmas silagens. As silagens inoculadas com cepas de BAL possuem a *L. buchneri* em sua composição que é responsável pela formação de etanol durante seu metabolismo, o que pode ter contribuído para um aumento nas concentrações de etanol em comparação à silagem BS (WOOLFORD, 1984). Por fim, observou-se maior ( $P < 0,0001$ ) concentração de 1,2-propanodiol na silagem ECO-1.5 em comparação às demais. O 1,2-propanodiol é um álcool formado pelo metabolismo de *L. buchneri* relacionado à via de fermentação anaeróbia do ácido láctico (OUDE-ELFERINK et al., 2001). A maior concentração desse álcool possivelmente está associada à maior inoculação dessas cepas nas silagens, o que implica numa maior atividade metabólica desses microrganismos durante a estocagem.

As perdas de MS (PMS) na deterioração, pH pós-estabilidade, estabilidade e deterioração aeróbia estão apresentados na Tabela 2. As PMS na deterioração foram menores ( $P = 0,001$ ) para as silagens BS. Os valores de pH pós-estabilidade, por sua vez, foram maiores ( $P = 0,001$ ) nas silagens CONTROLE.

As PMS durante o pós-abertura são diretamente relacionadas à atividade de microrganismos deterioradores, em especial leveduras (BORREANI et al., 2018). Nas silagens BS, observou-se menor contagem de leveduras e a sua inibição perdurou mesmo após a exposição da silagem ao oxigênio devido à presença e ação do ácido benzoico.

**Tabela 2** – Valores de PMS na deterioração, pH pós-estabilidade, estabilidade e deterioração aeróbia de silagens de grãos de milho reconstituídos e tratados com inoculante bacteriano e aditivo químico.

Variáveis	Tratamentos <sup>1</sup>				EPM	P-valor
	CONTROLE	ECO-STD	ECO-1.5	BS		
<sup>2</sup> PMS (% MS)	6,01 a	4,51 a	4,87 a	0,00 b-	0,72	0,001
<sup>3</sup> pH (PE)	5,46 a	4,11 b	4,17 b	3,90 b	0,21	0,001
Estabilidade (h)	91 b	144 a	134 a	162 a	9,49	<0,0001
Deterioração (°C)	8,90 a	3,05 ab	4,47 ab	0,00 b	1,84	0,03

<sup>1</sup>CONTROLE = silagem sem inoculante; ECO-STD = silagem inoculada com cepas de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus buchneri* dosagem padrão (100 g inoculante / ton de massa ensilada); ECO-1.5 = silagem inoculada com cepas de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus buchneri* dosagem padrão x 1.5; BS = silagem com adição de benzoato de sódio (2 g aditivo /kg de massa ensilada); <sup>2</sup>Perdas de MS no pós-abertura; <sup>3</sup>pH no final do teste de estabilidade.

Não foram observados PMS durante o teste de estabilidade nessas silagens, o que mostra o grande potencial do benzoato de sódio sobre as PMS. Por outro lado, o mesmo não pode ser completamente observado nas silagens inoculadas com cepas de BAL pois não diferiram das silagens CONTROLE. Associado à ação do benzoato de sódio, observou-se que o pH manteve constante e com valores iguais ao da silagem logo após a abertura. O pH no pós-abertura é uma variável associada à atividade de leveduras, pois estas consomem o ácido láctico no seu metabolismo, ácido este responsável pela redução do pH (BORREANI et al., 2018). Em outras palavras, a menor presença de leveduras associada com a menor atividade metabólica relaciona-se diretamente com menores valores de pH durante o pós-abertura. Nas silagens inoculadas com cepas de BAL, as mesmas apresentaram valores de pH menores em comparação à silagem CONTROLE. Em comparação à silagem BS, podemos ressaltar que

um possível metabolismo de leveduras pode ter ocorrido mesmo com a presença do ácido acético, podendo ser evidenciado pelo maior pH das silagens inoculadas (ECO-STD e ECO-1.5).

O tempo de estabilidade aeróbia não diferiu ( $P < 0,0001$ ) entre as silagens inoculadas, ao passo que a deterioração aeróbia foi menor ( $P = 0,03$ ) para as silagens BS. As silagens BS tiveram mais de 162 horas de estabilidade, mas não diferiu das silagens inoculadas com cepas de BAL. Aliado a isso, as silagens BS não tiveram indícios de acúmulo de temperatura também não diferindo das silagens ECO-STD e ECO-1.5. Estes resultados implicam que, em termos de estabilidade e deterioração aeróbia, ambas a inoculação com BAL ou com sais de ácidos orgânicos são eficazes em melhorar a estabilidade aeróbia e reduzir o processo de deterioração das silagens durante a exposição ao oxigênio.

## **5 CONCLUSÃO**

Ambos os aditivos se mostraram eficazes em melhorar a estabilidade aeróbia e controlar o crescimento de microrganismos deterioradores na silagem. Contudo, dentre os aditivos estudados, a aplicação do benzoato de sódio resultou em silagens com melhores resultados em termos de redução de perdas de MS tanto na ensilagem quanto no pós-abertura.

## REFERÊNCIAS

- ALLEN, M.; COORS, J. G. e ROTH, G. W. 2003. Microbiology of ensiling. In: Buxton, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Eds). **Silage science and technology**. 1 ed. Madison: American Society of Agronomy. p. 547-608.
- BERNARDES, T. F. e RÊGO, A. C. 2014. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science** 97:1852-1861.
- BERNARDES, T. F.; CARDOSO, M. V. S. B. e LIMA, L. M. 2018. Silage feeding programs on intensive dairy farms. In: **Annual Meeting of the American Dairy Science Association**. Knoxville, Tennessee.
- BOER, V. M. et al. 2010. Growth-limiting intracellular metabolites in yeast growing under diverse nutrient limitations. **Molecular Biology of the Cell**, v. 21, n. 1, p. 198-211, jan. .
- BORREANI, G. et al. 2018. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. **Journal of Dairy Science** 101:3952-3979
- CARVALHO, B. F. et al. 2017. Fermentation profile and identification of lactic acid bacteria and yeasts of rehydrated corn kernel silage. **Journal of Applied Microbiology** 122:589-600
- CHIPLEY, J. R. 2021. Sorbic acids and sorbates. In: DAVISON, P. M.; TAYLOR, T. M. e DAVID, J. R. D. (Eds). **Antimicrobials in food**. 4 ed. CRC Press. p. 89-132.
- CHIPLEY, J.R. Sodium benzoate and benzoic acid. In: DAVIDSON, P.M.; SOFOS, J.N.; BRANEN, A.L. (Ed.) **Antimicrobials in food**, 3 ed., New York: Taylor & Francis Group, 2005. p.11-48.
- CONAGHAN, P.; KIELY, P. O.; MARA, F. P. O. 2010. Conservation characteristics of wilted perennial ryegrass silage made using biological or chemical additives. **Journal of Dairy Science**, v.93, n.2, p.628-643, Feb.
- COUTINHO, F. S. et al. 2013. Perfil de degradação de amido de mandioca por *Saccharomyces cerevisiae* expressando uma amilase de *Cryptococcus flavus*. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 4, p. 15-21.

- FIORDA, F. A.; SIQUEIRA, M. I. D. Avaliação do pH e atividade de água em produtos cárneos. **Revista de Ciências Ambientais e Saúde**, Goiânia, v. 36, n. 4, p. 817-826, mai/jun. 2009.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. 2005. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneus. 196p.
- GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. 2008. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel. 511p.
- HAO, W. et al. 2015. Aerobic stability and effects of yeasts during deterioration of non-fermented and fermented total mixed ration with different moisture levels. **Asian Australas, Journal Animal Science**, v. 28, n. 6, p. 816-826.
- HOFFMAN, P. C., et al. 2011. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science** 94:2465–2474.
- JUNGES, D., et al. 2017. Short communication: Influence of various proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. **Journal of Dairy Science** 100:9048-9051.
- McDONALD, P.; HENDERSON, A. R. e HERON, S. J. E. 1991. **The biochemistry of silage**. 2 ed. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks, UK. 340p.
- MORAN, J.P. et al. 1996. A comparison of two methods for the evaluation of the aerobic stability of whole crop wheat silage. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 11. 1996, Aberystwyth. **Proceedings...** Aberystwyth: University of Wales Aberystwyth. P.162-163.
- MUCK, R. E. et al. 2018. Silage review: recent advances and future uses of silages additives. **Journal of Dairy Science** 101:3980-4000.
- NELSON, D. L. e COX, M. M. 2014. Glicólise, Gliconeogênese e Via das Pentose-Fosfato. In: NELSON, D. L. e COX, M. M. (Eds). **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Artmed: Porto Alegre. p. 543-586.
- OLIVEIRA, A.P. et al. 2013. Microbiologia preditiva. **Enciclopédia biosfera**, Goiânia, v. 9, n. 17, p. 1909-1928.
- OLMO, A.; CALZADA, J. e NUNEZ, M. 2017. Benzoic acid and its derivatives as naturally occurring compounds in foods and as additives: uses, exposure and controversy. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 57:3084-3103.
- ORIJ, R.; BRUL, S; SMITS, G.J. 2011. Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, n. 10, p. 933-944.

- OUDE-ELFERINK, S. J. W. H. et al. 2001. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology** 67:125-132.
- PAHLOW, G., et al. 2003. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Eds). **Silage science and technology**. 1 ed. Madison: American Society of Agronomy. p. 31-94.
- RATKOWSKY, D.A. et al. 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. **Journal of Bacteriology**, v. 149, n. 1, p. 1-5.
- ROOKE, J. A. e HATFIELD, R. D. 2003. Biochemistry of ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Eds). **Silage science and technology**. 1 ed. Madison: American Society of Agronomy. p. 95-139.
- SALMOND, C.; KROLL, R. BOOTH, I. 1984. The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. **Journal of General Microbiology**, v. 130, n. 11, p. 2845-2850.
- SOARES, K. M. P. et al. 2010. Fatores que interferem na qualidade do doce de leite pastoso: Revisão de literatura. **PUBVET**, Londrina, v. 4, n. 6, ed. 11, p. 748.
- SOUZA, M.C. et al. 2013. Emprego do frio na conservação de alimentos. **Enciclopédia biosfera**, Goiânia, v. 9, n. 16, p. 1027-1046.
- TABACCO, E. et al. 2009. Clostridial spore fermentation during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* inoculants. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, n.5, p. 1632-1641.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. e CASE, C. L. 2017. **Microbiologia**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed. 964p.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. 2017. **Microbiologia**. 12 ed. Ed: Artmed. 964p.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. 1991. Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.10, p.3583-3597.
- WOOLFORD, M. K. 1984. The chemistry of silage. In: WOOLFORD, M. K. (Ed). **The silage fermentation**. 10 ed. Merceel Dekker, UE. 350p.
- WOOLFORD, M. K. 1984. **The silage fermentation**. Marcel Dekker, New York. 350p.