



Universidade Norte do Paraná

CENTRO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE LEITE E
DERIVADOS

REBECA SORGI CAMPIOLO

**ENSILAGEM DE GRÃO ÚMIDO DE MILHO UTILIZANDO
INOCULANTE MICROBIOLÓGICO COMERCIAL E SORO
DE QUEIJO**

Londrina
2014

REBECA SORGI CAMPIOLO

**ENSILAGEM DE GRÃO ÚMIDO DE MILHO UTILIZANDO
INOCULANTE MICROBIOLÓGICO COMERCIAL E SORO
DE QUEIJO**

Dissertação apresentada à Universidade
Norte do Paraná - UNOPAR, como
requisito parcial para a obtenção do título
de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Leite e Derivados.

Orientadora: Profa. Dra. Cíntia Hoch
Batista de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Hélio Hiroshi
Suguimoto

Londrina
2014

REBECA SORGI CAMPIOLO

**ENSILAGEM DE GRÃO ÚMIDO DE MILHO UTILIZANDO
INOCULANTE MICROBIOLÓGICO COMERCIAL E SORO
DE QUEIJO**

Dissertação aprovada em 28 de março de 2014, pela banca examinadora
constituída pelos professores:

Profa. Dra. Cíntia Hoch Batista de Souza
Universidade Norte do Paraná

Profa. Dra. Elsa Helena Walter de Santana
Universidade Norte do Paraná

Dr. Leandro Freire dos Santos

Aos meus pais, por toda dedicação e apoio;
As minhas irmãs, pela compreensão e a ajuda.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo apoio, amor e força com que me criaram e educaram.

As minhas irmãs, pela amizade, companheirismo e compreensão.

Ao meu namorado, por todo apoio, ajuda e compreensão nos momentos difíceis.

A minha amiga Paula, por toda ajuda prestada, tanto nas pesquisas quanto na emocional.

A todos os professores do Mestrado, pela dedicação e pelo conhecimento compartilhado.

A Profa. Dra. Fabíola Cristine de Almeida Rêgo Grecco e a Profa. Dra. Lisiane Dorneles de Lima, pela ajuda e sugestões valiosas à pesquisa.

Ao técnico de laboratório do mestrado em ciência e tecnologia de leite e derivados, Donato, e ao técnico do laboratório de bromatologia, Anderson, pela ajuda prestada durante as análises realizadas nesse trabalho.

A CONFEPAR-Cooperativa Central Agroindustrial, pela doação do soro de queijo utilizado nesse trabalho.

A todos que me ajudaram, direta ou indiretamente, e que por acaso não foram aqui citados.

“Se cultivares amor na execução do dever que a Divina Providência te atribui, nunca experimentarás cansaço ou desencanto, porque o trabalho se te fará fonte de alegria, na alegria de ser útil.

Se aplicares amor nos recursos verbais que a Eterna Sabedoria te confere, nunca te complicarás em manifestações infelizes, porque a tua palavra se transubstanciará em clarão e bênção, naquilo em que te expresses.

Se espalhares amor no lugar em que as Leis da Vida te situam nunca te observarás na condição de vítima do desequilíbrio, porque a tua influência se tornará serenidade e esperança, garantindo a harmonia e a tranquilidade onde estejas.

Se conservares o amor no coração - obra divina do Universo, - nunca te perderás na sombra, porque terás convertido a própria alma em presença de luz”

Francisco Cândido Xavier

CAMPIOLO, Rebeca Sorgi. **Ensilagem de grão úmido de milho utilizando inoculante microbiológico comercial e soro de queijo**. 2014. 56p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) – Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2014.

RESUMO

O soro de queijo é um subproduto da fabricação de queijo, rico em proteínas e sais solúveis. No entanto, é um produto que tem baixo valor comercial, ocasionando sérios problemas para as indústrias de queijo e ao meio ambiente. Uma das alternativas para a utilização do soro é na ensilagem, como fonte de bactérias lácticas, com o objetivo de melhorar o perfil de fermentação das silagens. O objetivo desse trabalho foi verificar a viabilidade da utilização do soro de queijo para aumentar a multiplicação dos micro-organismos *Lactobacillus plantarum* e *Propionibacterium acidipropionici*, presentes no inoculante comercial SiloMax Matsuda Milho. Além disso, avaliou-se as características da massa de milho através das análises de pH e bromatológicas antes e após 45 dias de ensilagem. Foram realizados experimentos com diferentes formulações para a verificação da multiplicação dos micro-organismos presentes no inoculante comercial: A: água destilada + cultura comercial; B: água destilada + cultura comercial + 2% de sacarose; C: água destilada + cultura comercial + 2% de glicose; D: 7,4g de soro de queijo + cultura comercial; E: 7,4g de soro de queijo + cultura comercial + 2% de sacarose; F: 7,4g de soro de queijo + cultura comercial + 2% de glicose; G: 3,7g de soro de queijo + cultura comercial; H: 3,7g de soro de queijo + cultura comercial + 2% de sacarose; I: 3,7g de soro de queijo + cultura comercial + 2% de glicose; J: 1,85g de soro de queijo + cultura comercial; K: 1,85g de soro de queijo + cultura comercial + 2% de sacarose; L: 1,85g de soro de queijo + cultura comercial + 2% de glicose. Essas populações foram determinadas após 24 e 48 horas de preparo dos inoculantes. Os silos experimentais foram preparados em baldes plásticos com tampa, nos quais a silagem de grãos úmido de milho ficou ensilada por 45 dias, em ambiente fechado protegido do sol em temperatura ambiente (25°C). Após os 45 dias, os silos foram abertos, e as análises de pH e bromatológicas (matéria seca, cinzas, extrato etéreo, fibra em detergente neutro – FDN e fibra em detergente ácido - FDA), foram feitas nas amostras de antes e depois dos 45 dias ensilados. Apenas as análises de FDN e FDA apresentaram alterações após 45 dias de fermentação, apresentando redução em seus valores. Com relação aos valores de pH, observou-se resultados satisfatórios, uma vez que houve uma redução significativa em todos os tratamentos testados, significando que o processo de fermentação da silagem foi adequado. A adição de soro de queijo, sacarose e glicose não influenciou a qualidade da silagem, mas observou-se aumento nas populações dos micro-organismos presentes no inoculante em alguns experimentos, principalmente nos testes contendo soro. Portanto, a utilização do soro auxiliou na multiplicação desses micro-organismos, principalmente nos inóculos que permaneceram 48 horas a 25 °C depois de preparados, demonstrando que o soro pode ser utilizado como uma fonte de carbono para multiplicação das bactérias lácticas presentes no inoculante avaliado.

Palavras-chave: Inoculante. Silagem. Ensilagem. Fermentação láctica. Soro de queijo.

CAMPIOLO, Rebeca Sorgi. **Ensilagem de grão úmido de milho utilizando inoculante microbiológico comercial e soro de queijo**. 2014. 56p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) – Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The cheese whey is a by-product of the manufacture of cheese, rich in proteins and soluble salts. However, it is a product that has low commercial value, causing serious problems for the industries of cheese and the environment. One of the alternatives to the use of whey is in silage, as a source of lactic acid bacteria, with the objective of improving the profile of fermentation of silages. The objective of this work was to verify the feasibility of the use of cheese whey to increase multiplication of micro-organisms *Lactobacillus plantarum* and *Propionibacterium acidipropionici*, present in commercial inoculant SiloMax Matsuda Milho. In addition, we evaluated whether the characteristics of the mass of corn through the analysis of pH and qualitative before and after 45 days of ensiling. Experiments were performed with different formulations for the verification of the multiplication of micro-organisms present in commercial inoculant: A: distilled water + commercial culture; B: distilled water + commercial culture + 2% sucrose; C: distilled water + commercial culture + 2% glucose; D: 7.4g of cheese whey + commercial culture; E: 7.4g of cheese whey + commercial culture + 2% sucrose; F: 7.4g of cheese whey + commercial culture + 2% glucose; G: 3.7g of cheese whey + commercial culture; H: 3.7g of cheese whey + commercial culture + 2% sucrose; I: 3.7g of cheese whey + commercial culture + 2% glucose; J: 1.85g of cheese whey + commercial culture; K: 1.85g of cheese whey + commercial culture + 2% sucrose; L: 1.85g of cheese whey + commercial culture + 2% glucose. These populations were determined after 24 and 48 hours of preparation of inoculants. The experimental silos were prepared in plastic buckets with lid, in which wet grain silage maize was ensiled for 45 days, in closed environment protected from the sun at room temperature (25°C). After the 45 days, the silos were opened, and the analysis of pH and qualitative (dry matter, ash, ethereal extract, neutral detergent fiber, NDF and acid detergent fiber - ADF), were performed on samples from before and after 45 days of silage. Only analyzes of NDF and ADF showed changes after 45 days of fermentation, showing reduction in its values. With regard to the values of pH, it was observed that satisfactory results, since there was a significant reduction in all treatments tested, meaning that the fermentation process of silage was adequate. The addition of whey cheese, sucrose and glucose did not influence the quality of the silage, but it was observed an increase in the populations of micro-organisms present in inoculant in some experiments, especially in tests containing whey. Therefore, the use of the whey helped in multiplication of these micro-organisms, mainly in inoculant that remained 48 hours to 25°C after prepared, demonstrating that the whey can be used as a carbon source for multiplication of lactic bacteria present on inoculant assessed.

Keywords: Inoculant. Silage. Ensiling. Lactic fermentation. Cheese whey.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Silos experimentais utilizados para a ensilagem dos grãos de milho.
13/12/2012 Universidade Norte do Paraná. 27
- Figura 2. Pesagem do silo experimental finalizado, antes da vedação.
13/12/2012 Universidade Norte do Paraná. 29
- Figura 3. Pesagem do silo experimental pronto, após vedação. 13/12/2012
Universidade Norte do Paraná. 29
- Figura 4. Equipamento utilizado para realizar a trituração dos grãos de milho
após a pré-secagem. 13/12/2012 Universidade Norte do Paraná..... 30

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Diferentes inóculos preparados para serem testados antes do processo de ensilagem do grão úmido de milho. 25
- Tabela 2. Populações totais* (média \pm desvio-padrão) observadas para os diferentes inóculos testados após 24 e 48 horas de incubação a 25°C. 32
- Tabela 3. Inóculos selecionados para aplicação na silagem de grão úmido de milho, após observação dos resultados obtidos na análise microbiológica..... 36
- Tabela 4. Valores* (média \pm desvio-padrão) obtidos para as determinações de matéria seca, cinzas, extrato etéreo, proteína bruta, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido, para as amostras de milho antes do processo de ensilagem e após 45 dias de fermentação. 37
- Tabela 5. Valores (média \pm desvio padrão) obtidos após determinação do pH antes e depois o processo de ensilagem. 41

SUMÁRIO

1	Introdução	11
2	Fundamentação teórica.....	13
2.1	Soro de queijo	13
2.2	Suplementação do soro de queijo.....	14
2.3	Produção e utilização de silagem.....	14
2.4	Utilização do grão úmido de milho na produção de silagens	17
2.5	Uso de inoculantes na produção de silagens.....	18
3	Objetivos	23
3.1	Objetivo geral.....	23
3.2	Objetivos específicos	23
4	Material e Métodos.....	23
4.1	Inoculante comercial e soro de queijo.....	23
4.2	Efeito do soro e de sua suplementação sobre a multiplicação das culturas de <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Propionibacterium acidipropionici</i>	24
4.3	Verificação da viabilidade das culturas lácticas nos experimentos propostos no item 4.2.....	25
4.4	Preparo das amostras para as análises físico-químicas da massa antes da ensilagem.....	25
4.5	Análises físico-químicas da massa antes da ensilagem	26
4.6	Preparo dos silos para fermentação da silagem	26
4.7	Abertura dos silos após a fermentação da silagem.....	30
4.8	Preparo das amostras para as análises físico-químicas da massa após ensilagem.....	30
4.9	Análises físico-químicas da massa após ensilagem	31
4.10	Análise estatística	31
5	Resultados e Discussão	32
5.1	Análise microbiológica dos inoculantes testados	32
5.2	Aplicação dos inoculantes escolhidos na silagem de grão-úmido de milho	35
5.3	Análises físico-químicas.....	36
6	Conclusões.....	43
7	Referências	44

1 Introdução

O soro de queijo é classificado como um subproduto do processamento de queijo, que contendo a metade do extrato seco do leite, representado por lactose, proteínas solúveis e sais. Produto que apresenta baixo valor comercial quando *in natura*, e podia causar sérios problemas de poluição ambiental quando descartado em rios e esgotos, pois oferece uma alta demanda biológica de oxigênio (SANTOS, 2006). Uma das alternativas para emprego desse produto é sua utilização na ensilagem como fonte de bactérias láticas. Dessa forma, evita-se que o soro de queijo seja descartado erroneamente e podendo-se melhorar o perfil de fermentação das silagens, devido à presença de bactérias láticas, carboidratos, proteínas solúveis e sais.

Para se obter uma silagem de boa qualidade, a forragem deve obedecer a alguns requisitos, tais como teor de matéria seca adequado no momento da ensilagem (30 a 35%), alta concentração de carboidratos solúveis e baixo poder tamponante. Apesar disso, não são todas as forrageiras que apresentam tais características em função da própria planta e/ou das práticas de manejo. Sendo assim, fases alternativas podem ser empregadas, para que o processo de fermentação não seja prejudicado. Os inoculantes bacterianos são qualificados como estimulantes da fermentação e são obtidos através da adição de cultura bacterianas, constituindo os grupos de aditivos mais utilizados em todo o mundo (ÁVILA, 2007).

Tem sido pesquisado o uso de inoculantes microbianos na ensilagem, com o objetivo de minimizar as perdas decorrentes da ensilagem, otimizar o processo fermentativo, reduzir a deterioração aeróbica e manter o valor nutritivo, (HARRISON; BLAUWIEKEL, 1994)

As bactérias láticas fazem parte do grupo de bactérias que apresentam como característica mais importante à produção de ácido láctico como principal ou único produto de seu metabolismo. Dentre as bactérias láticas, as mais importantes envolvidas com o processo de fermentação da silagem são as bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* (ÁVILA, 2007).

Efeitos negativos também poderá ocorrer no processo de conservação da silagem após a abertura do silo, se teores de carboidratos solúveis residuais estiver elevados, criando-se assim condições favoráveis para a atuação de

micro-organismos aeróbicos indesejáveis, como as leveduras. Sendo assim, o uso de inoculantes microbianos pode interferir leve ou intensamente na ação desses micro-organismos indesejáveis, dependendo das alterações finais do pH, e das concentrações de ácido láctico, ácido acético e açúcares (SILVA et al., 2005).

A inclusão de materiais ricos em carboidratos pode favorecer o processo fermentativo no silo, pratica essa pouco estudada. Tais matérias aumentam a quantidade de energia disponível para o desenvolvimento e multiplicação das bactérias lácticas. Açúcar, melaço de cana-de-açúcar, cereais, soro de queijo, polpa de beterraba, polpa cítrica, batata entre outros, são os materiais mais utilizados (ZANETTE, 2010).

Para se obter uma silagem de qualidade, é necessário manter um ambiente anaeróbio, com quantidade de substrato adequado para as bactérias produtoras de ácido láctico se multipliquem, e ocorra fermentação. Sendo assim, para que se tenha total controle no processo fermentativo da silagem, inoculantes contendo bactérias lácticas tem sido aplicado. As mudanças esperadas com a inoculação incluem rápida queda no pH, diminuição na concentração de nitrogênio amoniacal, diminuição nos níveis de acetato e butirato e aumento na concentração de ácido láctico (MAGALHÃES; RODRIGUES, 2003).

Além das limitações nutricionais, o processo de ensilagem também apresenta contratempos, que podem levar às perdas de nutrientes decorrentes de fermentações indesejáveis. Conhece-se que uma grande variedade de aditivos é disponibilizado com o propósito de solucionar as limitações à obtenção de silagens de boa qualidade nas condições tropicais (HENDERSON, 1993).

Contudo, os efeitos da adição de inoculantes microbianos em silagem são bastante variáveis. Melhora nas propriedades fermentativas da silagem e diminuição das perdas de matéria seca, observadas com a inoculação, nem sempre significam em melhora no valor nutricional, consumo voluntário e/ou desempenho animal. Por outro lado, alguns estudos demonstraram que o uso de aditivos na ensilagem promove melhora na ingestão do alimento, na produção de leite, na fermentação da silagem, na digestibilidade da dieta e no desempenho animal (MAGALHÃES; RODRIGUES, 2003).

2 Fundamentação teórica

2.1 Soro de queijo

O soro é um subproduto do processamento de queijo, contendo a metade do extrato seco do leite, representado por lactose, proteínas solúveis e sais. É um produto que tinha um baixo valor comercial quando *in natura*, e seu excedente poderia causar sérios problemas de poluição ambiental quando descartado em rios e esgotos, pois apresenta uma alta demanda biológica de oxigênio. Uma das alternativas de utilização é na ensilagem de capim, como fonte de bactérias lácticas, o que poderia melhorar o perfil de fermentação das silagens (SANTOS, 2006).

O soro de queijo é o principal produto das indústrias produtoras de queijos, e causava impacto ambiental devido à presença de altas concentrações de substâncias orgânicas dissolvidas. Durante a fabricação de queijos, para 10 litros de leite utilizados, produz-se um volume de 6 a 9 litros de soro de queijo, dependendo do tipo de queijo a ser produzido (ANDRADE, 2005; ALMEIDA et al., 2008). É um substrato da fabricação de queijo que antigamente era pouco valorizado, apesar de sua composição nutricional, sendo, muitas vezes, considerado como mais um poluente proveniente da indústria de alimentos. O descarte desse efluente em cursos de água não é permitido (CARMO, 2006).

O soro de queijo pode ser considerado como a fração aquosa do leite que é extraído da caseína durante a produção de queijos (TEIXEIRA; FONSECA, 2008). Este produto mostra-se como um líquido opaco, amarelo-esverdeado que contém cerca de 55% dos sólidos totais presentes no leite original. Lactose, proteínas solúveis e sais são os nutrientes de maior destaque presentes no soro de queijo (ANDRADE, 2002).

O soro de queijo Minas frescal apresenta, em média, 4,12% de lactose, 0,19% de cloretos, 0,49% de cinzas, 0,80% de proteínas, 0,68% de gordura, 93,72% de umidade e 6,78% de sólidos totais, com pH de 6,3 (TEIXEIRA; FONSECA, 2008). Com isso, o soro que é obtido na fabricação do queijo Minas frescal possui alto valor nutricional, atribuído pela presença de proteína, com alto teor de aminoácidos essenciais (CAPITANI et al., 2005).

Dentre os subprodutos que podem ser obtidos a partir do soro de queijo pode-se citar: o soro em pó, as proteínas do soro, lactose, ácido láctico, álcool,

vinagre e alimentos especiais (concentrado proteico, bebidas) (ANDRADE, 2005).

Com relação às proteínas presentes no soro, sendo elas β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, albumina do soro bovino e imunoglobulinas, o mesmo apresenta-se uma importante fonte destas substâncias, quando comparado a outros alimentos, como ovo e soja (ANDRADE, 2005).

Contudo, antigamente o soro de queijo era considerado como um problema ambiental em nosso país. Dessa maneira, uma das alternativas de utilização do soro de queijo para a aplicação de um inoculante microbiano na ensilagem parece ser uma importante alternativa, entre outras, que poderiam ser adaptada para diminuir os problemas resultantes do seu descarte inadequado.

2.2 Suplementação do soro de queijo

Substratos agroindustriais e matérias-primas que tem alto teor de carboidratos podem ser utilizados na fermentação láctica, sendo o soro de leite e o melaço de cana-de-açúcar substratos de maior interesse econômico (OLIVEIRA et al., 2005). Para que se tenha um maior rendimento, tanto da formação de biomassa microbiana quanto da produção de ácido láctico, vários pesquisadores têm suplementado o meio de cultivo com fontes de nitrogênio (OLIVEIRA et al., 2005; DEMIRCI et al., 1998; PAYOT; CHEMALY; FICK, 1999; AMRANE; PRIGENT, 1998; SELMER-OLSEN; SORHAUG, 1998). Porém, trabalhos contendo soro de queijo ou açúcar em conjunto com silagem, são escassos na literatura, sendo pouco comum o uso científico deste tipo de aditivo no Brasil.

2.3 Produção e utilização de silagem

Silagem é considerada a forragem verde, succulenta, conservada por meio de processo de fermentação anaeróbica. Ensilagem é o processo que consiste no ato de cortar a forragem, colocá-la no silo, compactá-la e protegê-la com a vedação do silo para que haja a fermentação. Silagem quando bem preparada, seu valor nutritivo é semelhante ao da forragem verde, uma vez que pode-se conservar sua qualidade original (CARDOSO; SILVA, 1995).

As silagens de forrageiras, quando preparadas adequadamente, podem apresentar grandes vantagens, como na utilização de dietas de ruminantes,

devido à conservação do seu valor nutricional. Além disso, é possível que haja disponibilidade de armazenamento durante longos períodos (GIMENES et al., 2005). Por esses motivos, a silagem é usualmente utilizada como alimento de ruminantes no inverno, já que a produção de pasto nesta época é baixa. No confinamento, a silagem também é usada junto com os grãos e farelos (MARTIN, 1997).

A ensilagem é um método de conservação de forragem para alimentação de animais. Para uma produção de silagem, é preciso que a matéria orgânica vinda da colheita de plantações comerciais, sendo elas leguminosas ou gramíneas, sejam bem picadas e armazenadas em silos verticais ou trincheiras revestidas com plástico. O material ensilado passa por um processo de anaerobiose, isto é, permanece na ausência de oxigênio (NUSSIO et al., 2004).

Ensilagem é caracterizada como o processo de transformar uma quantidade de forragem em alimento preservado (silagem) para alimentação de animais, sendo que perdas durante o processo de ensilagem são inevitáveis no alimento (ZANETTE, 2010).

O objetivo principal no processo de ensilagem é obter uma produção suficiente de ácido láctico de origem microbiana, inibindo, dessa maneira, a multiplicação de micro-organismos indesejáveis na massa ensilada (ÁVILA et al., 2010).

Durante o processamento de ensilagem, toda forragem verde colocada no silo sofre transformação até a estabilização completa da massa, adquirindo assim características de silagem. Esta transformação compreende um processo de fermentação, dividido em diferentes fases. Inicialmente ocorre uma fase aeróbica (fase I), onde acontece a respiração celular da planta e das bactérias aeróbias presentes, ocorrendo o consumo dos carboidratos solúveis. Depois vem a fase anaeróbica (fase II), onde ocorre a multiplicação de bactérias produtoras de ácidos, principalmente ácido acético, e redução do pH no material ensilado, chegando em valores menores que 5,0. A fase III, é a fase onde ocorre o desenvolvimento de outro grupo de bactérias anaeróbicas produtoras de ácido láctico. Na fase IV, inicia-se a multiplicação das bactérias lácticas, com a fermentação dos carboidratos solúveis e produção de ácido láctico, que resulta na elevação da preservação eficiente do material ensilado. A

fase final (fase V) abrange o armazenamento da forragem ensilada, que encontra-se pronta para o consumo animal (GIMENES et al., 2005).

A fermentação da ensilagem é altamente dependente do tipo de micro-organismo que podem estar presente no processo, pois populações naturais de bactérias lácticas em material vegetal são frequentemente baixas. Assim, o conceito de adição de um inoculante microbiano para silagem é para que ocorra a rápida multiplicação das bactérias lácticas, a fim de dominar a fermentação, resultando em uma maior qualidade da silagem (KUNG et al., 2003).

O princípio de conservação no processo de ensilagem é baseado na redução de pH (aumento da acidez), ocorrido através da fermentação dos açúcares solúveis presentes no vegetal. Com isso, forrageiras que contem elevado teor de açúcares solúveis, são consideradas as melhores para ensilagem, sendo o caso do milho e do sorgo (CARDOSO; SILVA, 1995).

Os micro-organismos indesejáveis mais facilmente encontrados na silagem são fungos filamentosos, leveduras e diversas bactérias como enterobactérias e clostrídios (MUCK, 2010). A fermentação bacteriana produz ácidos que diminuem o pH e retardam a multiplicação de micro-organismos anaeróbicos prejudiciais. O baixo pH e os ácidos gerados podem ajudar a retardar, mas geralmente não param a multiplicação de micro-organismos deteriorantes aeróbicos. Um ambiente anaeróbico promove a multiplicação de bactérias produtoras de ácido láctico. Dessa maneira, o estabelecimento de uma atmosfera anaeróbica é a única maneira de evitar a multiplicação de leveduras, fungos filamentosos e bactérias aeróbicas que prejudicam a silagem (MUCK, 2010).

Resultados de pesquisas científicas revelaram que o aumento artificial da quantidade inicial de bactérias produtoras de ácido láctico na forragem pode promover sua fermentação e resultar em silagens de melhor qualidade, com teores superiores de matéria seca, queda mais rápida do pH, aumento na relação entre a concentração dos ácidos láctico e acético e diminuição nos teores de etanol e nitrogênio amoniacal (BOLSEN et al., 1995; MENDES et al., 2008).

A finalidade em se preservar forragens pela fermentação é obter condição anaeróbica, onde carboidratos combinam-se com o oxigênio presente no

interior do silo, assim liberam gás carbônico, água e energia em forma de calor, promovendo a elevação da temperatura do material e redução do pH (ZANETTE, 2010).

2.4 Utilização do grão úmido de milho na produção de silagens

Uma alternativa para a suplementação de animais alimentados com volumosos de baixo valor nutritivo é a utilização da silagem de grãos úmidos. Este tipo de silagem tem sido pesquisada na Europa, nos Estados Unidos e no Canadá, e utilizada diretamente na alimentação de varias espécies animais, como: suínos, ovinos, bovinos de leite e de corte (JOBIM, 1997).

Para a nutrição de ruminantes tem sido bastante utilizada a silagem de milho, visto que é composta por duas frações distintas: a fração concentrada, que compreende os grãos, e a fração volumosa, constituída pelo restante da planta. A fração voluma representa normalmente mais de 60% do total de matéria seca, sendo ela a maior responsável pelo teor de fibra do alimento (PEDROSO et al., 2006).

A utilização de grãos úmidos de milho para silagem oferece vantagens como à antecipação da colheita, no armazenamento, redução de perdas no campo (MORAIS et al., 2012). Entretanto, apresenta algumas desvantagens, tais como a impossibilidade de venda de eventuais excedentes da produção e impossibilidade de preparo antecipado, ou seja, a silagem de grãos tem que ser preparada quase que diariamente (HENDERSON, 1993).

Todavia, características como teor de umidade baixa e elevada quantidade de amido, pode danificar a produção de ácidos e a rápida queda do pH. Tal fato pode resultar no relacionado ao desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis que utilizam o amido como fonte de energia, principalmente as leveduras (JOBIM, 2008). Desta maneira, utilização de aditivos que possam garantir um ambiente apropriado no interior do silo é conveniente para que sejam reduzidas perdas quantitativas e qualitativas durante a armazenagem (MORAIS et al., 2012).

A utilização de milho na alimentação animal pode causar problemas relacionados ao ataque de insetos, ratos e presença de toxinas produzidas por diferentes espécies de fungos. Presença de fungos nos grãos é o sinal evidente de inadequado armazenamento. A armazenagem dos grãos na forma

de silagem, em níveis de manejo adequado, pode eliminar ou reduzir drasticamente o problema. Além disso, procedimentos de ensilagem de grãos úmidos permite um sistema de armazenagem mais simples e econômico do que o convencional, afastando o uso de secadores e silos especializados (JOBIM, 1999).

O teor de matéria seca, cerca de 30-35%, alto teor de carboidratos solúveis disponíveis para a fermentação e o baixo poder tamponante são características que atribuem ao milho um potencial produto para elaboração de silagem de qualidade (OLIVEIRA et al., 2011; SANTOS et al., 2010).

A ensilagem de grãos úmidos de milho pode cooperar na solução de problemas de correntes do armazenamento de grãos em fazendas, onde, normalmente, ocorre perdas quantitativas e qualitativas em decorrência ao ataque de insetos e roedores. A colheita dos grãos para a ensilagem oferece antecipação na liberação de área agrícola, além de reduzir significativamente as perdas no campo (SILVA et al., 2010).

Para o procedimento de ensilagem, o milho deve oferecer alta porcentagem de grãos e de espiga na massa verde. Além do mais, outros fatores como porcentagem de proteína, valor nutritivo da porção haste mais folhas e a digestibilidade da matéria seca devem ser avaliados para a produção de uma silagem de qualidade. A quantidade de espigas por planta é uma parte importante para o rendimento e produtividade, constituindo o colmo como a parte que apresenta menos qualidade nutricional. Adquirir uma maior quantidade de espiga no material a ser ensilado é desejável, pois esta colabora para uma silagem de melhor qualidade. A produção de silagem de alta qualidade depende da composição física das estruturas anatômicas da planta de milho, devendo apresentar em torno de 60 a 65% de espigas, o que define a participação em torno de 45% de grãos no material ensilado (JAREMTCHUK et al., 2005).

2.5 Uso de inoculantes na produção de silagens

Compostos de bactérias lácticas, associada ou não com complexos enzimáticos, formados por celulosas, amilases e hemicelulases, são os inoculantes mais empregados em silagens de grãos úmidos. Aditivos esses que estimulam a fermentação. A ação desses produtos ocorre no acréscimo de

açúcares simples disponíveis, via complexo enzimático, para que bactérias produzam ácido láctico, o qual resultaram em uma rápida queda na concentração de pH. A finalidade do uso de aditivos microbianos é assegurar que bactérias lácticas dominem a fermentação, derivando em uma silagem bem conservada. O uso de inoculantes em silagens dificulta a multiplicação de micro-organismos anaeróbios indesejáveis, como enterobactérias e clostrídios (ÁVILA et al., 2010). Ao mesmo tempo, seu uso pode também dificultar a multiplicação de outros micro-organismos nas silagens, bem como seus metabólitos (SILVA, 2010). Os fungos mais frequentemente encontrados em silagens são os do gênero *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Estes fungos necessitam de umidade acima de 20%, oxigênio e temperatura acima de zero para se desenvolverem. Entretanto, a produção de toxinas geralmente não ocorre nas mesmas condições observadas para multiplicação dos fungos. Por exemplo, para a produção de aflatoxina, os fungos do gênero *Aspergillus* requerem temperatura acima de 30°C e alta umidade. Por outro lado, *Fusarium* produzem toxinas em temperaturas entre 7 e 24°C (PEREIRA, 2001).

Dentre os aditivos, os inoculantes microbianos representam importante ferramenta, pois, segundo Henderson (1993), contribuem para a redução da proteólise enzimática, ocorrida através da rápida queda do pH dentro do silo, o que beneficia a produção de grandes quantidades de ácido láctico, e representam, por isso, a possibilidade de menores perdas tanto de matéria seca quanto de valor nutricional.

Além do mais, os inoculantes microbianos dificultam a atividade de proteases e de aminases da planta e de micro-organismos presentes. A adição de micro-organismos benéficos para controlar a fermentação, produzir produtos finais benéficos para provocar o consumo e a produção do animal e melhorar a recuperação de matéria seca da forragem conservada também são objetivos da adição de inoculantes em silagens (KUNG et al., 2003).

A vitória no uso do inoculante microbiano está ligado a 3 fatores: população natural de bactérias lácticas; conteúdo de açúcares da forragem; e cepas de bactérias presentes no inoculante. Onde a bactéria que compõem o inoculante deve ser competente na competição com a microbiota natural da planta, devendo ainda ser efetiva no processo fermentativo (ZANETTE, 2010).

Pontos positivos são observados quando uma silagem é produzida com a adição de inoculo microbiano, diferente das silagens não inoculadas. Tais pontos são a melhora da palatabilidade, com decorrência na melhora da fermentação e da digestibilidade das fibras, diminuição das perdas físicas na superfície e laterais do silo, facilitando o transporte, armazenamento e uso do produto (COAN, 2005).

Contudo, o uso de aditivos microbianos tem apresentado resultados conflitantes, nos quais, o uso não apresentou melhora significativa na fermentação da silagem. Todavia, uma pequena melhora na fermentação poderia resultar em melhor desempenho animal, devido ao aumento de consumo de matéria seca (ÍTAVO, 2004).

Inoculantes microbianos utilizados como aditivos contêm bactérias homofermentativas, heterofermentativas ou a combinação de micro-organismos destes grupos. Os micro-organismos homofermentativos caracterizam-se pela rápida taxa de fermentação, menor proteólise, maior concentração de ácido láctico, menores teores de ácidos acético, butírico e etanol, bem como maior recuperação de energia e matéria seca. Bactérias heterofermentativas utilizam ácido láctico e glicose como substrato para produção de ácido acético e propiônico, os quais tem função antifúngica (ZOPOLLATTO et al., 2009).

Bactérias lácticas homofermentativas mais utilizadas nos inoculantes para silagem contêm: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentacaceus* e *Enterococcus faecium*. Os inóculos microbianos podem conter um ou mais tipos dessas bactérias, selecionadas pela sua capacidade de dominar a fermentação (SILVA et al., 2010).

Inoculantes contendo bactéria heterofermentativas, produtoras de ácidos acético e propiônico, além do ácido láctico, como *Lactobacillus buchneri*, *Pediococcus cerevisiae*, *Propionibacterium shermani* e *Propionibacterium acidipropionici*, tem sido analisados, buscando assim alterar o perfil dos ácidos e incrementar a estabilidade aeróbica das silagens (VALERIANO, 2007).

Diversos autores observaram e acompanharam a eficaz fermentativa de silagem inoculadas com *Lactobacillus*, verificando o rápido aumento do número desses micro-organismos, com alta produção de ácido láctico, rápida redução

nos teores do pH e consumo de glicídios solúveis em 3 a 7 dias de fermentação (SILVA et al., 2010).

Como para a fermentação de alimentos, produção de silagem é uma tradição que remonta os tempos antigos. Os agentes essenciais para a fermentação são micro-organismos do gênero *Lactobacillus*. A silagem é preparada a partir de várias matérias-primas, tais como capim, feno e milho desempenhando o papel principal. Dependendo da qualidade da matéria-prima, o teor de matéria seca e da tecnologia de ensilagem, as populações de bactérias lácticas que se desenvolvem determinam a qualidade final da silagem (DWORKIN et al., 2006).

Os lactobacilos são estritamente fermentativos e tem exigências nutricionais complexas, por vezes, muito exigentes para os hidratos de carbono, aminoácidos, peptídeos, sais, derivados de ácidos nucleicos e vitaminas. Esses micro-organismos multiplicam-se em uma variedade de habitat, sempre em altos níveis de carboidratos solúveis, produtos de degradação de proteínas, vitaminas e uma baixa tensão de oxigênio. Diferente espécies se multiplicam sob diferentes condições ambientais, e a sua produção de elevados níveis de ácido láctico reduz o pH do substrato e suprime a multiplicação de outras bactérias (DWORKIN et al., 2006).

Para a fermentação láctica pode-se empregar diversos glicídios ou matérias-primas ricas em glicose, sacarose ou lactose. A escolha do carboidrato a ser convertido biologicamente depende da linhagem selecionada, visto que as cepas diferem quanto ao metabolismo relativo a diferentes fontes de carbono (OLIVEIRA et al., 2005).

Utiliza-se glicose ou sacarose, como fontes de carbono, para o cultivo de *Lactobacillus* (BALDUINO et al., 1999). *Lactobacillus plantarum* é um micro-organismo encontrado em silagens e em alguns produtos alimentícios, geralmente são homofermentativos e convertem mais de 80% dos açúcares fermentescíveis à lactato. A produção rápida de ácido láctico é uma característica marcante desse micro-organismo (FELTRIN et al., 2000).

Vários micro-organismos, que não são bactérias lácticas homofermentativas, foram utilizados como inoculantes para silagem, especificamente com a finalidade de melhorar a estabilidade aeróbica. Por exemplo, micro-organismos do gênero *Propionibacterium* são capazes de converter o ácido láctico e glicose

em ácido acético e propiônico, que possuem maior capacidade antifúngica que o ácido láctico, impedindo a multiplicação de bolores e leveduras em milho com umidade elevada. Em geral, micro-organismos do gênero *Propionibacterium* têm sido eficazes em situações que a diminuição do pH é lenta e/ou em que o pH final da silagem foi relativamente elevado (> 4,2 a 4,5) (KUNG et al., 2003).

O gênero *Propionibacterium* é caracterizado pela produção dos ácidos acético e propiônico durante a fermentação de carboidratos solúveis. Estudos realizados com a bactéria *Propionibacterium acidipropionici*, associada ou não a *Lactobacillus plantarum*, na fermentação de silagens (trigo, sorgo e milho) revelaram que a cepa *P. acidipropionici* foi hábil no controle do desenvolvimento de leveduras e fungos filamentos nas fases de fermentação e de estabilidade aeróbica (FILYA et al., 2004). Em um estudo realizado por Kung et al. (2003), a utilização de *L. plantarum* de forma isolada foi benéfica quanto ao período de fermentação, enquanto as bactérias do gênero *Propionibacterium* tiveram efeito pronunciado sobre a estabilidade aeróbica, em virtude do controle de leveduras e fungos.

Um ambiente anaeróbico e fermentação natural dos açúcares por bactérias lácticas, são fatores que geralmente ajudam a controlar a atividade microbiana durante o processo de ensilagem. Essas bactérias, que beneficiam a preservação da massa ensilada, são encontradas em baixas populações nesse ambiente, quando comparadas a outros grupos de micro-organismos. Além disso, a obtenção de sucesso no uso de aditivos microbiológicos em silagens depende de fatores, tais como: a habilidade da bactéria inoculada crescer rapidamente na massa, presença de substrato adequado e da população de bactérias inoculadas em relação à população de micro-organismos naturalmente presentes na forragem. Deste modo, a preservação e estabilidade das culturas no silo dependem da combinação dos fatores citados anteriormente. A utilização de aditivos microbianos contendo células viáveis de bactérias lácticas pode auxiliar no aumento das populações de bactérias lácticas naturalmente presentes na silagem, melhorando o perfil de fermentação no silo. Para que ocorra uma diminuição suficiente nos valores de pH, com consequente estabilidade da silagem, são necessárias populações superiores a 10^4 UFC de bactérias lácticas por grama de forragem (UFC/g) (MUCK, 2010).

Dessa maneira, visando uma aplicação econômica e ambientalmente racional para o soro de queijo e uma melhor qualidade da silagem para o consumo animal, o uso dessa matéria-prima como base para multiplicação de bactérias presentes em inoculantes microbianos apresenta-se como uma opção viável e de grande aplicação industrial.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Verificar a ação de um inoculante comercial contendo as culturas de *Lactobacillus plantarum* e *Propionibacterium acidipropionici*, adicionados ao soro de queijo, sobre a fermentação de silagem de grãos úmido de milho e as características da massa após a ensilagem.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a eficiência do inoculante comercial quando preparado utilizando soro de queijo em comparação à sua diluição utilizando água.

Avaliar a eficiência do inoculante comercial sobre as características físico-químicas da silagem de grão úmido de milho.

Avaliar a adição de glicose e sacarose quando a multiplicação dos microorganismos na silagem de grão úmido de milho.

4 Material e Métodos

4.1 Inoculante comercial e soro de queijo

O inoculante comercial testado foi o SiloMax Matsuda Milho, em pó, (Grupo Lalleman, Aparecida de Goiânia, Brasil) constituído pelos microorganismos *Lactobacillus plantarum* ($3,0 \times 10^{10}$ UFC/g) e *Propionibacterium acidipropionici* ($3,0 \times 10^{10}$ UFC/g), informação fornecida pela empresa.

O soro de queijo foi obtido na forma liofilizada e reconstituído de acordo com instruções do fabricante (Confepar, Londrina, Brasil): 1 parte de soro de queijo em pó para 13,5 partes de água. Após a reconstituição, o soro foi pasteurizado a 65°C por 30 minutos e resfriado em seguida em banho de gelo. Após o resfriamento do soro a 5°C, os inóculos foram preparados. O inoculante comercial foi utilizado conforme orientação do fabricante: 100 g da cultura comercial para cada 40 litros de água.

Para a preparação dos inóculos, foi pesado o soro de queijo, conforme as diferentes concentrações (7,4g; 3,7g e 1,85g), reconstituído conforme fabricante.

Após o soro de queijo ser reconstituído e passado pelo processo de pasteurização e resfriamento, a cultura comercial foi inserida diretamente. E foi preparado 30 mL de inóculo para cada silo.

Após o preparo, os inóculos foram mantidos em frascos fechados, à temperatura ambiente (25 °C) por 24 e 48 horas, para se avaliar se haverá diferença na concentração de bactérias presentes nos dois tempos. Decorridos tais tempos de armazenamento, a avaliação microbiológica para contagem total das bactérias presentes nos inóculos foi realizada.

4.2 Efeito do soro e de sua suplementação sobre a multiplicação das culturas de *Lactobacillus plantarum* e *Propionibacterium acidipropionici*

Neste estudo, preparou-se um inoculante controle, utilizando-se a água como diluente. Os demais foram preparados utilizando-se soro como diluente em diferentes concentrações (7,4g; 3,7g e 1,85g). A suplementação com 2% de sacarose e 2% de glicose também foi realizada para alguns inóculos para verificação da influência dessas fontes sobre a multiplicação dos micro-organismos (Tabela 1).

Tabela 1. Diferentes inóculos preparados para serem testados antes do processo de ensilagem do grão úmido de milho.

Experimentos	Variáveis testadas
A	água + cultura*
B	água + cultura + 2% sacarose
C	água + cultura + 2% glicose
D	7,4% soro** + cultura
E	7,4% soro + cultura + 2% sacarose
F	7,4% soro + cultura + 2% glicose
G	3,7% soro + cultura
H	3,7% soro + cultura + 2% sacarose
I	3,7% soro + cultura + 2% glicose
J	1,85% soro + cultura
K	1,85% soro + cultura + 2% sacarose
L	1,85% soro + cultura + 2% glicose

* SiloMax Matsuda Milho, constituído pelos micro-organismos *Lactobacillus plantarum* ($3,0 \times 10^{10}$ UFC/g) e *Propionibacterium acidipropionici* ($3,0 \times 10^{10}$ UFC/g).

** lipídios: 1.5%; proteínas: 11 a 12%; lactose: $\geq 72\text{g}/100\text{g}$; cinzas: 10% (dados fornecidos pelo fabricante na ficha técnica do produto).

4.3 Verificação da viabilidade das culturas lácticas nos experimentos propostos no item 4.2

Para a verificação da viabilidade das culturas presentes nos inóculos preparados de acordo com o tem 4.2, alíquotas de 25 mL dos inóculos preparados foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}) (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) utilizando-se Bag Mixer (Interscience, St. Nom, França). Diluições decimais subsequentes foram preparadas, utilizando-se o mesmo diluente. Para a quantificação das culturas, alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas de Petri estéreis. Em seguida, foi adicionado ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS) (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), fundido e resfriado a 45°C. O plaqueamento foi realizado 24 e 48 horas após o preparo dos inóculos. As placas foram incubadas em aerobiose durante 48 horas a 37°C (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1995).

4.4 Preparo das amostras para as análises físico-químicas da massa antes da ensilagem

Para a realização das análises físico-químicas, amostras foram desidratadas em estufa a 65°C por 72 horas (SOUZA; SATO, 1988).

Após a etapa de pré-secagem, foi realizada a moagem das amostras, que consistiu na trituração do material até a obtenção de um pó fino. A moagem foi feita em moinho (Tecnal, Moinho tipo Willye, TE 650) com peneira de 1mm, e as amostras acondicionadas em ambiente protegido do sol e umidade, em potes plásticos com tampa de rosca e devidamente identificados.

4.5 Análises físico-químicas da massa antes da ensilagem

Antes do processo de ensilagem, foram realizadas as análises para as seguintes determinações na massa de milho: matéria seca, cinzas, extrato etéreo, proteína bruta, fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) e pH. A determinação da matéria seca foi realizada, a partir de 1 g de amostra seca, a 105°C durante 5 horas (SOUZA; SATO, 1988). Para a determinação de cinzas, utilizou-se 1 g de amostra, que foram colocadas em mufla a 550°C por 4 horas (SOUZA; SATO, 1988). A determinação de proteína a partir de 0,5 g de amostra foi realizada através do método de micro Kjeldahl (SOUZA; SATO, 1988). A determinação do extrato etéreo foi realizada, a partir de 2 g da amostra seca, através de extração com éter de petróleo durante o período de 4 horas. Após o término da extração, as amostras foram mantidas em estufa a 105°C por 12 horas para eliminar completamente o éter e posterior pesagem. As determinações de fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido foram realizadas através do método de Van Soest (SOUZA; SATO, 1988). O pH foi determinado com 25g de amostra mais 225mL de água deionizada, processada em liquidificador por 1 minuto, e após isso imediatamente realizada a leitura em aparelho pHmetro (Tecnal, Piracicaba, Brasil), em triplicata (Kung jr. et al., 1984). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

4.6 Preparo dos silos para fermentação da silagem

Para os testes de fermentação da silagem de grãos úmido de milho foram selecionados os inóculos indicados na Tabela 1 que apresentam as maiores concentrações (UFC/mL).

Os inóculos foram preparados e mantidos durante 48 horas a temperatura ambiente antes de serem utilizados na ensilagem.

Para o preparo dos silos, o material foi triturado mais finamente em equipamento próprio para a trituração (Figura 1). Para isso, os grãos de milho triturados foram pesados e passaram pela etapa de pré-secagem, conforme descrito no item 4.4.

O preenchimento de cada silo foi feito pouco a pouco com a silagem de grão úmido de milho, para se realizar uma adequada compactação e preenchimento total do silo, para que após o fechamento do silo não houvesse ar dentro.

Em cada silo de grão úmido de milho (Figura 2), adicionou-se no fundo, 10 cm de areia grossa. Por cima da camada de areia, foi colocado um pedaço de tecido de algodão (20 cm x 20 cm) para separar a silagem do milho da camada de areia. Sobre a camada de tecido de algodão, os grãos de milho foram adicionados pouco a pouco para fazer a compactação, até o preenchimento de todo o silo, de maneira que a presença de ar foi minimizada ao máximo. Depois de preenchido, os silos foram fechados com suas respectivas tampas plásticas. Essas tampas foram adaptadas com a inserção de uma válvula para escape dos gases produzidos durante a fermentação. Após o fechamento, os silos foram vedados com fita adesiva. Tal procedimento foi realizado para evitar a entrada de oxigênio, garantindo dessa maneira, um ambiente anaeróbio.



Figura 1. Silos experimentais utilizados para a ensilagem dos grãos de milho. 13/12/2012 Universidade Norte do Paraná.

Em cada etapa do preenchimento dos silos realizou-se uma pesagem: silo vazio, silo + areia, silo + areia + pano de fralda, silo + areia + pano de fralda + silagem (Figura 3). Por último, realizou-se a pesagem dos silos já vedados (Figura 4).

Para silagens de grão úmido de milho, a recomendação para adição do inóculo microbiano é a seguinte: utilizar 2 litros do inóculo preparado para cada tonelada de silagem. No presente trabalho, devido ao volume de material a ser ensilado, utilizou-se 30 mL de inoculante para cada 15 quilos de grão de milho. Para adicionar o inóculo ao milho a ser ensilado, este material foi colocado em um recipiente plástico para facilitar a homogeneização do material com o inóculo. O inóculo (30 mL) foi adicionado aos poucos ao material, ao mesmo tempo em que o milho foi misturado, para que todo o inóculo entrasse em contato com a massa a ser ensilada. Cada inóculo foi testado em quadruplicata.

Após a vedação, os silos foram mantidos em ambiente protegido do sol e da umidade para o período de fermentação da silagem, que durou 45 dias.



Figura 2. Pesagem do silo experimental finalizado, antes da vedação. 13/12/2012 Universidade Norte do Paraná.



Figura 3. Pesagem do silo experimental pronto, após vedação. 13/12/2012 Universidade Norte do Paraná.

4.7 Abertura dos silos após a fermentação da silagem

Decorrido o tempo descrito no item 4.6, os silos foram abertos. A silagem foi retirada dos silos e colocada em um recipiente maior para a realização da homogeneização da massa ensilada. A homogeneização da silagem foi feita manualmente por aproximadamente 1 minuto. Após a homogeneização, realizada manualmente com luvas para não contaminar o material ensilado, amostras foram retiradas, devidamente identificadas e congeladas. As demais amostras foram utilizadas para a realização das análises descritas a seguir.

4.8 Preparo das amostras para as análises físico-químicas da massa após ensilagem

Para a realização das análises físico-químicas, realizou-se uma etapa de pré-secagem das amostras em estufas a 65°C por 72 horas (SOUZA; SATO, 1988).

Após a etapa de pré-secagem, foi realizada a moagem das amostras, que consistiu na trituração do material até a obtenção de um pó fino. A moagem foi feita em moinho com peneira de 1mm, e as amostras acondicionadas em potes plásticos com tampa de rosca devidamente identificados.



Figura 4. Equipamento utilizado para realizar a trituração dos grãos de milho após a pré-secagem. 13/12/2012 Universidade Norte do Paraná.

4.9 Análises físico-químicas da massa após ensilagem

Após 45 dias de ensilagem, foram realizadas as seguintes determinações: matéria seca, cinzas, extrato etéreo, proteína bruta, fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) e pH em pHmetro (Tecnal, Piracicaba, Brasil). A determinação da matéria seca foi realizada, a partir de 1 g de amostra seca, a 105°C durante 5 horas (SOUZA; SATO, 1988). Para a determinação de cinzas, utilizou-se 1 g de amostra, que foram colocadas em mufla a 550°C por 4 horas (SOUZA; SATO, 1988). A determinação de proteína, a partir de 0,5 g de amostra, foi realizada através do método de micro Kjeldahl (SOUZA; SATO, 1988). A determinação do extrato etéreo foi realizada, a partir de 2 g da amostra seca, através de extração com éter de petróleo durante o período de 4 horas. Após o término da extração, e eliminação do éter, as amostras foram mantidas em estufa a 105°C por 12 horas para a pesagem. As determinações de fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido foram realizadas através do método de Van Soest (SOUZA; SATO, 1988). O pH foi realizado em pHmetro (Tecnal, Piracicaba, Brasil), onde se utilizou 25g de amostra mais 225mL de água deionizada, processada em liquidificador por 1 minuto, e em seguida foi feita a leitura das amostras, em triplicata (KUNG et al., 1984).

Todas as análises foram realizadas em duplicata após decorridos os 45 dias de ensilagem.

4.10 Análise estatística

A comparação dos resultados obtidos após a realização das análises entre os diferentes tratamentos propostos foi realizada através de Análise de Variância (ANOVA). Previamente a realização da análise de variância, foi avaliada a normalidade dos resultados, através do teste de Shapiro-Wilks, adotando-se um valor de α de 0,05. Da mesma forma, foi analisada a homogeneidade de variâncias entre os diferentes tratamentos, através do teste de Brown-Forsythe, com α de 0,05. Após a aplicação dos testes citados e a realização da ANOVA, foram utilizados testes para observação dos contrastes entre as médias (quando a análise de variância for significativa) (BOWER, 1998a; BOWER, 1998b; CALLEGARI-JAQUES, 2003).

5 Resultados e Discussão

5.1 Análise microbiológica dos inoculantes testados

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos na análise microbiológica realizada para verificação do desenvolvimento das culturas presentes no inoculante comercial (*Lactobacillus plantarum* e *Propionibacterium acidipropionici*) nos diferentes inóculos preparados, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 2. Populações totais* (média \pm desvio-padrão) observadas para os diferentes inóculos testados após 24 e 48 horas de incubação a 25°C.

Inóculos**	Populações nos inóculos preparados (log UFC/mL)	
	24 horas	48 horas
A	6,03 \pm 0,01 ^{Aa}	5,78 \pm 0,04 ^{Aa}
B	5,75 \pm 0,04 ^{Aa}	5,84 \pm 0,05 ^{Aa}
C	6,03 \pm 0,08 ^{Aa}	6,38 \pm 0,40 ^{Aa}
D	6,95 \pm 0,07 ^{Ba}	8,43 \pm 0,09 ^{Bb}
E	6,15 \pm 0,21 ^{Aa}	9,56 \pm 0,01 ^{Cb}
F	8,22 \pm 0,04 ^{Ca}	8,94 \pm 0,06 ^{Ca}
G	6,00 \pm 0,02 ^{Aa}	11,08 \pm 0,10 ^{Db}
H	6,24 \pm 0,34 ^{Aa}	6,00 \pm 0,12 ^{Aa}
I	6,84 \pm 0,09 ^{Ba}	6,86 \pm 0,03 ^{Aa}
J	8,05 \pm 0,07 ^{Ca}	9,31 \pm 0,01 ^{Cb}
K	8,40 \pm 0,13 ^{Ca}	8,63 \pm 0,07 ^{Ba}
L	8,57 \pm 0,11 ^{Ca}	8,90 \pm 0,12 ^{Ba}

*: *Lactobacillus plantarum* e *Propionibacterium acidipropionici*.

**.: A: água + cultura; B: água + cultura + 2% sacarose; C: água + cultura + 2% glicose; D: 7,4% soro + cultura; E: 7,4% soro + cultura + 2% sacarose; F: 7,4% soro + cultura + 2% glicose; G: 3,7% soro + cultura; H: 3,7% soro + cultura + 2% sacarose; I: 3,7% soro + cultura + 2% glicose; J: 1,85% soro + cultura; K: 1,85% soro + cultura + 2% sacarose; L: 1,85% soro + cultura + 2% glicose.

^{A,B,C,D}: letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes inóculos preparados, para o mesmo período de armazenamento.

^{a,b,c}: letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes períodos de armazenamento para cada inóculo preparado.

Para alguns tratamentos testados, observou-se que houve diferença significativa nas populações totais de micro-organismos, nos dois períodos de incubação avaliados (24 e 48 horas). Após 48 horas de incubação, os inóculos

D, E, G e J apresentaram aumentos significativos nas contagens, quando comparadas aos resultados obtidos no tempo 24 horas ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos para os inóculos D, G e J podem estar relacionados com o fato de que os inóculos que apresentaram maiores populações de bactérias não continha sacarose e glicose como fonte de carbono a mais para que as bactérias lácticas consumissem e se multiplicassem, pois fonte de carbono em excesso pode prejudicar, até mesmo diminuir, a multiplicação das bactérias contidas no inóculo.

Possivelmente, resultado obtido no inóculo G esta relacionado com a quantidade de soro de queijo presente, 1 (3,7g) parte de soro de queijo, diferentes dos inóculos E e J, onde E tinha 1 parte mais metade (7,4g) de uma parte de soro de queijo, e J tinha metade (1,85g) de uma parte de soro de queijo. Com isso, pode ser que as bactérias lácticas presentes se multiplicaram mais no inóculo G, onde a quantidade de soro de queijo era a suficiente para sua multiplicação, conseqüentemente, a quantidade de soro de queijo no inóculo E era mais que o suficiente, podendo assim ter prejudicado na multiplicação das bactérias lácticas, e a quantidade de soro de queijo no inóculo J era menor, podendo assim dizer que a quantidade de nutrientes para a multiplicação de bactérias láctica foi insuficiente. O inóculo D, que era suplementado com sacarose, podemos dizer que ocorreu o mesmo que com o inóculo E, houve fonte de carbono há mais que o necessário para a multiplicação das bactérias lácticas.

Pinto (2006) testou 6 tratamentos diferentes em silagem de bagaço de laranja e silagem de milho, sendo eles: T1: sem inoculante; T2: com inoculante microbiano; T3: com inoculante microbiano e enzimático; T4: com inoculante enzimático; T5: ácido propiônico e T6: ácido acético a 15%. A silagem de bagaço de laranja apresentou médias menores (2,39 log UFC/g) do que a silagem de milho (6,72 log UFC/g) para contagem de leveduras em todos os tratamentos ($p < 0,05$) indicando que a ensilagem pode ser uma boa forma de conservação para este subproduto, sem necessidade do uso de aditivos, uma vez que a silagem de bagaço de laranja sem inoculante apresentou menores populações de leveduras, indicando que esta silagem possui boa conservação apesar de apresentar menor estabilidade aeróbica quando comparada com a silagem de milho. A silagem de milho apresentou maiores populações de

bactérias (7,38 log UFC/g) quando comparada com a silagem de bagaço de laranja (6,34 log UFC/g), exceto no tratamento com inoculante microbiano e enzimático (7,29 log UFC/g para silagem de bagaço de laranja, e 7,44 log UFC/g para silagem de milho), onde as duas silagens não diferiram ($p>0,05$).

De acordo com Valeriano (2007) a adição de inoculantes às silagens de cana-de-açúcar influenciou significativamente ($p<0,05$) as populações de bactérias lácticas durante o processo fermentativo. As silagens que receberam a bactéria homolática *L. paracasei* foram as que apresentaram as menores populações de bactéria láctica (7,12 log UFC/g). No entanto, essas populações não diferiram das populações observadas para *L. brevis* (7,22 log UFC/g) e *L. plantarum* (7,33 log UFC/g). Uma provável explicação para esses altos teores de carboidratos residuais foram as baixas populações de bactérias lácticas nessas silagens. Possivelmente, estes micro-organismos não desenvolveram populações suficientes de bactérias lácticas para converter os carboidratos presentes na forragem em ácido láctico.

Balduino et al. (1999) observaram que a suplementação do meio MRS, com diferentes fontes de carbono, como glicose e sacarose, influenciou na fermentação láctica, uma vez que observaram populações de 1×10^{15} UFC/mL de cultura mista de *L. curvatus*, *L. plantarum*, *P. acidilactici* e *E. faecium*. Além disso, observou-se maior produção de ácido láctico após 48 horas em temperatura de 46 °C.

As bactérias lácticas são bastante exigentes quanto às condições de multiplicação. Segundo Coelho (2011), os açúcares representam as melhores fontes de carbono para estas bactérias.

Os valores quantificados para bactérias totais foram significativamente superiores em alguns tratamentos, igualmente encontrado por Silva et al. (2010), que relatada que tal fato já era esperado, devido a mistura do inoculante bacteriano com o complexo enzimático, ou seja, possivelmente a adição deste processo resulta em uma maior disponibilidade de açúcares simples, que são nutrientes importantes para o desenvolvimento dessas bactérias.

Filya et al. (2004) avaliaram o efeito de *Propionibacterium acidipropionici*, sozinho ou combinado com *Lactobacillus plantarum*, na fermentação e estabilidade aeróbica de silagem de trigo, sorgo e milho, e observaram aumento em todos os tratamentos. Com dois dias de fermentação,

eles observaram 5,1 log UFC/g para o tratamento combinado de *Propionibacterium acidipropionici* e *Lactobacillus plantarum*. Com 4 dias, observaram 6,2 log UFC/g para o tratamento combinado de *Propionibacterium acidipropionici* e *Lactobacillus plantarum*. No final de 60 dias de tratamento, observaram 8,6 log UFC/g para o tratamento combinado de *Propionibacterium acidipropionici* e *Lactobacillus plantarum*. O inoculante foi aplicado contendo $1,0 \times 10^6$ UFC/g.

Pereira et al. (2007), avaliaram 3 inoculantes em silagem de capim elefante, T1: tratamento controle, T2: Sil All contendo *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus salivaris* (10 bilhões UFC/g), enzimas celulase e hemicelulase a 5%, e T3 Bacto Silo contendo complexo bacteriano em alta concentração e complexo enzimático amilolítico, em um período de 56 dias, onde observou um aumento da população de bactéria láctica em todos os tratamentos, atingindo o maior numero no 14^o dia de tratamento em todos. T1: 6,04 dia 1, 8,34 dia 14 e 7,17 dia 56, T2: 6,36 dia 1, 8,67 dia 14, e 7,25 dia 56, T3: 6,78 dia 1, 8,67 dia 14, e 7,34 dia 56, valores esses próximos ao encontrados nesse trabalho. O mesmo foi observado por Oliveira et al. (2007), que utilizaram capim mombaça e avaliaram 3 tratamentos (T1: controle; T2: *Streptococcus bovis* HC5; T3: *Streptococcus bovis* JB1) em um período de fermentação de 28 dias, onde também obteve uma maior população de bactérias lácticas no 14^o dia de fermentação. Os valores obtidos por Oliveira et al. (2007), para as contagens de bactérias lácticas foram 7,48 UFC/g (dia 1), 8,71 UFC/g (dia 14) e 8,27 UFC/g (dia 28) para o tratamento controle. Para o tratamento 1, as populações observadas foram 7,81 UFC/g (dia 1), 9,11 UFC/g (dia 14) e 8,57 UFC/g (dia 28), enquanto que para o tratamento 2, os resultados observados foram 7,82 UFC/g (dia 1), 9,40 UFC/g (dia 14) e 8,69 UFC/g (dia 28).

5.2 Aplicação dos inoculantes escolhidos na silagem de grão-úmido de milho

Com base nos resultados microbiológicos obtidos (item 5.1), optou-se pela aplicação dos inoculantes descritos na Tabela 3 no processo de fermentação da silagem de grão úmido de milho, pois foram os que apresentaram maior concentração de população de micro-organismos.

Tabela 3. Inóculos selecionados para aplicação na silagem de grão úmido de milho, após observação dos resultados obtidos na análise microbiológica.

Inóculos	Composição
1	Água + cultura comercial*
2	7,4g de soro** + cultura comercial + 2% de sacarose
3	7,4g de soro + cultura comercial
4	3,7g de soro + cultura comercial*
5	1,85g de soro + cultura comercial*

* SiloMax Matsuda Milho, constituído pelos micro-organismos *Lactobacillus plantarum* ($3,0 \times 10^{10}$ UFC/g) e *Propionibacterium acidipropionici* ($3,0 \times 10^{10}$ UFC/g).

** lípidios: 1.5%; proteínas: 11 a 12%; lactose: ≥ 72 g/100g; cinzas: 10% (dados fornecidos pelo fabricante na ficha técnica do produto).

As populações de micro-organismos foram superiores nos inoculantes preparados com soro de queijo, quando estas populações foram comparadas às populações detectadas no inoculante preparado conforme o fabricante recomenda (água). Tal fato ocorreu devido à qualidade nutricional do soro, que oferece nutrientes importantes para o desenvolvimento bacteriano, uma vez que esse substrato é rico em proteínas, lactose, minerais e vitaminas (TEIXEIRA; FONSECA, 2008).

No entanto, mesmo com o abaixamento do pH da massa ensilada, observou-se a presença de fungos na mesma. Tal fato deve estar relacionado com a taxa de abaixamento do pH das massas ensiladas. De acordo com Pinto (2006), somente o baixo pH final, não garante que a atividade de micro-organismos indesejáveis sejam prevenidos durante o processo de fermentação. Para que isso ocorra, é necessário que a redução do pH seja rapidamente atingida. A inibição do crescimento de bactérias indesejáveis esta associada com o nível de produção de ácido láctico, que depende da população de bactéria láctica presentes e a disponibilidade de substrato para essa bactéria inoculada se multiplicar juntamente com a diminuição do pH.

5.3 Análises físico-químicas

Os resultados médios das determinações de matéria seca, cinzas, proteína bruta, extrato etéreo, fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) para as amostras de milho antes do processo de ensilagem e após 45 dias de fermentação estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores* (média \pm desvio-padrão) obtidos para as determinações de matéria seca, cinzas, extrato etéreo, proteína bruta, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido, para as amostras de milho antes do processo de ensilagem e após 45 dias de fermentação.

	Inóculos ¹	Matéria Seca	Cinzas	Extrato Etéreo	Proteína	FDN ²	FDA ³
Antes⁴	1	60,73 \pm 1,16 ^{Aa}	1,31 \pm 0,04 ^{Aa}	4,22 \pm 0,14 ^{Aa}	8,62 \pm 0,24 ^{Aa}	19,92 \pm 1,23 ^{Aa}	5,33 \pm 0,12 ^{Aa}
	2	67,25 \pm 1,95 ^{Ab}	1,81 \pm 1,32 ^{Bb}	3,37 \pm 0,54 ^{Ab}	8,55 \pm 0,02 ^{Aa}	20,18 \pm 3,05 ^{Aa}	5,40 \pm 0,09 ^{Aa}
	3	61,82 \pm 0,41 ^{Aa}	1,29 \pm 0,04 ^{Aa}	3,67 \pm 0,50 ^{Ab}	8,41 \pm 0,04 ^{Aa}	25,89 \pm 4,06 ^{Ab}	5,61 \pm 0,28 ^{Aa}
	4	58,80 \pm 0,54 ^{Aa}	1,33 \pm 0,02 ^{Aa}	3,66 \pm 0,29 ^{Ab}	8,68 \pm 0,09 ^{Aa}	23,38 \pm 2,42 ^{Ab}	5,25 \pm 0,47 ^{Aa}
	5	61,59 \pm 1,11 ^{Aa}	1,36 \pm 0,03 ^{Aa}	3,62 \pm 0,25 ^{Ab}	8,80 \pm 0,02 ^{Aa}	22,02 \pm 2,53 ^{Ab}	5,14 \pm 0,38 ^{Aa}
Depois⁵	1	60,13 \pm 1,47 ^{Aa}	1,38 \pm 0,19 ^{Aa}	4,13 \pm 0,07 ^{Aa}	8,54 \pm 0,05 ^{Aa}	14,87 \pm 1,46 ^{Ba}	3,81 \pm 0,38 ^{Ba}
	2	64,11 \pm 1,16 ^{Bb}	1,51 \pm 0,10 ^{Aa}	4,02 \pm 0,05 ^{Ba}	8,27 \pm 0,07 ^{Aa}	13,86 \pm 1,57 ^{Ba}	3,50 \pm 0,33 ^{Ba}
	3	60,64 \pm 0,60 ^{Aa}	1,50 \pm 0,13 ^{Aa}	3,88 \pm 0,01 ^{Aa}	8,37 \pm 0,03 ^{Aa}	12,57 \pm 0,86 ^{Bb}	3,61 \pm 0,17 ^{Ba}
	4	58,51 \pm 0,45 ^{Aa}	1,46 \pm 0,21 ^{Aa}	3,90 \pm 0,14 ^{Aa}	8,41 \pm 0,03 ^{Aa}	12,57 \pm 0,78 ^{Bb}	3,53 \pm 0,05 ^{Ba}
	5	60,71 \pm 0,89 ^{Aa}	1,27 \pm 0,24 ^{Aa}	3,97 \pm 0,14 ^{Aa}	8,56 \pm 0,24 ^{Aa}	11,85 \pm 0,57 ^{Bb}	3,76 \pm 0,23 ^{Ba}

* Porcentagem.

¹ Ver tabela 3 para descrição dos inóculos.

² Fibra em detergente neutro.

³ Fibra em detergente ácido.

⁴ Material analisado antes do processo de ensilagem.

⁵ Material analisado após a abertura do silo, ao término do processo de ensilagem.

^{a,b,c}: letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes inóculos para cada período de avaliação (antes e após a fermentação) para cada parâmetro avaliado.

^{A,B,C,D}: letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre cada inóculo preparado, para os diferentes períodos de avaliação (antes e após a fermentação) para cada parâmetro avaliado.

No presente trabalho, para matéria-seca, apenas observou-se diferença significativa nos valores obtidos para o inóculo 2, quando o material foi comparado aos demais, nos dois períodos (antes e após a ensilagem). Após a ensilagem, o silo inoculado este inóculo apresentou redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de matéria seca. No entanto, tal perda é considerada pequena, e pode estar relacionada com perdas inerentes ao processo de ensilagem, ou seja, perdas inevitáveis, como descrito por Ítavo (2004) e Morais (2012).

Com relação às quantidades de proteína, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os diferentes silos em ambos os períodos ($p > 0,05$). Resultado semelhante ao presente trabalho foi encontrado por Ítavo (2006), que não observou influência da presença do inoculante durante o período de sobre o teor de proteína após 64 dias de ensilagem do grão úmido de milho. Os valores observados foram de 6,96 e 7,32% de proteína, para o silo controle e inoculado, respectivamente.

Diferentemente, Morais (2012) observou diferenças significativas para esse parâmetros em silagem, com valores médios de 8,47 e 8,71% para silagem de grãos úmidos de milho preparada com e sem inóculo microbiano, respectivamente, após 64 dias.

Silva et al. (2010) não observaram diferenças estatísticas nos resultados bromatológicos de análises realizadas com a silagem de grão úmido de milho aditivada ou não com inoculante bacteriano-enzimático. Os pesquisadores não observaram alterações significativas nos valores de matéria seca, proteína bruta, fibra em detergente ácido, fibra em detergente neutro, extrato etéreo e cinzas. Resultados similares foram encontrados por Kung et al. (1993), Pedroso et al. (2000) e Ítavo et al. (2005), que observaram que a adição de inoculantes bacterianos e enzimáticos em silagem de grãos úmidos de milho não promoveram alterações estatisticamente significativas nos valores de matéria-seca.

Diferentemente de Ítavo (2004) que não observou influência do inoculante sobre a silagem de grão úmido de milho no teor de matéria mineral, durante o período de avaliação, teores médios encontrados de 3,37% e 3,28% para silagens controle e inoculadas, o presente trabalho foi observado valores bem

menores de matéria mineral. Isso pode estar relacionado ao fato das perdas de conteúdo celulares durante a fermentação.

Na análise de extrato etéreo, somente o inoculo de numero 2 apresentou aumento significativo nos valores antes e depois a ensilagem. Igualmente, Jobim et al. 2008, obtiveram 4,7% antes da ensilagem, e 5,2% depois da ensilagem, valores esses maiores que o presente trabalho. Silagem de grãos úmido de milho apresentam maiores concentrações de extrato etéreo, pois os grãos apresentam maiores teores de gordura do outras silagens, como por exemplo, silagem da plante inteira do milho (2,7 – 3,2%), silagem de alfafa (3,0%).

A maioria dos resultados obtidos nas análises bromatológicas realizadas não apresentaram diferenças significativas quando os dois períodos foram analisados (antes e após a ensilagem), exceto para FDN e FDA, que apresentaram diferenças estatísticas para todos os inóculos estudados ($p < 0,05$).

Os teores de FDN e FDA apresentaram alterações quando os dados foram comparados (antes e após ensilagem). Foram observadas reduções significativas para todos os inóculos ($p < 0,05$). A redução da fração fibrosa deve-se, provavelmente, à hidrólise ácida da hemicelulose, que resulta em ruptura das células da forragem, como descreveu Ítavo (2006). Resultados contrários foram encontrados por Siqueira (2007), que observou elevação nos teores de FDN e FDA em todas as silagens, sendo as médias de FDN 52,1% e 75,3% antes e depois da ensilagem, respectivamente. Para os mesmos períodos, observaram aumento nos valores de FDA: 34,8% e 48,7%, respectivamente. Diferentemente, Magalhães e Rodrigues (2004) não observaram alterações quanto aos teores de FDN e FDA, sendo as médias de 46,65% e 47,10% de FDN controle e inoculada, respectivamente, e 39,76% e 40,16% de FDA controle e inoculada, respectivamente.

Zanette (2010) utilizou planta de milho e açúcar observou que não houve diferença estatisticamente, porém a planta de milho que teve inclusão de açúcar teve menor valor de FDN, por efeito de diluição do próprio açúcar.

Ferlon et al. (1995) alertam que a maior disponibilização de açúcar para o processo fermentativo de silagens ricas em grãos nem sempre é positiva, uma vez que há possibilidade desses açúcares também favorecerem a produção de

alcoóis por leveduras, o que representa aumento de perda de matéria seca e da capacidade de putrefação da silagem após a abertura do silo e redução do consumo de silagem pelo animal.

Bautista-Trijilio et al. (2009) ao trabalharem com silagens de milho adicionada de 10% de melaço de cana-de-açúcar na matéria natural, relatam diferenças significativas ($p < 0,05$) para redução de FDA frente a silagem sem melaço. Enquanto que, Paviz et al. (2010) ao ensilarem sorgo com inoculante bacteriano ou 5% de melaço de cana-de-açúcar na matéria natural, não encontraram diferença para FDN entre os tratamentos e o controle.

Rodrigues et al. (2004), na comparação entre material original e silagem, encontraram redução nos valores de FDN (69,66% contra 63,37%) e de FDA (39,11% contra 38,47%), sendo que o autor explicou as reduções encontradas como resultado da degradação da hemicelulose por meio da ação de enzimas da própria planta e/ou adicionadas ao material, o que pode justificar o fato de no presente trabalho existir tendência de reduções de FDN e FDA na silagem que teve adicionada inóculo na sua confecção.

Van Soest (1994) afirmou que a fração fibrosa do material ensilado pode ser modificada, em decorrência do decréscimo dos carboidratos solúveis, de parte da fração celulose e degradação variável da fração hemicelulose (FDN) no processo de ensilagem, uma vez que faz parte da planta, implicam em modificações da fração fibrosa na silagem. Guimarães Junior et al. (2005) avaliaram o material original e silagens de milho, após 56 dias de fermentação, em silos de laboratório fabricado com PVC, verificaram reduções nos teores de FDN (60,76% contra 51,80%) e de FDA (33,58% contra 31,54%), fato relacionado, segundo autores, ao consumo da fração hemicelulose como fonte de substrato adicional para fermentação pelos micro-organismos dentro do silo.

Os valores obtidos neste trabalho, referendo as análises de FDN e FDA foram bem abaixo dos valores obtidos pelos autores citados acima.

A tabela 5 apresenta os valores de pH obtidos para a massa antes e depois do processo de ensilagem.

Tabela 5. Valores (média \pm desvio padrão) obtidos após determinação do pH antes e depois o processo de ensilagem.

	Inóculo 1	Inóculo 2	Inóculo 3	Inóculo 4	Inóculo5
Antes	3,69 \pm 0,14 ^{Aa}	3,76 \pm 0,06 ^{Aa}	3,65 \pm 0,05 ^{Aa}	3,57 \pm 0,09 ^{Aa}	3,65 \pm 0,13 ^{Aa}
Depois	3,32 \pm 0,15 ^{Ab}	3,49 \pm 0,09 ^{Ab}	3,23 \pm 0,11 ^{Ab}	3,23 \pm 0,11 ^{Ab}	3,32 \pm 0,08 ^{Ab}

Ver tabela 3 para descrição dos inóculos.

^{a,b,c}: letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) para um mesmo inóculo em diferentes períodos de avaliação (antes e após a fermentação).

^{A,B,C,D}: letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre cada inóculo preparado, para os diferentes períodos de avaliação (antes e após a fermentação).

Reduções significativas nos valores de pH ($p < 0,05$) foram observadas para todos os tratamentos após o período de 45 dias de ensilagem. Esta redução evidencia que o processo de fermentação das silagens foram adequados. Semelhantemente ao presente trabalho, Sebastian et al. (1996), em avaliação para determinar o efeito de aditivos em silagens de grãos úmidos de milho sobre o pH das silagens, revelaram que a taxa de declínio de pH pareceu maior para a silagem inoculada, indicando o que aporte adicional de micro-organismos foi responsável pela potencialização da fermentação dos carboidratos presentes na biomassa. Silva et al. (2010) observaram valores de pH de 3,42 e 3,28 para tratamento controle (sem inoculante) e com inoculante, respectivamente, em silagem de grão úmido de milho. Da mesma forma, Mendes et al. (2008) obtiveram valores médios de pH de 3,95 e 3,52 para silagem de cana-de-açúcar sem aditivo e aditivada, respectivamente.

Pinto (2006) obteve valores de pH próximos aos observados nesse trabalho. Os valores de pH encontrados para a silagem de milho variou entre 3,86 (sem inoculante) e 4,13 (após 110 dias de inoculação). Quando se trabalha com forragens com altos teores de açúcares e baixos de proteína, ocorre normalmente a estabilidade do pH antes do décimo dia de ensilagem, e em seu trabalho, Pinto (2006) demonstrou que não houve efeito do tempo de abertura dos silos sobre o pH da silagem de milho, portanto o autor concluiu que com 10 dias de ensilagem, o pH já estava estabilizado.

Segundo Mülbach (1999) silagens de milho com qualidade adequada para alimentação de ruminantes devem apresentar pH abaixo de 4,0; valores estes que permitem não ocasionar problemas de redução da palatabilidade da

silagem ou do consumo voluntário de alimentos, além de determinar menores sobras de alimento no cocho.

De acordo com Vilela (1998), o limite superior de pH para as silagens de qualidade satisfatória seria de 4,2. Deve-se lembrar que, para ter sucesso na ensilagem, é essencial garantir a fermentação láctica e inibir o crescimento de micro-organismos como clostrídios, enterobactérias, leveduras e fungos aeróbicos. O controle do desenvolvimento de clostrídios é feito através da redução do pH. As enterobactérias são inibidas geralmente em pH abaixo de 4,5 (SANTOS et al., 2006).

De acordo com Ítavo (2004), o uso de aditivos no processo de ensilagem vem apresentando resultados conflitantes. Outros experimentos como os realizados no presente trabalho, têm sido realizados com inoculantes microbianos (HENDERSON, 1993; MCALLISTER et al., 1998; MIZUBUTI et al., 2002). Entretanto, nessas pesquisas, o inoculante não melhorou significativamente as características da fermentação da silagem. No presente trabalho, observou-se que as melhoras são mínimas, dependendo do tipo de formulação do inoculante empregado.

Santos et al. (2006) estudaram o efeito da adição do soro de queijo em silagem de capim-elefante, e observaram que para a proteína bruta, houve um maior valor para a silagem controle.

Uma parte da proteína dos tratamentos com soro pode ter sido perdida no efluente, considerando-se as maiores perdas por efluente observadas em seu trabalho. Já na matéria seca na silagem com 5% de soro, que por sua vez não diferiu daquela com 2,5%. As perdas por efluente podem ter tornado próximos os teores de matéria seca dos dois tratamentos com soro. Silagens com elevada umidade podem apresentar elevadas quantias de efluentes, resultando em perdas apreciáveis.

Santos et al. (2006) em seu trabalho, observaram que a adição de soro nas concentrações utilizadas não promoveu grandes reduções do teor de matéria seca das silagens, por causa, provavelmente, da baixa quantidade empregada. Santos et al. (2006) também não observaram diferenças significativas para os teores de FDN e FDA, o que pode ser explicado pela semelhança da recuperação da matéria seca das silagens estudada. Isto sugere que a adição

do soro nas duas concentrações utilizadas não comprometeu a quantidade de fibra das silagens.

6 Conclusões

O uso de inoculantes em silagem de grãos úmido de milho apresentou efeito significativo sobre alguns aspectos da composição bromatológica da silagem. Apenas as análises de FDN e FDA apresentaram alterações no após 45 dias de fermentação. Ambas as análises apresentaram reduções em seus valores médios, o que se deve, provavelmente, à hidrólise ácida da hemicelulose, que resulta em ruptura das células da forragem, diminuindo a fração fibrosa da silagem.

Com relação aos valores de pH, observou-se resultados satisfatórios, uma vez que houve uma redução significativa em todos os tratamentos testados, significando que o processo de fermentação da silagem foi adequado.

A adição de soro de queijo, sacarose e glicose não influenciou sobre a qualidade da silagem, no entanto observou-se aumento nas populações dos micro-organismos presentes no inoculante em alguns experimentos, principalmente nos teste contendo soro, independentemente de sua concentração (7,4%; 3,7% ou 1,85%). Portanto, a utilização do soro auxiliou na multiplicação dos micro-organismos, principalmente nos inóculos que permaneceram 48 horas incubados a 25 °C depois de preparados, demonstrando que o soro pode ser utilizado como uma fonte de carbono para as bactérias lácticas.

Quanto às fontes de sacarose e glicose testadas, apenas em um experimento (contendo 2% de sacarose) houve um aumento significativo, nas populações dos micro-organismos presentes no inoculante.

7 Referências

ALMEIDA, G.B.S. **Produtividade, composição morfológica, perdas fermentativas e valor nutritivo do milho para produção de silagem**. 2011. 127 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária. Jaboticabal, 2011.

ALMEIDA K.E.; TAMIME A.Y.; OLIVEIRA M.N. Acidification rates of probiotic bacteria in Minas frescal cheese whey. **Food Science and Technology**, v.41, n.2, p.311-316, 2008.

AMRANE, A.; PRIGENT, Y. Influence of yeast extract concentration on batch cultures of *Lactobacillus helveticus*: growth and production coupling. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.14, n. 4, p. 529-534, 1998.

ANDRADE, A.C. **Estudo da fermentação simultânea à hidrólise, de soro de queijo, utilizando lactose e *Saccharomyces cerevisiae***. 2005. 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos. Uberlândia, 2005.

ANDRADE, R.L.P.; MARTINS, J.F.P. Influência da adição da fécula de batata-doce (*Ipomoea batatas L.*) sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n.3, p. 249-253, 2002.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16th ed. Washington: AOAC, 1995. 1141p.

ÁVILA, C.L.D.S. **Isolamento e uso de *Lactobacillus buchneri* na ensilagem de capim-mombaça e cana-de-açúcar**. 2007. 175 f. Tese (Doutorado em Zootecnia), área de concentração em forragicultura e pastagem. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

ÁVILA, C.L.S.; VALERIANO, A.R.; PINTO, J.C.; FIGUEIREDO, H.C.P. REZENDE, A.V.; SCHWAN, R.F. Chemical and microbiological characteristics of sugar cane silages treated with microbial inoculantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.1, p.25-32, 2010.

BALDUINO, R.; OLIVEIRA, A.S.; HAULY, M.C.O. Influência da fonte de carbono e da temperatura sobre a fermentação láctica desenvolvida por cultura mista de bactérias lácticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.3, p.363-366, 1999.

BAUTISTA-TRUJILLO, G.U.; COBOS, M.A.; VENTURA-CANSECO, L.M.C.; AYORA-TALAVERA, T.; ABUD-ARCHILA, M. Effect os sugarcane molasses and whey on silage qualitu of maize. **Asian Journal of Crop and Science**, v.1, n.1, p.34-39, 2009.

BOLSEN, K.K.; ASHBELL, G.; WILKINSON, J.M. Silage additives. In: WALLACE, J.; CHESSON, A. (Eds.). **Biotechnology in animal feeds and animal feeding**. New York: VCH Weinheim. p.33-54, 1995.

BOWER, J.A. Statistics for food science – V: ANOVA and multiple comparisons (part B). **Nutrition and Food Science**, v.28, n.1, p.41-48, 1998a.

BOWER, J.A. Statistics for food science – V part C: non-parametric ANOVA. Nutrition and Food Science, v.28, n.2, p.102-108, 1998b.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. São Paulo: Artmed, 2003, 255p.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. São Paulo: Artmed, 2003. 256p.

CAPITANI, C.D.; PACHECO, M.T.D.; GUMERATO, H.F.; VITALI, A.; SCHMIDT, F.L. Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.11, p.1123-1128, 2005.

CARDOSO, E.G.; SILVA, J.M. **Silos, silagem e ensilagem**. Embrapa. Campo Grande, MS, 14 fev. 1995. Disponível em:<<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD02.html>> Acesso em 20 jun. 2011.

CARMO, A.P. **Produção de cultura DVS (Direct Vat Set) para *Lactobacillus delrueckii* UFV H2b20 cultivado em soro de queijo minas frescal**. 2006. 66 f. Tese. Departamento de Microbiologia Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

COAN, R.M. **Avaliação da polpa cítrica peletizada como aditivo no processo de ensilagem dos capins tanzânia e marandu**. 2005. 205 f. Tese. Departamento de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

COELHO, L.F. **Isolamento e seleção de microrganismos e desenvolvimento de tecnologia para produção de ácido láctico**. 135 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2011.

DEMIRCI, A.; POMETTO, A. L.; LEE, B.; HINZ, P. N. Media evaluation of lactic acid repeated-batch fermentation with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.46, n.11, p.4771-4774, Nov. 1998.

DWORKIN, M.; STANLEY, F.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.; STACKEBRANDT. **The Prokaryotes**: a handbook on the biology of bacteria, 3. ed. v.4. New York: Springer, 2006.

FELTRIN, V.P.; SANT'ANNA, E.S.; PORTO, A.C.S.; TORRES, R.C.O. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melaço de cana-de-açúcar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 1, p. 119-24, 2000.

FERLON, D.R.; HENDERSON, A.R.; ROOKE, J.A. The fermentative preservation of grasses and forage crops. **Journal as Applied Bacteriology**, v.79, n. 24, p. 118S-31S, 1995.

FIGUEIREDO, H.M.; PASSOS, F.J.V. Influencia da fonte de nitrogênio no crescimento de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20. **Sitientibus**, Feira de Santana, n.28, p. 37-50, 2003.

FILYA, I.; SUCU, E.; KARABULUT, A. The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silagens. **Journal Applied Microbiology**, v.97, n.4, p.818-821, 2004.

GIMENES, A.L.G.; MOREIRA, F.B.; MIZUBUTI, I.Y.; PEREIRA, E.S. Efeitos da utilização de inoculantes em silagens de forrageiras sobre os teores de proteína e fibra, digestibilidade dos nutrientes, pH, fermentação e estabilidade aeróbia. **Ciências Agrárias**, v.26, n.4, p.601-610, 2005.

GUIMARÃES JUNIOR, R. GONSALVES, L.C.; RODRIGUES, J.A.S. Matéria seca, proteína bruta, nitrogênio amoniacal e pH das silagens de três genótipos de milheto (*Pennisetum glaucum* L.R.B.R) em diferentes períodos de fermentação. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.4, n.2, p.251-258, 2005.

HARRISON, J.H.; BLAUWIEKEL, R. Fermentation and utilization of grass silage. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.10, p. 3209-3235, 1994.

HENDERSON, N. Silage additives. **Animal Feed Science and Technology**, v.45, n.1, p.35-56, 1993.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Fermented and non-fermented milk products**. Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus*. Culture media. **Bulletin of the IDF 306**. Brussels: IDF, 1995. p.23-33.

ÍTAVO, C.C.B.F.; MORAIS, M.G.; ÍTAVO, L.C.V.; SOUZA, A.R.D.L.; DAVY, F.C.A.; ALBERTINI, T.Z.; LEMPP, B.; JOBIM, C.C. Padrão de fermentação e composição química de silagens de grãos úmidos de milho e sorgo submetidas ou não a inoculação microbiana. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.655-664, 2006.

ÍTAVO, C.C.B.F. **Silagens de grãos úmidos de milho e de sorgo: padrão de fermentação, composição química, valor nutricional e desempenho em ovinos.** 2004. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2004.

JAREMTCHUK, A.R.; JAREMTCHUK, C.C.; BAGLIOLI, B.; MEDRADO, M.T.; KOZLOWSKI, L.A.; COSTA, C.; MADEIRA, H.M.F. Características agronômicas e bromatológicas de vinte genótipos de milho (*Zea mays* L.) para silagem na região leste paranaense. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v.27, n.2, p.181-188, 2005.

JOBIM, C.C.; REIS, R.A.; RODRIGUES, L.R.A. Avaliação da silagem de grãos úmidos de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, n.3, p.311-315, 1997.

JOBIM, C.C.; REIS, R.A.; SCHOKEN-ITURRINO, R.P.; ROSA, B. Desenvolvimento de microrganismos durante a utilização de silagens de grãos úmidos de milho e de espigas de milho sem brácteas. **Acta Scientiarum**, v.21, n.3, p.671-676, 1999.

JOBIM, C.C.; LOMBARDI, L.; MACEDO, F.A.F.; BRANCO, A.F. Silagens de grãos de milho puro e com adição de grãos de soja, de girassol ou uréia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.5, p.649-656, 2008.

KUNG, L.; CHEN, J.H; KRECK, E.M. Effect of microbial inoculants on the nutritive value of corn silage for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.12, p. 3763-3770, 1993.

KUNG JR., L.; STOKES, M.R.; LIN, C.J. Silage additives. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Eds.). **Silage Science and Technology**. Wisconsin: ASA; CSSA; SSSA, p.305-360, 2003.

MAGALHÃES, V.J.A.; RODRIGUES, P.H.M. Desempenho produtivo de vacas leiteiras alimentadas com silagem pré-seca de alfafa adicionada de inoculante microbiano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.2016-2022, 2003.

MAGALHÃES, V.J.A.; RODRIGUES, P.H.M. Avaliação de inoculante microbiano na composição bromatológica, fermentação e estabilidade aeróbica da silagem pré-seca de alfafa. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.1, p. 51-59, 2004.

MARTIN, L.C.T. **Bovinos volumosos suplementares: métodos de conservação de foragem, formação e uso de capineiras, aproveitamento de resíduos agroindustriais**. São Paulo: Nobel, 1997. 143p.

McALLISTER, T.A; FENIUK, R.; MIR, P.; SELINGER, L.B.; CHENG, K.J. Inoculants for alfafa silage: Effects on aerobic stability, digestibility and the growth performance of feedlot steers. **Livestock Production Science**, v. 53, n.2, p.171-181, 1998.

MENDES, C.Q.; SUSIN, I.; NUSSIO, L.G.; PIRES, A.V.; RODRIGUES, G.H.; URANO, F.S. Efeito do *Lactobacillus buchneri* na fermentação, estabilidade aeróbia e no valor nutritivo de silagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.12, p.2191-2198, 2008.

MIZUBUTI, I.Y.; RIBEIRO, E.L.A.; ROCHA, M.A.; SILVA, L.D.F.; PINTO, A.P.; FERNANDES, W.C. Consumo e digestibilidade aparente das silagens de milho (*Zea mays L.*), sorgo (*Sorghum bicolor (L.) Moench*) e girassol (*Helianthus annuus L.*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.1, p.267-272, 2002.

MORAIS, M.G.; ÍTAVO, C.C.B.F.; ÍTAVO, L.C.V.; BUNGENSTAB, D.J.; RIBEIRO, C.B.; OLIVEIRA, L.B.; SILVA, J.A. Inoculação de silagens de grãos úmidos de milho, em diferentes processamentos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.31, n.4, p.969-981, 2012.

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

MÜHLBACH, P.R.F. Silagem: Produção com controle de perdas. In: LOBATO, J.F.P.L.; BARCELLOS, J.O.J.; KESSLER, A.M. Produção de Bovinos de Corte. Porto Alegre: EDI-PUCRS, 1999. 346 p.

NUSSIO, L.G.; JUNIOR, G.B.M.; BALSALOBRE, M.A.; CORSI, M. **Produção de silagem de gramíneas tropicais: conceitos básicos e aplicados**. Piracicaba: FEALQ, 35p, 2004.

OLIVEIRA, A.R.; BUZATO, J.B.; HAULY, M.C.O. Produção contínua de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* a partir de melaço de cana-de-açúcar suplementado. **Semina: Ciências Agrárias**, v.26, n.1, p.53-60, 2005.

OLIVEIRA, F.C.L.; JOBIM, C.C.; SILVA, M.S.; JUNIOR, M.C.; JUNIOR, V.H.B.; ROMAN, J. Produtividade e valor nutricional da silagem de híbridos de milho em diferentes alturas de colheita. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.4, p.720-727, 2011.

OLIVEIRA, J.S.; SANTOS, E.M.; ZANINE, A.M.; MANTOVANI, H.C.; PEREIRA, O.G.; ROSA, L.O. Populações microbianas e composição química de silagem de capim-mombaça (*Panicum maximum*) inoculado com *Streptococcus bovis* isolado de rúmen. **Archives of veterinary science**, v.12, n.2, p. 35-40, 2007.

OLIVEIRA, M.R.; NEUMANN, M.; OLIBONI, R.; GOBETTI, S.T.C.; FARIA, M.V. Uso de aditivos biológicos na ensilagem de forrageiras. **Ambiência – Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v.7, n.3, p. 589-601, 2011.

PAYOT, T.; CHEMALY, Z.; FICK, M. Lactic acid production by *Bacillus coagulans* - Kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. **Enzyme & Microbial Technology**, New York, v. 24, n. 3-4, p. 191-199, 1999.

PEDROSO, A.F.; FREITAS, A.R.; SOUZA, G.B. Efeito de Inoculante bacteriano sobre a qualidade da silagem e perda de matéria seca durante a ensilagem de sorgo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.1, p.48-52, 2000.

PEDROSO, S.; EZEQUIEL, J.M.B.; OSUNA, J.T.A.; SANTOS, V.C. Características agrônômicas e nutricionais de híbridos de milho e suas silagens (*Zea mays* L.). **Arquivos de Veterinária**, v.22, n.3, p.248-258, 2006.

PEREIRA, J.R.A.; REIS, R.A. Produção de Silagem pré-secada com forrageiras temperadas e tropicas. **Anais do simpósio sobre produção e utilização de forragens conservadas**, 319p. 2001.

PEREIRA, O.G.; ROCHA, K.D.; FERREIRA, C.L.L.F. Composição química, caracterização e quantificação da população de microrganismos em capim-elefante cv. Cameroon (*Pennisetum purpureum*, Shum.) e suas silagens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.8, p. 1742-1750, 2007.

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

PINTO, A.P. **Avaliações químicas, nutricionais e microbiológicas das silagens de bagaço de laranja e de milho**. Londrina, Universidade Estadual de Londrina, 2006. 114 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

RODRIGUES, P.H.M.; RUZANTE, J.M.; SENATORE, A.L.; LIMA, F.R.; MELOTTI, L.; MEYER, P.M. Avaliação do uso de inoculante microbianos sobre a qualidade fermentativa e nutricional da silagem de milho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.3, p. 538-545, 2004.

SANTOS, E.M.; ZANINE, A.M.; FERREIRA, D.J.; OLIVEIRA, J.S.; PEREIRA, O.G.; ALMEIDA, J.C.C. Efeito da adição do soro de queijo sobre a composição bromatológica, fermentação, perdas e recuperação de matéria seca em silagem de capim-elefante. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 3, p. 235 – 239, 2006.

SANTOS, R.D.; PEREIRA, L.G.R.; NEVES, A.L.A.; ARAÚJO, G.G.L.; VOLTOLINI, T.V.; BRANDÃO, L.G.N.; ARAGÃO, A.S.L.; DÓREAS, J.R.R. Características de fermentação da silagem de seis variedades de milho indicadas para a região semiárida brasileira. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.6, p.1423-1429, 2010.

SEBASTIAN, S.; PHILIP, L.E.; FELLNER, V.; IDZIAK, E.S. Comparative assessment of bacterial inoculation and propionic acid treatment on aerobic stability and microbial populations of ensiled high-moisture ear corn. **Journal of Animal Science**, v.74, n. 2, p. 447-456, 1996.

SELMER-OLSEN, E.; SORHAUG, T. Comparative studies of the growth of *Lactobacillus plantarum* in whey supplemented with autolysate from brewery yeast biomass or commercial yeast extract. **Milchwissenschaft Milk Science International**, Munchen, v.53, n.7, p.367-370, 1998.

SILVA, A.V.; **Populações microbianas em plantas de milho e sorgo, produtos da fermentação e desempenho de bovinos de corte, suplementados com suas silagens, tratadas com inoculantes microbianos**. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa, 2001. 122p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

SILVA, A.V.; PEREIRA, O.G.; GARCIA, R.; FILHO, S.D.C.V.; CECON, P.R.; FERREIRA, C.L.D.L.F. Composição e digestibilidade *in vitro* da matéria seca de silagens de milho e sorgo tratadas com inoculantes microbianos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p.1881-1890, 2005.

SILVA, J.M.; CARNAÚBA, J.P.; SILVA, I.O.; ANDRADE, D.E.G.T.; MIRANDA, E.C.; AMORIM, E.P.R. Influência de inoculante bacteriano-enzimático sobre a microbiota e qualidade nutricional de silagens de grãos úmidos de milho. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.1, p.62-72, 2010.

SOUZA, G.B.; SATO, M. **Análise química de alimentos**. Laboratório de Nutrição Animal. Fundação Instituto Agrônômico do Paraná. Curitiba, 1988.

STATSOFT INC., **Statistica for Windows**, Version 8.0, 2300 East 14th Street, Tulsa, OK, 74104, USA.

TEIXEIRA, L.V.; FONSECA, L.M. Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.1, p.243-250, 2008.

VALERIANO, A.R. **Aditivos bacterianos na ensilagem de cana-de-açúcar**. Lavras. Universidade Federal de Lavras, 2007. 87p. Tese (Mestrado em Forragicultura e Pastagem) – Universidade Federal de Lavras, 2007.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca: Cornell University, 1994. 476p.

VILELA, D. Aditivos para silagem de plantas de clima tropical. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS NA PRODUÇÃO DE RUMINANTES E NÃO RUMINANTES, 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998. p. 73-108.

ZANETTE, P.M.; **Efeito da inclusão de açúcar ou inoculante bacteriano na silagem de milho sobre perdas, valor nutricional, desempenho e eficiência econômica de novilhos confinados.** Guarapuava. Universidade Estadual do Centro-Oeste, 2010. 119p. Tese (Mestrado em Produção vegetal) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO, 2010.

ZOPOLLATTO, M.; DANIEL, J.L.P.; NUSSIO, L.G. Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.170-189, 2009.