



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA

ADIÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS E CELULOLÍTICAS EM SILAGEM DE MILHO

Acadêmico(a): Laysa Gonçalves Cruz

Dourados - MS

Setembro - 2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA

ADIÇÃO DE ENZIMAS AMILOLÍTICAS E CELULOLÍTICAS EM SILAGEM DE MILHO

Acadêmico(a): Laysa Gonçalves Cruz
Orientador(a): Prof^ª. Dr^ª. Alzira Gabriela Silva Pause

Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências para obtenção do grau de bacharel em Zootecnia.

Dourados - MS

Setembro – 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

C957a Cruz, Laysa Gonçalves
Adição de enzimas amilolíticas e celulolíticas em silagem de milho / Laysa
Gonçalves Cruz -- Dourados: UFGD, 2017.
50f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Alzira Gabriela Silva Pause

TCC (Graduação em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias,
Universidade Federal da Grande Dourados.
Inclui bibliografia

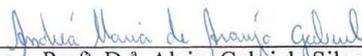
1. Amido. 2. Perdas. 3. Estabilidade aerobia. 4. Zea mays. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**TÍTULO: ADIÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS E CELULOLÍTICAS EM
SILAGEM DE MILHO****AUTOR(a):** Laysa Gonçalves Cruz**ORIENTADOR(a):** Prof^a. Dr^a. Alzira Gabriela Silva Pause

Aprovado como parte das exigências para a obtenção do grau de bacharel em **ZOOTECNIA** pela comissão examinadora.



p/ Prof^a. Dr^a. Alzira Gabriela Silva Pause
(Orientadora)



Prof. Dr. Mábio Silvan José da Silva



Prof^a Dr^a Andrea Maria de Araujo Gabriel

Data de realização: 01 de setembro de 2017



Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Seno
Presidente da comissão do TCC-Zootecnia

Aos meus familiares e todos que me ajudaram durante está caminhada.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal da Grande Dourados, a Faculdade de Ciências Agrárias, ao curso de Zootecnia pela oportunidade de realização deste.

A todos os professores do programa em especial agradeço a Prof. Dra. Alzira Gabriela Silva Pause por todo o apoio e dedicação, por me corrigir, pelo ensinamento, por aceitar me ajudar no desenvolvimento de todo o trabalho e por ter aceitado me orientar e dar todo o apoio necessário.

Ao Prof. Dr. Jefferson Rodrigues Gandra pelo ensinamento e dedicação, por ter contribuído muito na realização deste trabalho.

À minha mãe Danielle, meu padrasto Rubens meus irmãos Lucas e Luan, meu namorado Thiago pelo apoio, carinho, encorajamento e paciência que estiveram sempre ao meu lado me apoiando nas horas mais difíceis que passei, por ter me dado o carinho que eu precisava e me ajudado a vencer os obstáculos que surgiram.

As minhas colegas de laboratório, Raquel, Thais, Mariana, Gisele e a minha colega de TCC Jessica pela ajuda e amizade.

A todos aqueles que me apoiaram nesta caminhada diretamente ou indiretamente.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	3
2 - REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 – Ensilagem de plantas tropicais	4
2.2 – Silagem de milho	7
2.3 – Uso de aditivos na confecção de silagens.....	9
2.3.1 – Aditivos micobianos.....	13
2.3.2 – Ezimas.....	15
3 - MATERIAL E MÉTODOS	17
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5 – CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos aditivos para silagens.....	12
Tabela 2 - População microbiana de acordo com os tratamentos experimentais.....	20
Tabela 3 - Perdas fermentativas e estabilidade aeróbia de acordo com os tratamentos experimentais.....	23
Tabela 4 - Valor nutricional de acordo com os tratamentos experimentais.....	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Atividade enzimática de acordo com os tratamentos experimentais aos 100 dias de abertura dos silos.....	22
Figura 2 – Teores de matéria seca ao longo do período de estabilidade aeróbia de acordo com os tratamentos experimentais.....	24
Figura 3 - Valores de pH ao longo do período de estabilidade aeróbia de acordo com os tratamentos experimentais.....	25

LISTA DE ABREVIACOES

BAL – Bacterias de ácido lticas

CBT – Contagem bacteriana total

CEL – Tratamento com adio de enzima celulolítica

CNF – Carboidratos não fibrosos

CO₂ – Carbono

CON – Tratamento controle

ELL – Energia líquida da lactao

FDA – Fibra em detergente cido

FDN – Fibra em detergente neutro

GLU – Tratamento com adio de enzima amilolítica

GLU + CEL – Tratamento com adio de enzima amilolítica e celulolítica

MO – Matéria orgânica

MS – Matéria seca

NDT – Nutrientes digestíveis totais

N-NH³ - Nitrogênio amoniacal

PB – Proteína bruta

ADIÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS E CELULOLÍTICAS EM SILAGEM DE MILHO

RESUMO: Objetivou-se avaliar a interação de diferentes classes de enzimas e efeito na silagem de milho. Utilizaram-se 40 silos experimentais em arranjo fatorial 2x2 compondo 4 tratamentos, com 10 silos por tratamento. Os tratamentos foram: 1- Controle (silagem de milho sem adição de enzimas); 2- AMG (adição de 300 mL de enzima amilolítica); 3- Celluloclast (adição de 300 mL de enzima celulolítica); 4- AMG + Celluloclast (150mL de enzima amilolítica e 150 mL enzima celulolítica). As massas de forragens ensiladas foram inoculados com **KERASIL** (*Lactobacillus plantarum*: 4×10^{10} ufc/g + *Pediococcus acidilactici*: 4×10^{10} ufc/g) na proporção de 4g/t. As silagens de milho acrescidas de CEL (tratamento com adição de enzima celulolítica) apresentaram maior perda por efluente e maior valor de digestibilidade em relação aos demais tratamentos. Em relação ao pH, foi observado maior estabilidade para os tratamentos CEL e GLU+ CEL (tratamento com adição de enzima amilolítica e celulolítica) em relação aos demais. Observou-se maior atividade enzimática da celulose na silagem que recebeu o tratamento CEL. Para amilase, obteve-se maior atividade para o tratamento GLU (tratamento com adição de enzima amilolítica), seguido do tratamento GLU+CEL tanto para celulose e amilase. Observou-se menor contagem se BAL para o tratamento GLU, comparativamente ao GLU+CEL, porém, não foi observado diferenças para os tratamentos CEL e CON (tratamento controle). A interação entre as enzimas glucoamilase e celulase afetaram po/sitivamente o valor nutritivo e a estabilidade aeróbia, mas afetaram negativamente a fermentação e as perdas na silagem de milho.

Palavras-chave: amido, perdas, estabilidade aeróbia, *Zea mays*

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the interaction of different enzyme classes and effect on corn silage. 40 experimental silos were used in a 2x2 factorial arrangement, composing 4 treatments, with 10 silos per treatment. The treatments were: 1- Control (corn silage without addition of enzymes); 2-AMG (addition of 300 mL/t of amylolytic enzyme); 3- Celluloclast (addition of 300 mL/t of cellulolytic enzyme); 4-AMG + Celluloclast (150 mL/t amylolytic enzyme and 150 mL/t cellulolytic enzyme). The ensiled materials were inoculated with **KERASIL** (*Lactobacillus plantarum*: 4×10^{10} cfu/g + *Pediococcus acidilactici*: 4×10^{10} cfu/g) in the ratio of 4g/t. The corn silages plus CEL (Celluclast) showed higher losses per effluent and higher digestibility values in relation to the

other treatments. In relation to pH, greater stability was observed for the CEL and GLU + CEL treatments in relation to the others. It was observed higher cellulose enzymatic activity for the CEL treatment and for amylase greater activity was obtained for GLU treatment, followed by GLU + CEL treatment for both cellulose and amylase. In the evaluation of lactic acid bacteria, lower counts were observed for GLU treatment compared to GLU + CEL, however, no differences were observed for CEL and CON treatments. The interaction between the glucoamylase and cellulose enzymes positively affected the nutritive value and the aerobic stability and negatively affected the fermentation and losses of corn silage.

Keywords: Starch, losses, aerobic stability, *Zea mays*

1 – INTRODUÇÃO

Devido às particularidades climáticas do Brasil Central, existe uma variação sazonal inerente ao clima tropical e subtropical, assim, as flutuações entre épocas de águas e secas serão sempre uma constante, têm-se períodos em que é possível observar abundância de forragem com elevada qualidade e épocas de escassez tanto quantitativa quanto qualitativa. Isto resulta em ganho de peso durante a época das águas e perda no período de estiagem. Com isso o animal permanece por mais tempo na propriedade aumenta o custo de produção e o período de terminação. Para que a estacionalidade de produção das plantas forrageiras não afete o ganho de peso do animal e este possa ser constante, suplementa-se com feno, silagem e aditivos (acidificantes diretos, inibidores de fermentação, estimulantes de fermentação e nutrientes) como estratégias nutricionais para suprir estas exigências durante esses períodos.

Em função da fenação envolver uso de máquinas mais complexas, com custo mais alto e condições climáticas adversas (ocorrência de chuvas, falta de ventos ou umidade relativa alta) algumas vezes a produção de feno é prejudicada, tornando a conservação na forma de silagem uma alternativa mais atraente e a ensilagem o processo de conservação mais utilizado no Brasil (Cruz & Pereira, 2009).

Entre as várias espécies de forrageiras utilizadas para ensilagem podendo citar: sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), aveia branca (*Avena sativa* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.) o milho (*Zea mays* L.) destaca-se por ter flexibilidade na época de semeadura, alta produção de matéria seca (MS) por hectare, bons padrões fermentativos, facilidade de colheita mecânica, alto valor nutritivo, baixo teor de fibra e ótima concentração de energia. Para maximizar o aproveitamento das silagens de milho, tem-se pesquisado o uso de inoculantes microbianos com destaque para as amilases e celulases, devido aos altos teores de amido e celulose encontrados nas mesmas (Paziani et al., 2009; Zopollatto et al., 2009).

Segundo Pereira (2012) as enzimas são catalizadores que diminuem a velocidade das reações, tornando mais rápida a obtenção do produto. A atuação enzimática é muito específica, pois cada uma tem seu mecanismo de catalise, assim as amilases fazem a degradação do amido e as celulases fazem a degradação da celulose, tornando-os mais fácil de serem absorvidos o que resultará em um aumento da digestibilidade e conversão alimentar.

Tendo em vista o exposto, objetivou-se conduzir o estudo para avaliar a interação de diferentes classes de enzimas e efeito na silagem de milho.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Ensilagem de plantas tropicais

A adequada nutrição dos animais ao longo do ano é fundamental, não apenas para a manutenção do peso corporal, como para aumentar taxas de ganho de peso, produção de leite, sanidade e eficiência reprodutiva (Andrade, 1995; Fontaneli et al., 2011).

Quando é adotado sistema de produção baseado somente na utilização de pastagens naturais ou cultivadas, fornecidas através de pastoreio, a produção animal ocorre de forma mais prática e econômica. Porém, devido à estacionalidade de produção de forragens, a adoção exclusiva desses sistemas torna-se inviável (Jobim et al., 2005). Segundo Fontaneli & Fontaneli (2009) este período é caracterizado pela perda de peso dos animais e redução na produção.

A utilização de alimentos conservados, principalmente da silagem, é de extrema importância dentro do contexto de sistemas pecuários, independentemente se o mesmo é voltado para a produção de carne ou leite. Tal alimento poderá ser utilizado como fonte alimentar para épocas de estiagem das pastagens ou como alimento constante de dietas (Vieira et al., 2013).

Silagem é o produto de uma fermentação anaeróbia controlada de determinada forragem verde, armazenada em uma estrutura denominada silo, enquanto que, ensilagem é o conjunto de operações destinadas ao enchimento do silo (corte, picagem, transporte, compactação e vedação). O processo de produção de silagem envolve a acidificação da massa ensilada pelos produtos da fermentação (ácidos orgânicos, principalmente o ácido lático) de açúcares presentes na planta (Pereira, 2008).

Os tipos e as quantidades de ácidos dependem do conteúdo de umidade da cultura na época da ensilagem e da população relativa de diferentes espécies de bactérias presentes na cultura, conhecida como microflora epifítica (Wilkinson et al., 2003). O processo de ensilagem é complexo, devido ao grande número de microrganismos envolvidos, e pode ser considerada uma metabiose, ou seja, ocorre o desenvolvimento simultâneo e sucessivo de microrganismos de diversos gêneros e espécies, que necessitam principalmente do pH, do potencial de oxirredução e do tipo e quantidade de substratos presentes no meio (Pereira; Santos, 2006).

Uma adequada acidificação é essencial para o êxito de preservação da massa ensilada, especialmente quando a concentração de umidade da cultura é relativamente alta, devido à acidez prevenir o desenvolvimento de microrganismos deterioradores, que não toleram às mesmas condições ácidas do que as bactérias produtoras do ácido lático (BAL) (Woolford, 1984; McDonald et al., 1991).

As características que uma cultura deve apresentar para produção de silagem são as elevadas concentrações de proteína bruta (PB), energia e teor de MS com pouca concentração de fibra em detergente neutro (FDN) no ponto de colheita para beneficiar a fermentação (Paziani, 2009).

As silagens de gramíneas são consideradas de qualidade satisfatória se quando apresentam pH inferiores a 4,2, associadas a concentrações de 4 e 6% de ácido lático na MS, ácido butírico inferior a 0,2% na MS e nitrogênio amoniacal (N-NH³) inferior, ou igual, a 11-12% do nitrogênio total. Pequenas quantidades de acetato e propionato são aceitáveis nessas silagens. Os valores de carboidratos solúveis tornam-se baixos após a fermentação, sendo inferiores a 2% na MS (Castro, 2002).

Todas as espécies forrageiras podem ser utilizadas para o processo de ensilagem. Porém, as culturas de milho e sorgo parecem ser as espécies mais adaptadas ao processo de ensilagem, devido à considerável produção de MS, altos rendimentos e boa qualidade das silagens associado ao adequado conteúdo de nutrientes para promover boa fermentação dentro do silo. As gramíneas tropicais comumente cultivadas na forma de pastagem (*Brachiaria ssp.*; *Panicum maximum* e *Cynodon spp*) ou capineira (*Pennisetum spp.*; *Saccharum officinarum*), são utilizadas para a produção de silagem no Brasil em função de suas elevadas produções de biomassa ensilável, as quais diluem os custos de produção (Melo, 2004).

A silagem de sorgo pode atingir 85 a 90% do valor nutritivo da silagem de milho (Zago, 1991). Os cultivares de sorgo disponibilizados, principalmente os de duplo propósito (forragem e grão) têm proporcionado, além, de alta produção de MS desempenho animal semelhante às cultivares de milho (Fernandes et al., 2010). Fernandes et al., (2007) verificaram 6,6 kg de MS/kg ganho de peso de novilhos confinados, alimentados com silagem de sorgo, semelhante ao observado com os novilhos alimentados com silagem de milho que foi 5,39 k/g de MS/kg de ganho.

Dentre as forrageiras mais utilizadas para a ensilagem, o capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) tem se destacado. Contudo, o alto teor de umidade, os reduzidos teores de carboidratos solúveis associados ao elevado poder tampão, limitam a obtenção de silagem de qualidade no momento em que a planta atinge seu equilíbrio nutritivo, ou seja, boa produção

de MS por área associado ao bom valor nutritivo (Rêgo et al., 2011). Têm sido realizadas pesquisas visando o emprego de aditivos com elevados teores de matéria seca e assim melhorar o padrão fermentativo (Gonçalves et al., 2004; Neiva et al., 2006; Sá et al., 2007; Rêgo et al., 2010).

No Brasil, a produção de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é elevada, e sua ensilagem representa alternativa ao processo de corte diário para fornecimento do material *in natura*. No entanto, ao se considerar a possibilidade de ensilagem da cana-de-açúcar, deve-se levar em consideração que esta apresenta fermentação alcoólica, em consequência da intensa atividade de leveduras que convertem os açúcares da forragem a etanol, carbono (CO₂) e água. Teores de etanol de 8 a 17% da MS foram relatados em cana-de-açúcar ensilada sem o uso de aditivos, acompanhados por perdas gasosas de até 15,9% da MS (Pedroso et al., 2005; Siqueira et al., 2007) e perdas totais de MS de até 32,5% (Siqueira et al., 2007). Este tipo de fermentação pode causar reduções de 44 a 68% no teor de açúcares, aumento de componentes da parede celular e redução de 28% na digestibilidade da cana-de-açúcar conservada (Pedroso et al., 2005).

Os principais problemas das gramíneas tropicais como espécies para serem ensiladas se referem ao seu alto poder tampão dentro do silo, o baixo teor de MS e o baixo nível de carboidratos solúveis no momento do corte. O baixo teor de MS (abaixo de 28%) colabora para dificultar a conservação e diminuir a qualidade da silagem, proporcionando condições para o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis como fungos, leveduras e bactérias do gênero *Clostridium* produtoras de ácido butírico. O elevado poder tampão dificulta a redução do pH da massa ensilada, aumentando o que propicia de microrganismos indesejáveis sobre a estabilidade da silagem. O baixo teor de carboidratos solúveis é insuficiente para produção de níveis adequados de ácido láctico, que é o principal ácido orgânico de silagens de boa qualidade e valor nutritivo (Demarchi, 2000).

No processo de ensilagem de gramíneas forrageiras tropicais devem ser considerados alguns cuidados, como realização de emurchecimento e/ou utilização de aditivos. As silagens de capim apresentam menor custo de produção quando comparadas às silagens de milho e sorgo, entretanto, não significa que a produção de carne e/ou leite será de menor custo, pois poderão exigir maior quantidade de concentrado na dieta (Melo, 2004).

Os principais motivos da utilização de enzimas fibrolíticas como aditivos estimulantes de fermentação em silagens de capim tropicais é primeiramente, porque estas enzimas poderiam participar na degradação da parede celular (celulose e hemicelulose), disponibilizando os açúcares solúveis que poderiam ser fermentados pelas bactérias lácticas

homofermentativas, reduzindo rapidamente o pH, limitando também, a degradação, deaminação protéica e reduzir a produção de amônia. Conseqüentemente, estimularia a fermentação da silagem, devido a alta concentração de ácido lático e da relação dos ácidos lático: acético, além da redução na perda de MS. Segundo, a degradação parcial da parede celular poderia aumentar a taxa de digestibilidade da matéria orgânica (MO) da forragem (McDonald et al., 1991; Henderson, 1993; Kung Jr, 1997). Assim, para a realização desses processos, é importante que a hidrólise da celulose coincida com o crescimento inicial das bactérias lácticas e que haja degradação dos componentes da parede celular para melhorar a digestibilidade (Kung Jr, 1997).

2.2 – Silagem de milho

O milho (*Zea mays* L.) em função do seu potencial produtivo e valor nutritivo é um dos mais importantes cereais cultivados e consumidos no mundo, devido à sua multiplicidade de aplicações, tanto na alimentação humana quanto no animal, este assume relevantes papéis socioeconômicos, além de ser indispensável matéria-prima para os diversificados complexos agroindustriais (Lana et al., 2012). Também possui fundamental papel entre as plantas forrageiras, pois apresenta alto rendimento de massa verde por hectare e alta qualidade nutricional (Arcanjo Jr et al., 2016).

Esta espécie é considerada como a mais importante opção alimentar na forma de silagem para a alimentação animal, visto que, se bem realizada, produz grande quantidade de alimento com alto valor nutritivo, garantindo redução nos custos de produção e economia na utilização de ração concentrada. Entre os motivos da preferência dos produtores pelo uso do milho como forrageira para silagem estão à alta produção e a facilidade para a formação das lavouras e para o ensilamento, além da boa aceitabilidade pelo gado (Nussio et al., 2001). Outro fator que faz com que o milho seja utilizado na confecção de silagens é o fato da sua composição bromatológica atender alguns requisitos necessários que são: teor de MS entre 30% a 35%, produção de MS acima de 15 toneladas por hectare, no mínimo de 3% de carboidratos solúveis na MO, baixo poder tampão, alto conteúdo energético, alta aceitabilidade, grãos de fácil processamento e propicia uma boa fermentação microbiana (Paziani et al., 2009; Allen, 2010).

Entretanto, para que as características favoráveis sejam alcançadas, as etapas da confecção da silagem devem ser rigorosamente cumpridas para garantir um alimento de qualidade. Uma das primeiras etapas da ensilagem está na escolha do híbrido adequado, pois

cada cultivar tende a apresentar um comportamento agrônomico e nutricional distinto com base em seu grau de adaptação às condições da região de cultivo (Zopolatto et al., 2009).

Para ter a otimização de recursos e a produção de silagem de alta qualidade, é necessário observar, dados produtivos e qualitativos, características que definem a escolha mais assertiva de híbridos, que conseqüentemente impliquem em melhores resultados econômicos (Vieira et al., 2013). De acordo com Reinehr et al., (2012) a utilização de híbridos que possuem características de boa produtividade, alta participação de grãos na MS, e menores teores de FDN, na confecção da silagem, irá contribuir para que o animal ingira maior quantidade de alimento com maior aporte energético e maiores respostas em produtividade.

Neumann et al. (2017) em seu experimento para dados de biomassa verde e biomassa seca, em híbridos de milho, sendo estes: LG 6038 PRO, LG 6036 PRO e SG 6030 YG, observaram valores de 87.588 e 29.457, 85.888 e 28.089 e 79.663 kg ha⁻¹ de matéria verde e 25.609 kg ha⁻¹ de biomassa seca, respectivamente. Segundo Neumann et al. (2007), híbridos para silagem devem ter uma produção de biomassa verde dentro da amplitude de 37.000 a 75.000 kg ha⁻¹ para que apresentem uma adequada bioeficiência econômica. A produção de biomassa verde por hectare é um dos parâmetros importantes para a avaliação, pois afeta diretamente o dimensionamento de silos e toda a logística de produção de silagens, além de ser determinante na diluição dos custos de implantação pela elevação da produtividade (Paziani et al., 2009). Já a produção de biomassa seca, indica a produção propriamente dita, que evidencia a adaptação dos cultivares e a expressão de seu potencial produtivo, além de estabelecer relação com diversas variáveis, como a produtividade e qualidade do milho para silagem (Ferrari Jr et al., 2005).

Mittelmann (2005) avaliou híbridos de milho e determinou teor de proteína bruta (PB) entre 7,0 a 8,2%, FDN de 52,6 a 57,1% e o digestibilidade *in vitro* da MS de 64,2 a 67,6%. Reinehr et al. (2012) estudaram cinco híbridos de milho, quando observaram que somente o híbrido BG-7060 HG se mostrou inferior aos demais avaliado quanto aos nutrientes digestíveis totais (NDT) (65,07%). O NDT está relacionado o quão energético é um alimento, sendo que no caso das silagens de milho este se encontra em sua maior parte nos grãos, o que significa que o mesmo tem correlação direta com a contribuição dos grãos na silagem. Cabral et al. (2002) avaliaram silagens de milho com diferentes proporções de grão na MS e encontraram maiores valores de NDT, quando a introdução destes foi de 60% no alimento fermentado, obtendo-se NDT de 81,4%. O mesmo híbrido teve variação estatística significativa para energia líquida de lactação, se mostrando inferior aos demais (1,391

Mcal/kg da MS), tendo este valor ligação com a percentagem de NDT presente na silagem do mesmo.

O principal componente energético do grão de milho é o amido, que, nos ruminantes, pode ser fermentado no rúmen ou no intestino grosso ou digerido enzimaticamente no intestino delgado. A digestibilidade total do amido do milho é geralmente superior a 90% em bovinos (Owens et al., 1986), mas, em algumas situações, envolve a digestão do amido no intestino grosso, resultando em menores benefícios para o animal. A digestão microbiana do amido no rúmen ocasiona a produção de ácidos graxos voláteis, que são a principal fonte de energia dos ruminantes. A quantidade de energia extraída do amido depende principalmente da taxa de digestão no rúmen (Theurer, 1986).

O consumo de MS está relacionado a fatores de efeito químico, podendo ser através de regulação pelo hipotálamo, a temperatura corporal, e temos o hipotálamo controla também o apetite, onde temperaturas mais baixas estimulam o consumo do animal, o efeito gástrico influência diretamente na diminuição do apetite pelos detectores de ácidos graxos voláteis na parede dorsal do rúmen e por último o limite físico causado pela quantidade de fibra contida no alimento (Lana, 2005). Sendo assim, sabe-se que a FDN é limitadora de consumo, além de diluir a quantidade de energia presente no alimento (Detmann et al., 2003). O valor relativo do alimento pode ser definido como uma estimativa do valor nutricional da forragem, onde o mesmo combina o consumo estimado através da FDN concomitantemente à digestibilidade do alimento representada pela fibra em detergente ácido (FDA), sendo que este valor deve ser usado para comparação somente entre forrageiras (Rasby, 2011).

A utilização de aditivos nas silagens de milho visa uma melhor degradação de nutrientes como demonstraram Cysneiros et al. (2013) em ensaio de digestibilidade, quando verificaram interação entre níveis enzimáticos e períodos de incubação no rúmen. Para 12; 24; 48 e 96 horas de incubação, 10 mL do complexo enzimático aumentou a digestibilidade em 10,58; 12,52; 9,05 e 6,81%, em relação ao controle e concluíram que o fungo *Humicolagrisea* é produtor de enzimas de interesse na alimentação de ruminantes.

2.3 – Uso de aditivos na confecção de silagens

Embora a produção de silagem seja um processo natural, iniciado pela população microbiana epifítica presente nas plantas por ocasião da colheita, inoculantes comerciais para silagem, consistindo de culturas puras ou mistas de BAL homoláticas são frequentemente

adicionadas pelos produtores por ocasião da ensilagem, visando favorecer a fermentação homoláticas e garantir uma silagem de alta qualidade (Bolsen et al., 1996).

As BAL, geralmente presentes em menor quantidade na forragem colhida (101 UFC/g MS), assim como as enterobactérias, são anaeróbicas facultativas. Esses microrganismos fermentam o açúcar de ocorrência natural (principalmente glicose e frutose) a uma mistura de ácidos, prevalecendo o ácido láctico. O ácido láctico produzido, tanto na forma dissociada ou não, eleva a concentração de íon hidrogênio, reduzindo o pH do meio e impedir o desenvolvimento das bactérias indesejadas (McDonald et al., 1991).

Dessa forma, as características químicas e microbiológicas de uma silagem estável, de qualidade, incluem altos teores de ácido láctico relativo a ácido acético e ácido butírico, baixo pH, menores teores de amônia e nitrogênio volátil e reduzida contagem de microrganismos anaeróbicos formadores de esporos, que garantem que a massa estocada se mantenha estável sem maiores perdas advindas do processo de fermentação (Vieira et al., 2004).

Quanto aos assuntos relacionados à conservação de forragens, a utilização de aditivos na produção de silagens, há algum tempo, tem sido o mais estudado. Várias substâncias, orgânicas ou inorgânicas, bióticas ou abióticas, são pesquisadas com objetivo de modificar o processo fermentativo, diminuir perdas e/ou melhorar o valor nutricional das silagens. No processo de ensilagem, os aditivos devem elevar a recuperação de nutrientes e energia da forragem, beneficiando o desempenho dos animais (Kung Jr, 2009).

Estes tem sido usados para melhorar a fermentação e evitar a produção de ácido butírico na silagem úmida, reduzir as perdas de MS e preservar os nutrientes durante ou após a fermentação, além de outros benefícios, tais como: inibir o crescimento de microrganismos aeróbios; impedir o crescimento de organismos indesejáveis anaeróbios; evitar a atividade microbiana da planta, proteases e desaminases; melhorar o fornecimento de substratos fermentáveis para bactérias ácido lácticas; adicionar microrganismos benéficos para dominar a fermentação; fornecer ou liberar nutrientes para estimular o crescimento de microrganismos benéficos; alterar as condições de ensilagem para otimizar a fermentação (absorventes); formar produtos finais benéficos que estimulam o consumo e a produtividade animal; melhorar a recuperação de nutrientes e de MS (Jaster, 1994; Kung Jr et al., 2003; Lala et al., 2010).

Whittenbury (1961) estabeleceu as características para que uma determinada espécie ou cepa seja considerada um potencial inoculante para silagem. Dentre as condições, a bactéria deve fermentar os principais açúcares, como glicose e frutose, e não ácidos vindos da fermentação, proliferar em materiais de baixa umidade, em diferentes amplitudes de

temperatura, ser ácido tolerante e capaz de suportar pH inferior do que 4,0. Dentre as espécies, o *Lactobacillus plantarum* foi considerado um dos mais próspero, com bons resultados de redução do pH, dos teores de amônia e ácido acético e elevada produção de ácido láctico nas silagens inoculadas (Gibson et al., 1988). Atualmente, utilizam-se espécies, como *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacteria* sp., *Enterococcus* e *Bacillus* sp.

Diversas formas são relatadas na teoria que visa classificar aditivos para silagem, que considera suas características físico-químicas, finalidade de uso ou ação esperada. O “aditivo ideal” é aquele que fornece segurança no seu manuseio, beneficia na redução de perdas de MS, melhora da qualidade higiênica da silagem, que limita fermentações secundárias, aumenta o valor nutritivo e melhora a estabilidade aeróbia. No mais, oferece o maior retorno na produção animal em relação ao seu custo (Henderson, 1993). No entanto, dificilmente todas essas características podem ser encontradas em um único aditivo.

Para McDonald et al. (1991), a classificação dos aditivos para silagem são em cinco principais grupos: estimulantes de fermentação que agem por meio de uma adição de culturas bacterianas e fontes de carboidratos; inibe de fermentação (ácidos e outros); inibi a deterioração aeróbia controlando a deterioração da silagem em exposição ao ar; nutrientes que são adicionados no material para aumentar o valor nutricional da silagem; e absorventes que são adicionados principalmente nas forragens com alto teor de MS para reduzir perdas de nutrientes por efluentes e obter menor poluição ambiental. Dentro da divisão proposta por esses autores, alguns produtos podem estar em mais de uma categoria, algumas vezes com ações antagônicas em diferentes etapas do processo. De forma mais simples, Nussio & Schmidt (2004) classificaram os aditivos mais frequentemente usados no Brasil em três grupos: aditivos químicos, aditivos microbianos e sequestrantes de umidade. Nessa classificação, o grupo dos aditivos químicos tem maior indicação para aplicação em silagens de cana-de-açúcar, enquanto os sequestrantes de umidade são recomendados para aplicação em forragens úmidas, como os capins tropicais e de clima temperado. Já os aditivos microbianos cobrem uma vasta gama de possibilidades.

Woolford (1984) afirmou que a procura por aditivos é devido a dificuldade em se atingir o “teor ideal de MS” durante a ensilagem, em função das variações climáticas, e a anaerobiose em função dos tipos de silos usados. Segundo este autor a pesquisa com aditivos seguiu distintas fases de “modismos” nas classes dos produtos investigados. A classificação proposta por esse autor é apresentada na Tabela 1. Com base nela podemos afirmar que os estimulantes da fermentação são os principais aditivos aplicados em silagens na atualidade.

Tabela 1. Classificação dos aditivos para silagens

Classe	Subclasse	Modo de ação	Exemplos
Acidificantes diretos	Ácidos inorgânicos	Reduzir o pH da silagem no início do processo e induzir mudanças qualitativas na microflora.	Ácidos sulfúrico e hidrocloreto, ácidos fórmicos e acrílico.
	Ácidos orgânicos		Ácidos acético e propiônico.
Inibidores da fermentação	Esterilizantes de ação direta	Inibir a microflora em geral, imediatamente ou após a liberação do princípio ativo.	Formaldeído e hexaminas.
	Esterilizantes de ação indireta		
Estimulantes da fermentação	Substratos	Estimular a microflora pelo fornecimento de substrato.	Melaço, cana de açúcar, açúcar, fontes de amido ou pectina.
	Enzimas	Aumentar a disponibilidade de substratos a partir de componentes não fermentescíveis.	Enzimas celulolíticas e amilolíticas. Xilanases, hemicelulases e pectinases.
	Culturas microbianas	Estabelecer a dominância de bactérias ácido-láticas eficientes.	Lactobacillus, Pediococcus, Propionibacterium, Enterococcus
Antimicrobianos específicos	Antibióticos	Desencorajar o crescimento de microrganismos espoliadores.	Bacitracina, Estreptomina.
	Antibióticos sintéticos		Bronopol.
	Outros agentes Antimicrobianos		Natamicina.
Nutrientes ¹	Energia	Melhorar o valor nutricional da silagem.	Amido, cereais, farelos e subprodutos agrícolas.
	Nitrogênio e minerais		Ureia, carbonato de cálcio.

¹Alguns aditivos nutrientes também podem ser classificados como estimulantes da fermentação.

Fonte: Adaptado de Woolford (1984).

A correta aplicação das técnicas de ensilagem resulta em um adequado processo fermentativo com manutenção do valor nutritivo da massa ensilada até o fornecimento aos animais, tornando-se uma prática eficiente e rentável. Porém, possíveis falhas durante o processo de produção e fermentação da silagem podem comprometer a qualidade desse alimento e elevar as perdas fermentativas. Da mesma forma, as perdas na fase posterior a abertura do silo podem ser elevadas e os produtos secundários decorrentes da degradação aeróbia interferem na manutenção da qualidade da silagem. Nesse aspecto, tecnologias

microbiológicas, como os aditivos microbianos específicos para silagens, são desenvolvidas em laboratório e aplicados a campo como forma de reduzir as perdas fermentativas e proporcionar silagens de elevada qualidade (Junges, 2012). Na ensilagem do milho, o uso de aditivos tem como objetivo garantir que bactérias lácticas dominem a fermentação, resultando em uma silagem bem conservada (McDonald et al., 1991).

Em síntese o uso de enzimas durante a confecção de ensilagens permite principalmente, quando o substrato para a fermentação é limitado, promover maior teor de açúcares, melhorar o processo de fermentação, resultar em silagens de menor pH e maior teor de ácido láctico. Caso a adição de enzimas promova a hidrólise de porções consideráveis de parede celular, espera-se também a redução do teor de fibra resultando em maior digestibilidade e desempenho dos animais alimentados (Sousa et al., 2011).

2.3.1 – Aditivos microbianos

Os inoculantes microbianos, basicamente, dividem-se em dois grupos principais de microrganismos: as bactérias homofermentativas (ou heterofermentativas facultativas), e as bactérias heterofermentativas. O primeiro grupo representa microrganismos capazes de aumentar a produção de ácido láctico, taxa de fermentação mais rápida, reduzir proteólise, reduzir os teores de ácido acético, butírico, etanol e acelerar a queda no pH das silagens. As principais bactérias homoláticas utilizadas em silagens são *L. plantarum*, *Pediococcus spp.* e *L. acidophilus*. O segundo grupo representa microrganismos capazes de produzir outros ácidos além do láctico, com foco em alcançar melhor a estabilidade das silagens expostas ao ar, são eficazes no controle de fungos e demais microrganismos deterioradores em meio de baixo pH (McDonald et al., 1991; Zopollatto et al., 2009; Junges, 2012; Schmidt et al., 2014). Estes inoculantes são produtos seguros, fáceis de serem manuseados, não corrosivos e não poluentes, sendo considerados produtos naturais (Filya et al., 2000).

Aditivos inoculantes apresentam em sua formulação uma associação de bactérias lácticas e enzimas derivadas de subprodutos microbianos. Microrganismos como os dos gêneros *Bacillus* e *Aspergillus* produzem celulases, hemicelulases, amilases, glicoamilases e proteases que podem promover a digestão de carboidratos estruturais e não estruturais como no caso do amido, produzindo açúcares solúveis utilizados como substrato para a fermentação láctica (Patrizi et al., 2004).

A adição de culturas microbianas tem como objetivo atingir quantidades suficientes de bactérias homo fermentativas o mais rápido possível, para reduzir o tempo em que

quantidades suficientes de ácido láctico sejam produzidas e a silagem se estabilize. (Watson; Nash, 1960).

O uso de BAL como inoculantes tem sido o principal objetivo das pesquisas de aditivos para silagens de milho. A inoculação com BAL homofermentativas, teoricamente, resulta em um processo fermentativo mais eficiente, com menor perda de MS, superior teor de ácido láctico e menores teores dos ácidos acéticos, propiônico e butírico. Como esses ácidos possuem maior efeito antifúngico em relação ao ácido láctico, essas silagens tendem a apresentar menor estabilidade aeróbia. A bactéria homolática (heterofermentativa facultativa) mais estudada na ensilagem de milho é o *Lactobacillus plantarum*, seja como inoculante único ou combinado com BAL homo ou heterofermentativas (Schmidt et al., 2014).

A BAL heterofermentativa mais avaliada em pesquisas nos últimos anos foi o *Lactobacillus buchneri*, com foco principal em elevar a estabilidade aeróbia das silagens, pois produz ácido acético que é um agente antifúngico (Danner, 2002). A estabilidade aeróbica é o tempo após abertura do silo em que a temperatura da silagem permanece até no máximo 2°C acima da temperatura ambiente (Kung Jr. et al., 1998). A perda da estabilidade aeróbica reflete a presença de microrganismos oportunistas, como as leveduras *Sacharomyces*, *Candidas*, *Cryptococcus* e *Pichia*, assimiladoras de ácido láctico, e, em menor grau, fungos e bactérias assimiladoras de ácido acético e láctico. Esses microrganismos consomem tanto os ácidos orgânicos produzidos durante o período fermentativo quanto os açúcares remanescentes, provocam a deterioração e diminuição do valor nutritivo da silagem (Woolford, 1990).

Schmidt et al. (2014) encontraram durante uma revisão que dentre os 15 artigos analisados a estabilidade aeróbia de silagens de milho inoculadas com *Lactobacillus buchneri*, 13 obtiveram efeitos positivos para esta variável, que é decorrente da maior concentração de ácido acético, e menor contagem de leveduras nas silagens. Em apenas um de 12 artigos, este aditivo melhorou substancialmente a qualidade das silagens (Huisden et al., 2009), e, em apenas um de 10, obteve redução da perda de MS (Reich & Kung Jr., 2010). Dois trabalhos avaliaram o desempenho de animais, e um apresentou resultados positivos em consumo de MS e ganho de peso em cordeiros (Nkosi et al., 2009). Driehuis et al. (1999) concluíram que a adição de inoculantes contendo *Lactobacillus buchneri* eleva a estabilidade aeróbia de silagens de milho por meio da redução do crescimento e sobrevivência de leveduras.

Kristensen et al. (2010) pesquisaram em um experimento de campo em 39 fazendas e demonstraram que inoculantes de BAL heterofermentativas melhoraram a estabilidade aeróbica e modificam o padrão de fermentação das silagens de milho, enquanto a adição de BAL

homofermentativas não foram consideradas interessantes para essas silagens, pois não pareceram superar a flora epifítica da planta, ou alterarem a fermentação. No entanto, os tratamentos não afetaram a produção de leite, e mesmo as silagens mais estáveis obtiveram produções similares às silagens homofermentadas menos estáveis.

Nsereko et al. (2008) mostraram que algumas bactérias heteroláticas (*Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis*) produzem também ferulato-esterases, enzimas que podem aumentar a degradação da parede celular, liberando mais carboidratos solúveis para a fermentação ou utilização pelas bactérias do rúmen, e de acordo com Moon (1983), a maior vantagem da utilização da *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus buchneri* em silagens, está no pós-abertura dos silos, quando a ação do acetato é considerado eficiente no controle indesejável de leveduras e fungos filamentosos. Driehuis et al. (1999), constataram que os números de leveduras diminuíram em silagens de milho tratadas com bactérias heteroláticas (*Lactobacillus buchneri*) com o aumento do tempo de armazenamento.

A elevação da solubilização da celulose nas silagens de milho favorece diretamente a maior preservação dos nutrientes e ocorre influência na produção de ácidos orgânicos das silagens. Isso indica que a utilização de aditivos microbianos em silagens ricas em grãos e que possuem altos teores de carboidratos solúveis é justificável, por assegurar a maior preservação da massa ensilada por meio da solubilização tardia de alguns substratos, que estão diretamente relacionados às adequadas manutenções do meio (por exemplo, pH) e dos microrganismos desejáveis (Kung Jr., 2001).

2.3.2 – Enzimas

Enzimas são catalisadores biológicos, sendo, em sua maioria, polímeros constituídos por aminoácidos ligados por ligações peptídicas covalentes. Os catalisadores atuam diminuindo a energia requerida para a ativação de uma determinada reação, tornando, assim, mais rápida a obtenção do produto. As reações não catalisadas requerem mais energia para serem iniciadas e, por isso, sua velocidade é menor que as reações catalisadas (Leningher, 2006).

Desde que os primeiros isolamentos e utilização de enzimas foram realizados, a tecnologia para identificar, extrair e produzir em escala comercial tem progredido dramaticamente e atualmente são utilizados nos mais diversos processos químicos. Elas provaram serem melhores, menos dispendiosas e prejudiciais ao meio ambiente que produtos químicos. Enzimas microbianas também têm sido utilizadas na indústria de detergentes,

alimentos, bebidas, ração animal, indústria têxtil, papel e celulose, couro, produtos químicos e biomédicos, além da biorremediação de resíduos. Assim sendo, a produção enzimática tornou-se, hoje, um negócio amplamente rentável, com rendimento anual de bilhões de dólares (Daniel et al., 2010; Pereira, 2012).

Os aditivos podem conter apenas uma enzima como um complexo ou uma combinação de complexos de enzimas, além da combinação de enzimas e inoculantes microbianos. As enzimas que degradam fibra (celulases e hemicelulases) são os aditivos enzimáticos mais comuns e as variedades de enzimas que digerem fibra e amido são utilizadas atualmente como aditivos para ensilagem de forrageiras (White et al., 1993).

A forma mais racional do uso de enzimas está na melhoria do valor nutritivo dos alimentos. Todos os animais utilizam enzimas no processo de digestão, que podem ser produzidas pelo próprio animal, pelos microrganismos presentes no trato digestório, ou mesmo por fontes exógenas. O uso de fontes exógenas tem como objetivo: degradar fatores anti-nutricionais dos alimentos, melhorar digestão de alimentos por animais jovens, com trato digestório imaturo ou com produção endógena insuficiente, elevar a disponibilidade de nutrientes dos alimentos consequentemente aumentando o desempenho dos animais. Pode-se também associar os efeitos benéficos no processo digestivo à menor excreção de nutrientes provenientes da criação de animais e reduzir a poluição ambiental relacionada à criação de animais e promover a produção de alimentos mais seguros (Sousa et al., 2011).

A utilização de enzimas para ruminantes se dividiu em duas vertentes. A primeira, do uso de enzimas para aumentar a capacidade de digestão dos carboidratos presentes na parede celular dos alimentos, sendo adicionada diretamente a dieta. E a segunda utilização, tecnologia em grande crescimento, o uso de enzimas na ensilagem de forrageiras. Enzimas fibrolíticas exógenas que degradam a parede celular de plantas têm sido adicionadas a forragens no momento da ensilagem para potencializar a degradação dos polissacarídeos fibrosos (celulose e hemicelulose) da parede e disponibilizar açúcares juntamente com as enzimas produzidas pelos microrganismos do rúmen, estimulando a digestão total e a taxa de degradação (Sheperd; Kung Junior, 1994; Newbold, 1997).

Em alguns estudos, observou-se que as enzimas fibrolíticas aumentaram a degradabilidade da MS e FDN, a produção de leite e o ganho de peso em bovinos, podem alterar a utilização dos alimentos pelos ruminantes por meio de efeito direto sobre a fibra ou pelo aumento da digestão ruminal e/ou pós-ruminal, ocorrendo sinergismo com os microrganismos do rúmen (Beauchemin et al., 1995; Feng et al., 1996; Schingoethe et al., 1999; Hristov et al., 2000). De fato, estas formas de ação estariam interligadas, de modo que

as alterações mediadas pelas enzimas antes do consumo refletiriam nas digestões ruminal e pós-ruminal dos nutrientes (McAllister et al., 2001).

Dentre as enzimas mais utilizadas na ensilagem de milho destaca-se as amilases, devido às altas concentrações de amido no grão, sendo que estas enzimas são responsáveis pela conversão do amido em glicose; e celulases que hidrolisam a celulose que é o componente mais importante da parede celular das plantas (Lin et al., 1997; Gupta et al., 2003; Moraes, 2004; Guo et al., 2008).

No caso das celulases, três enzimas fazem parte desse grupo, elas recebem os nomes de endoglucanases, exoglucanases e beta-glicosidases. As endoglucanases agem na região interna da fibra de celulose e liberam compostos menores formados por poucas unidades de glicose, os chamados oligossacarídeos. As exoglucanases agem nas extremidades das fibras de celulose e liberam unidades de glicose (livres) ou celobiose, que são compostos menores, formados por duas unidades de glicose. As beta-glicosidases quebram a ligação química existente entre as duas unidades de glicose que formam a celobiose, liberando unidades de glicose (livres) (Zanchetta, 2010).

Devido às silagens de grão de milho apresentam alta quantidade de ácido láctico, o que as tornam mais susceptíveis a deterioração após a abertura (Bernardes et al., 2012). A adição de amilase reduz a temperatura média das silagens ao longo do dia, indicando melhor perfil de fermentação do milho, disponibilizando maior quantidade de carboidratos solúveis para as bactérias do ácido láctico (Rotz; Muck, 1994). Gimenes et al., (2006) afirmaram que silagens de milho inoculadas com bactérias homoláticas e enzimas apresentaram maior estabilidade aeróbia quando comparada as silagens não inoculadas.

O uso de inoculantes no momento da ensilagem pode aumentar a estabilidade aeróbia durante o fornecimento ao animal no cocho (Mendes et al., 2008). Justificando assim sua aplicação como uma alternativa para a preservação do material quando exposto ao ar, pois confere vantagens aos produtores sendo que o fornecimento de silagem deteriorada pode resultar em redução no consumo de MS e redução do desempenho do animal (Dolce et al., 2011).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nas dependências do setor de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados - FCA/UFGD, latitude de 22°14'S, longitude de 54°49'W e altitude de 450 m, no período de Junho a Outubro de 2016.

Para a produção das silagens, utilizou-se o milho híbrido DKB 353 proveniente da fazenda experimental da UFGD, colhido mecanicamente aos 110 dias após o plantio, quando os grãos se apresentavam no estágio farináceo. As plantas foram trituradas em picadora estacionária, com o tamanho de partículas de 10 mm.

O delineamento experimental utilizado era em um arranjo fatorial 2x2 com 4 tratamentos, com 10 silos por tratamento, onde os tratamentos foram: 1- Controle (silagem de milho sem adição de enzimas); 2- AMG (adição de 300 mL/t de enzima amilolítica); 3- Celluloclast (adição de 300 mL/t de enzima celulolítica); 4- AMG+ Celluloclast (150mL/t de enzima amilolítica e 150 mL/t enzima celulolítica). As matérias ensiladas foram inoculadas com **KERASIL** (*Lactobacillus plantarum*: 4×10^{10} ufc/g + *Pediococcus acidilactici*: 4×10^{10} ufc/g) na proporção de 4g/t.

Após a aplicação dos inoculantes e/ou aditivos, a forragem foi amostrada três vezes para cada tratamento. Cada amostra foi fragmentada em duas subamostras: a primeira foi utilizada para determinação da capacidade tampão, segundo metodologia descrita por Playne & McDonald (1966), e do pH, segundo Silva & Queiroz (2002); e a outra pesada e levada para estufa de ventilação forçada a 55°C durante 72 horas. Obteve-se uma amostra do material antes de ser ensilado que foi enviado para o isolamento de bolores e levedura, bem como contagem bacteriana total (CBT).

Os silos experimentais usados eram compostos de baldes de polietileno de 40 cm de altura e 30 cm de diâmetro, com tampas com válvulas de *Bunsen* para permitir o escape dos gases. No fundo dos silos, foi colocado areia seca (2kg) separada da forragem por uma tela e um tecido de náilon para quantificação do efluente produzido.

A compactação do material picado foi realizada com bastões de ferro objetivando atingir densidade de 650 kg/m³ de forragem no volume de cada silo experimental. Para calcular o espaço ocupado pela areia, descontou e pesou a quantidade de forragem necessária para obtenção da densidade desejada. Após a compactação da forragem, os silos foram fechados com a tampa, vedados com fita adesiva, pesados e armazenados em temperatura ambiente.

Aos 60 dias de fermentação, os baldes foram pesados para determinação das perdas por gases e em seguida os mesmos foram abertos. Após a abertura, realizou-se a retirada da silagem e em seguida a homogeneização. Retiraram, duas amostras de cada silo, uma delas foi

preparada segundo metodologia descrita por Kung Jr. et al., (1984) para determinação do pH em potenciômetro (Silva & Queiroz, 2002) e da outra amostra utilizou-se 10 gramas de cada amostra para 90 mL de solução salina esterilizada para a diluição seriada de 10^{-1} até 10^{-6} em tubos de ensaio. A quantificação dos microrganismos foi feita em triplicatas para cada diluição e meio de cultura, sendo utilizado o Ágar MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) para contagem de bactérias lácticas, o Ágar Nutriente para contagem total de bactérias aeróbicas e anaeróbicas, estas com incubação a 37 °C por 48 horas; para contagem de bolores e leveduras o Ágar PDA (Potato dextrose Ágar) com incubação a 26 °C por 120 horas. Para a atividade das enzimas, mensurou-se de acordo com metodologia descrita por Dick et al., (1996).

O conjunto silo (sem silagem), areia, tela e tecido de náilon foram pesados para quantificação do efluente produzido. Determinou-se a perda gasosa por meio da seguinte fórmula:

$$PG = (PSI - PSF) / MSI \times 100$$

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

A determinação da produção de efluente foi calculada pela equação:

$$PE = (PSAF - PSAI) / MNI \times 1000$$

Em que: PE = produção de efluente (kg de efluente/t de matéria verde ensilada); PSAF = peso do conjunto silo, areia, tela e náilon após a abertura (kg); PSAI = peso do conjunto silo, areia, tela e náilon antes da ensilagem (kg); e MNI = quantidade de forragem ensilada (kg).

Recuperação de MS pela fórmula:

$$MS: (MSi / MSf) * 100$$

Em que: MSf = quantidade de MS final; MSi = quantidade de MS inicial.

Na variação dos teores de MS, calculou-se como a diferença em módulo da porcentagem de MS no momento da ensilagem e da porcentagem de MS na abertura.

Após a abertura dos silos e homogeneização, uma amostra de cada silo foi colocada em baldes plásticos, pesadas e armazenadas em temperatura ambiente para avaliação da estabilidade aeróbia, e em seguida mensurados diariamente a temperatura do ar (°C) e a umidade relativa (%).

As temperaturas das silagens no período após abertura foram obtidas a cada 8 horas durante cinco dias por meio de um termômetro inserido na massa de silagem contida nos baldes. Já na estabilidade aeróbia, calculou-se o tempo gasto, em horas, para a massa de

ferragem elevar em 2°C em relação à temperatura do ambiente (Driehuis et al., 2001). Decorridos cinco dias de exposição aeróbia, os baldes com as amostras foram pesados novamente para determinação da MS recuperada. No período de estabilidade aeróbia as silagens foram amostradas diariamente para determinação do pH, MS, PB e FDN.

Uma amostra foi pesada e mantida em estufa de ventilação forçada a 55°C durante 72 horas. As amostras mantidas em estufa colhidas antes da ensilagem e após a abertura dos silos, novamente, pesadas, trituradas em moinho de faca até obtenção de partículas com 1 mm e armazenadas em potes de plástico para posterior determinação da MS, MO, MM (matéria mineral), PB, conforme metodologia descrita por Silva & Queiroz (2002) e FDN, FDA e Lignina por metodologia descrita por Van Soest et al. (1991). Uma amostra de cada tratamento foi destinada a análise a digestibilidade *in vitro* da MS, MO e FDN, de acordo metodologia de (Holden, 1999).

Para análise dos dados utilizou-se à análise de variância usando o PROC MIXED do programa SAS, versão 9.0 (SAS, 2009) adotando-se nível de significância de 5%.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A população microbiana encontrada nos tratamentos experimentais encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 - População microbiana de acordo com os tratamentos experimentais

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	Valor de P ³		
	CON	GLU	CEL	GLU+CEL		GLU	CEL	INT
	<i>Bactérias log₁₀</i>							
Láticas	7,23 ^{ab}	6,60 ^b	7,41 ^{ab}	8,26 ^a	0,02	0,001	0,432	0,003
Anaeróbicas	5,45	5,15	8,00	7,28	0,02	0,002	0,002	0,422
Aeróbicas	7,72 ^a	4,00 ^c	6,82 ^{ab}	5,00 ^b	0,01	0,001	0,434	0,021
Totais	7,84	6,62	7,75	8,45	0,02	0,001	0,111	0,116
	<i>Log₁₀</i>							
Fungos e mofos	5,26	4,80	6,08	6,08	0,03	0,001	0,881	0,431

¹CON (controle); GLU exo-1,4- α -glicosidase glucoamilase (AMG 300L®), atividade enzimática 300 U/mL; CEL β -D-glucan 4-glucano-hidrolase (Celluclast® 1.5L atividade enzimática 700 U/mL). ²EPM (erro padrão da média). ³Efeito de amilglicosidase (GLU), efeito de celulase (CEL). Efeito de interação amilglicosidase*celulase.

A população microbiana láctica foi influenciada (P<0,05) pela interação das enzimas, apresentando maior contagem microbiana. Na avaliação de bactérias ácido lácticas foi observado menor contagem para o tratamento GLU comparativamente ao GLU+CEL, porém,

não foi observado diferenças para os tratamentos CEL e CON. A população microbiana anaeróbica foi influenciada ($P < 0,05$) pelo tratamento CEL, onde as silagens acrescidas de GLU apresentaram menor contagem de bactérias anaeróbicas e as acrescidas de CEL apresentaram maior contagem. O tratamento CON teve efeito sobre a população aeróbica ($P < 0,05$) aumentando o número da população. Na contagem de bactérias aeróbicas foi observado maior contagem para o tratamento CON, em relação aos tratamentos GLU e GLU+CEL, entretanto não houve diferença em relação ao CEL. Foi observado efeito da enzima amilolítica ($P < 0,05$) para a contagem de fungos e mofos, onde o tratamento GLU apresentou menor contagem.

Para obtenção de silagem de boa qualidade deve-se ter a rápida queda do pH do material estocado. Tal evento requer ambiente anaeróbico, população suficiente de bactérias produtoras de ácido lático e nível adequado de substrato na forma de carboidratos solúveis (Leibensperger; Pitt, 1987; Muck, 1988; McDonald et al., 1991). Neste processo, os ácidos produzidos pela fermentação de substratos presentes na planta reduzem o pH da massa ensilada, inibindo a ação de enzimas e de microrganismos capazes de promover a sua deterioração (Tomich et al., 2003).

Os microrganismos responsáveis pela produção destes ácidos são as bactérias homofermentativas, que produzem apenas ácido lático, e as heterofermentativas, que apresentam, além do ácido lático, o etanol, ou o ácido acético, adicionados ao CO_2 . As BAL são aerotolerantes e têm o crescimento estimulado em anaerobiose, produzindo grande quantidade de ácido, quando esta condição é estabelecida no interior do silo, conseqüentemente, a produção de ácido lático é maximizada quando a fermentação é dominada pelas bactérias lácticas homofermentativas, fato que pode determinar uma variação no número requerido de bactérias lácticas sobre a forragem para a promoção de uma fermentação eficiente. (Edwards; McDonald, 1978; McDonald et al., 1991; Tomich et al., 2003).

Pode-se constatar que o tratamento GLU+CEL apresenta uma população microbiana melhor comparada com os outros tratamentos ao apresentar um número maior de bactéria produtoras de ácido lático e menor de aeróbicas respectivamente, de modo a obter uma forragem conservada de boa qualidade.

A atividade enzimática dos tratamentos experimentais encontra-se na Figura 1.

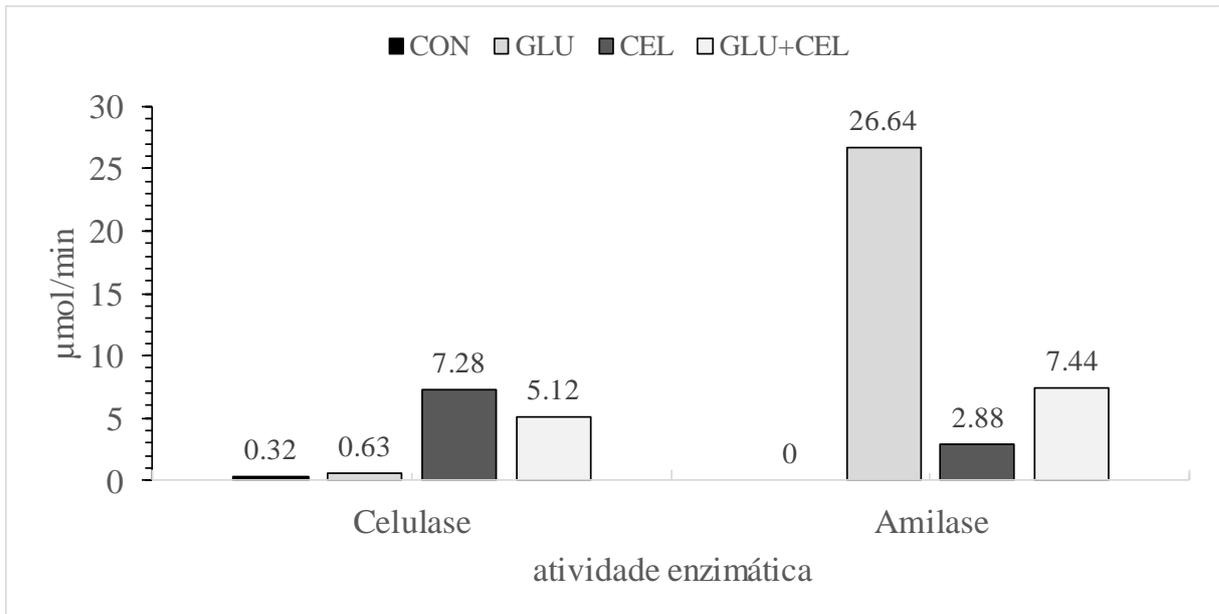


Figura 1 - Atividade enzimática de acordo com os tratamentos experimentais aos 100 dias de abertura dos silos.

Em relação à atividade enzimática para celulose foi observado maior atividade para o tratamento CEL, seguido do tratamento GLU+CEL. Para a atividade enzimática da amilase foi observado maior atividade para o tratamento GLU, seguido do tratamento GLU+CEL. Os resultados obtidos para as atividades enzimáticas já eram esperados no que se refere aos os tratamentos, porém a atividade encontrada tanto para a enzima Celluclast (CEL) e AMG 300L (GLU) aos 100 dias de fermentação mostra um promissor caminho para a utilização das mesmas na confecção de silagem.

Os resultados encontrados são justificados devido à alta especificidade de atuação das enzimas. O tratamento que foi utilizado Celluclast 1,5L que é um preparado líquido de celulose produzido por fermentação submersa de cepas selecionadas do fungo *Trichoderma reeseri* tem enzima que catalisa a degradação de celulose em glicose, celobiose e polímeros com alto teor de glicose (Santos & Ferrari, 2005) por isso, obteve maior atividade enzimática para celulose, porém, o tratamento acrescido da enzima AMG 300L apesar de ter apresentado grande atividade enzimática para amilase pode ser explicado devido à falta de substrato pois na Tabela 2 apresenta pouca população microbiana láctica e a atividade enzimática inicial de GLU era de 300 U/mL já a de CEL era de 700 U/mL. Devido ao tratamento AMG+CEL apresentar as duas enzimas (celulolítica e amilolítica) é justificado, os tratamentos AMG+CEL apresentar valores elevados quanto a atividade enzimática para celulose e amilase.

As perdas fermentativas e a temperatura durante a estabilidade aeróbia encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Perdas fermentativas e estabilidade aeróbia de acordo com os tratamentos experimentais

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	Valor de P ³		
	CON	GLU	CEL	GLU+CEL		GLU	CEL	INT
Perdas								
Gases (%MN)	1,20	1,74	3,94	2,36	0,29	0,296	0,089	0,101
Efluente (kg/t)	11,55	14,31	23,86	20,97	1,16	0,969	0,035	0,192
Gases (%MS)	9,75 ^b	16,98 ^a	16,51 ^a	14,80 ^{ab}	0,61	0,085	0,117	0,035
Efluente (%MS)	1,06	1,22	2,18	1,87	0,11	0,638	0,038	0,223
Totais (%MS)	10,75 ^b	18,29 ^a	18,70 ^a	16,67 ^a	0,65	0,087	0,068	0,031
Recuperação (%MS)	91,30 ^a	86,91 ^{ab}	84,51 ^b	87,25 ^{ab}	0,52	0,047	0,377	0,039
Estabilidade aeróbia								
Temperatura (°C)								
Soma	673,75	666,75	665,75	683,95	2,30	0,101	0,410	0,224
Máxima	32,00	32,60	30,75	31,91	0,25	0,432	0,326	0,157
Estabilidade	28,90	31,10	28,60	29,10	3,51	0,321	0,741	0,321
Horas								
Estabilidade	95	105	112	108	0,35	0,654	0,765	0,321

¹CON (controle); GLU exo-1,4- α -glicosidase glucoamilase (AMG 300L®), atividade enzimática 300 U/mL); CEL β -D-glucan 4-glucano-hidrolase (Celluclast® 1.5L atividade enzimática 700 U/mL). ²EPM (erro padrão da média). ³Efeito de amiloglicosidase (GLU), efeito de celulase (CEL). Efeito de interação amiloglicosidase*celulase.

O tratamento CEL influenciou ($P < 0,05$) as perdas fermentativas onde as silagens de milho acrescidas de CEL apresentaram maior perda por efluente (kg/t e %MS) em relação aos demais tratamentos. Oliveira et al. (2010) verificaram, para silagens de milho colhidas no momento ideal, perdas por efluente acima de 20 kg/t de MV, com 60 dias de fermentação, valor superior ao verificado neste ensaio nos tratamentos CON e GLU (11,55 kg/t e 14,31 kg/t respectivamente) no mesmo período. Não foram influenciadas ($P > 0,05$) as silagens acrescidas de enzimas CEL e GLU que apresentaram maiores perdas por gases (%MS) em relação ao CON, entretanto o tratamento GLU+CEL não apresentou diferença em relação ao Controle. Oliveira et al., (2010) obtiveram valor de 2,2 %MS em silagem de milho, valor superior foi encontrado em todos os tratamentos. Quanto as perdas por gases (%MN) as silagens acrescidas de CEL e GLU+CEL obtiveram as maiores perdas em relação ao controle. Segundo McDonald et al. (1991), o aumento significativo nas perdas por gases ocorre quando há produção de álcool (etanol ou mantinol) por fermentação por bactérias heterofermentativas, enterobactérias, leveduras e bactérias no gênero *Clostridium* ssp.

A silagem do tratamento CON apresentou menor perda total (%MS) em relação aos demais e maior recuperação (%MS) em relação ao tratamento CEL, entretanto não foi

observado diferenças em relação aos tratamentos GLU e GLU+CEL. Segundo Pedroso et al. (2005), a recuperação da MS tem alta correlação com a perda por gases (98,4%), quanto menor a perda por gases maior é a recuperação de MS. As maiores perdas observadas pelos materiais acrescidos de enzimas celulolíticas ou amilolíticas já eram esperadas visto que o consumo de substrato do material ensilado pela ação enzimática, em que as condições de pH, temperatura e umidade dos silos são compatíveis com meio adequado de ação das enzimas utilizadas neste ensaio. Castle & Watson (1973) mostraram a importância do teor de MS da forragem na quantidade de efluente, relataram a inexistência da produção de efluente em silagens de alfafa, azevém e centeio quando os teores de matéria seca dessas silagens foram superiores a 23%.

Todos os tratamentos foram inoculados com **KERASIL** (*Lactobacillus plantarum* + 4×10^{10} UFC/g *Pediococcus acidilactici*: 4×10^{10} UFC/g). Nos materiais do tratamento CON somente foram acrescidos inoculante microbiano, provavelmente esta seria a explicação para a menor perda de MS em relação aos demais. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos para os parâmetros de estabilidade aeróbica apresentados na Tabela 3. Esses resultados estão intimamente relacionados com a inoculação de **KERASIL** em todos os tratamentos experimentais.

A recuperação de MS durante a estabilidade aeróbia de acordo com os tratamentos encontra-se na Figura 2.

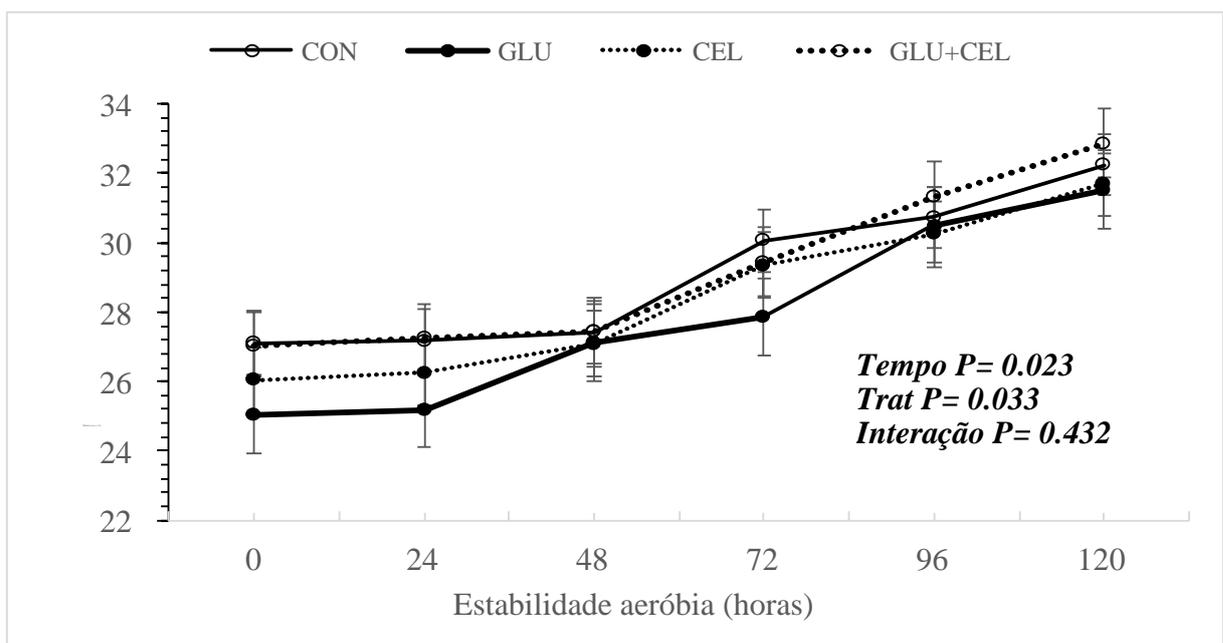


Figura 2 - Teores de matéria seca ao longo do período de estabilidade aeróbia de acordo com os tratamentos experimentais.

Foi observado maior estabilidade para os tratamentos GLU e CEL em relação aos demais. De modo geral à adição de enzimas na silagem de milho proporcionou maior estabilidade em relação ao tratamento CON. Porém silagens de boa qualidade tendem a ter menor estabilidade pois tem mais microrganismos produzindo ácido lático. Siqueira et al. (2007) afirmaram que a elevação dos teores de MS durante a exposição aeróbia é resultado da perda de água para o ambiente e consequente evaporação. No entanto, com o aumento do tempo de exposição ao ar, ocorre oxidação dos nutrientes solúveis ou consumo dos ácidos graxos voláteis por microrganismos deterioradores e, assim, forma-se a chamada “água de metabolismo” (Woolford, 1984). Este fato pode ocasionar novamente redução dos teores de MS.

Os valores de pH no período de estabilidade aeróbica de acordo com os tratamentos encontram-se na Figura 3.

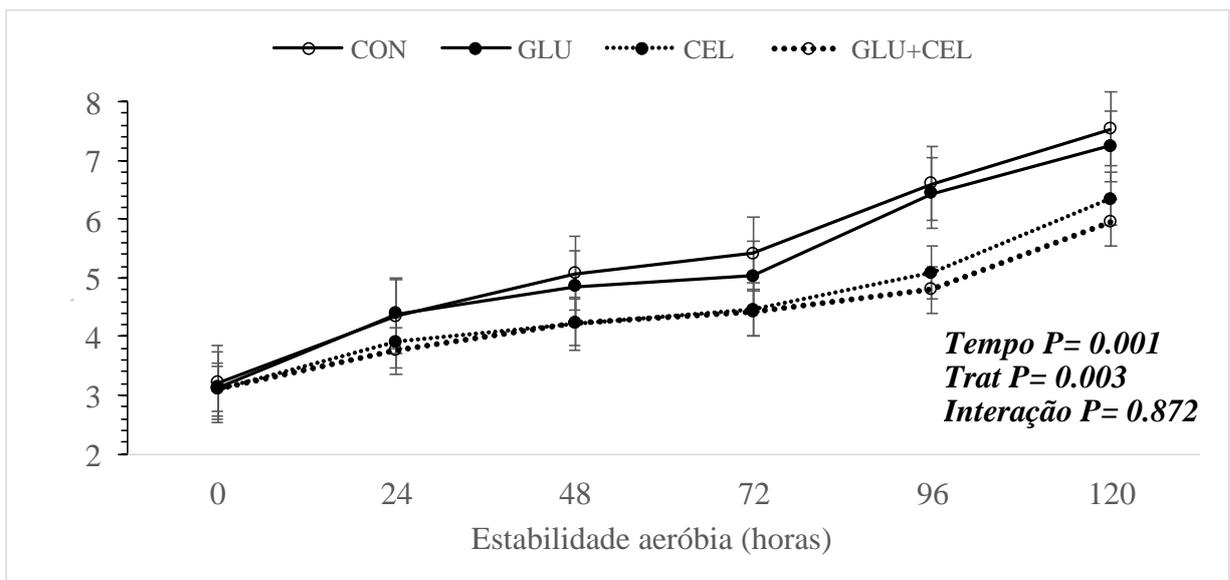


Figura 3 - Valores de pH ao longo do período de estabilidade aeróbica de acordo com os tratamentos experimentais.

Em relação ao pH foi observado maior estabilidade para os tratamentos CEL e GLU+CEL em relação aos demais, isto é, dentro da faixa de pH considerada ideal (3,8 a 4,2) para o adequado processo fermentativo em silagem de milho (Kung Jr & Shaver, 2001). A adição da enzima Celluclast parece ter proporcionado melhores condições de manutenção do pH devidos as particularidades da ação da enzima como temperatura, pH e umidade. Apesar do tratamento GLU+CEL ser mais instável como demonstrado na Figura 2, o pH do mesmo tratamento foi o menor podendo este resultado ser explicado por interação das enzimas.

Quando chegou a 120 horas de exposição aeróbia, os valores de pH aumentaram, de modo a atingirem o pico. Esses resultados estão ligados à atuação das leveduras e fungos filamentosos, que utilizam ácido láctico para se propagar aerobiamente, elevando o pH da silagem e potencializando o crescimento de outros microrganismos indesejáveis, quando o pH se encontra acima de 4,5 (Reis et al., 2008; Muck, 2010).

Embora seja observado acréscimo nos valores de pH em todas as silagens, verificou-se que a silagem com adição de enzima amilolítica e celulolítica na concentração de 150 mL/t para cada uma, apresentou o menor valor a 120 horas em aerobiose, se comparada à silagem controle, o que está associado a menor ocorrência de micro-organismos deterioradores nessa silagem melhorando a estabilidade aeróbia da silagem de milho, de forma a manter os valores de pH mais estáveis na fase de pós abertura dos silos.

Em uma situação prática, esses resultados permitem concluir que as silagens que apresentaram maior estabilidade, mantêm por maior tempo as características nutritivas e sanitárias observadas no momento da abertura (Basso et al., 2012). Contudo, é importante ressaltar que não é adequado manter o silo exposto ao oxigênio durante tanto tempo, visto que, mesmo sem alteração do pH, a produção de microtoxinas por fungos pode ser alta (Driehuis, 2011), comprometendo a saúde dos animais que consumirem esta silagem.

Os dados referentes ao valor nutricional das silagens de milho de acordo com os tratamentos experimentais encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Valor nutricional de acordo com os tratamentos experimentais

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	Valor de P ³		
	CON	GLU	CEL	GLU+CEL		GLU	CEL	INT
Matéria seca (%MN)	28,53 ^a	26,41 ^b	27,16 ^b	27,26 ^b	0,16	0,001	0,267	0,001
Matéria orgânica	94,63	94,57	94,05	94,00	0,05	0,303	0,231	0,909
Proteína bruta	8,13	8,39	8,82	8,67	0,09	0,727	0,007	0,245
Extrato etéreo	2,49	2,38	2,58	2,42	0,04	0,121	0,434	0,774
FDN	57,56 ^b	58,88 ^{ab}	59,98 ^a	58,22 ^{ab}	0,29	0,681	0,111	0,007
CNF	26,44 ^a	24,90 ^{ab}	22,67 ^b	24,66 ^{ab}	0,36	0,705	0,002	0,002
Amido	20,67	25,17	22,76	22,07	0,31	0,003	0,021	0,761
FDA	43,67	45,65	37,94	41,95	0,53	0,001	0,001	0,531
Lignina	6,44	6,74	6,87	6,25	0,14	0,547	0,388	0,839
Cinzas	5,36	5,42	5,94	5,99	0,05	0,303	0,410	0,909
NDT	64,31 ^b	65,37 ^{ab}	67,61 ^a	65,64 ^{ab}	0,35	0,474	0,020	0,007
EL _L	1,48 ^b	1,52 ^{ab}	1,57 ^a	1,51 ^{ab}	1,01	0,432	0,001	0,006
	Digestibilidade <i>in vitro</i>							
MS	48,72	50,25	56,54	55,56	0,87	0,849	0,001	0,654
FDN	46,78	49,67	51,09	50,67	0,76	0,543	0,001	0,653

¹CON (controle); GLU exo-1,4- α -glicosidase glucoamilase (AMG 300L®), atividade enzimática 300 U/mL); CEL β -D-glucan 4-glucano-hidrolase (Celluclast® 1.5L atividade enzimática 700 U/mL). ²EPM (erro padrão da média).³Efeito de amiloglicosidase (GLU), efeito de celulase (CEL). Efeito de interação amiloglicosidase*celulase.

A silagem CON apresentou maior conteúdo de MS em relação aos demais tratamentos. O teor médio de MS foi menor que os observados por Ítavo et al. (2006) e Jobim et al. (2008), 64,3 e 64,03%, respectivamente. Kung Jr et al. (2007) não observaram efeito da utilização de inoculante sobre o teor de MS (73,3%) da silagem, número superior ao teor das silagens do presente estudo, descrito em 28,53% máximo. De acordo com Loures (2004) o resultado do aumento no teor de MS é devido a maior lixiviação de efluentes, provocando aumento das concentrações dos componentes.

Não foi observado diferenças entre os tratamentos para os teores de extrato etéreo, MO, lignina e cinzas. Foi observado efeito da adição de CEL para o teor de proteína dos materiais ensilado, sendo encontrado maior teor para o tratamento CEL (8,82) e menor para o tratamento CON (8,13). Fernandes et al. (2007) observaram diferença ($P < 0,05$) nos teores de PB, variando de 10,7 a 6,8%, respectivamente nas cultivares de milho XB 8028 e BR 610 e Reis et al. (2005), avaliaram cultivares de milho, observaram resultados de PB e identificaram diferenças de 9,7 a 6,4% de PB. A diferença no teor de proteína é devido a maior degradação das enzimas celulolítica e segundo Fernandes et al. (2007) se dá devido a maior participação de grãos na MS total da planta.

Em relação ao teor de FDN das silagens foi observado menor conteúdo para o tratamento CON comparativamente ao CEL, porém, não foi observado diferenças para os tratamentos GLU e GLU+CEL que, de acordo com Junges (2010), pode ser devido ao tempo de armazenamento das silagens de milho contribuindo na provável solubilização da hemicelulose. Para o teor de CNF foi observado maior teor para CON em relação ao CEL, não sendo observado diferenças para os tratamentos GLU e GLU+CEL. Foi observado efeito da enzima amilolítica e da enzima celulolítica para o conteúdo de FDA das silagens, sendo observado maior teor para o tratamento GLU e menor para CEL. As silagens acrescidas de GLU apresentaram maior conteúdo de amido e as acrescidas de CEL apresentaram menor teor. Segundo Balischi et al. (2002), o tratamento enzimático reduz o tamanho das macromoléculas presentes. Em relação ao conteúdo de NDT e EL_L as silagens acrescidas de CEL apresentaram maior conteúdo energético em relação ao CON, no entanto não foi observado diferenças entre os tratamentos GLU e GLU+CEL. Os valores médios estimados de NDT foram de 64,31, 65,37, 67,61 e 65,64 nos tratamentos CON, GLU, CEL e GLU+CEL

respectivamente, esses valores foram superiores aos verificados por Cappele et al. (2001), que encontraram teores de NDT para silagem de milho mínimos de 55,4 e máximo de 63,8%. Rodrigues et al. (2002), não verificaram efeito entre os teores de NDT de 65,0 e 65,1% para silagens de milho controle e aditivada com bactérias homoláticas. Os teores de NDT verificados no presente ensaio, confirmam a elevada qualidade das silagens produzidas.

Na avaliação da digestibilidade *in vitro* da MS e FDN foi observado efeito da enzima Celluclast (CEL), onde os materiais ensilados apresentaram maior valor de digestibilidade e o tratamento CON apresentou menor digestibilidade entre os materiais avaliados. As enzimas fibrolíticas estão relacionadas com sua capacidade de melhorar a degradação inicial dos carboidratos estruturais das plantas e complementar as atividades enzimáticas dos microrganismos ruminais. É provável que enzimas exógenas ajam no rúmen após a ingestão do alimento, durante um período curto antes da colonização bacteriana do alimento e início da digestão. Enzimas fibrolíticas exógenas podem complementar as atividades enzimáticas dos microrganismos no rúmen e permitir maior digestão de substratos durante as fases preliminares críticas da digestão. Os efeitos da suplementação com enzimas podem resultar da capacidade de expor os substratos degradados ao ataque microbiano (Dawson; Tricarico, 2007).

Os resultados obtidos na avaliação do valor nutricional das silagens de milho acrescidas de enzimas amilolíticas e celulolíticas, apresentaram melhor desempenho da enzima Celluclast em relação aos demais. As maiores perdas fermentativas observadas na Tabela 3 para o tratamento CEL foram superadas pelo melhor valor nutricional observado na Tabela 4, principalmente para a digestibilidade da MS e do FDN. O tratamento GLU também apresentou resultados satisfatórios principalmente em relação ao conteúdo de amido. A interação entre as duas enzimas representado pelo tratamento GLU+CEL neste primeiro momento de avaliação com abertura dos silos aos 60 dias de fermentação não proporcionou incremento nutricional em relação aos tratamentos CEL ou GLU.

5 – CONCLUSÃO

A interação entre as enzimas glucoamilase e celulose afetaram positivamente o valor nutritivo e a estabilidade aeróbia e afetaram negativamente a fermentação e as perdas de silagem de milho.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, M. [2010]. **Choosing corn hybrids for silage**. Disponível em: <<http://web1.msue.msu.edu/barrycty/factsheets/choosingcornhybridsforsilage.htm>>. Acesso em: junho 04, 2017.

ANDRADE, P. Alimentação de bovinos em épocas críticas. In: PEIXOTO, A.M. et al. **Nutrição de bovinos – Conceitos básicos e aplicados**. 5. ed. Piracicaba: FEALQ, 1995. v.7, p.239-250.

BALISCHI, L.; PEREIRA N. C.; LIMA, O. C.M. et al. Influência do tratamento enzimático sobre as características reológicas e microscópicas da polpa de acerola. **Revista Acta Scientiarum Technology**, v.24, n.6, p.1649-1658, 2002.

BASSO, F.C.; LARA, E.C.; RABELO, C.H.S. et al. Características da fermentação e estabilidade aeróbia de silagens de milho inoculadas com " Bacillus subtilis". **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.13, n.4, p.1009-1019, 2012.

BERNARDES, T.F.; NUSSIO, L.G.; AMARAL, R.C. Top spoilage losses in maize silage sealed with plastic films with different permeabilities to oxygen. **Grass and Forage Science**, v.67, n.1, p.34–42, 2012.

BOLSEN, K.K.; ASHBELL, G.; WEINBERG, Z.G. Silage fermentation and silage additives- Review. **Asian-Australian Journal of Animal Sciences**, v.9, n.5, p.483-493, 1996.

CABRAL, L.S.U.; VALADRARES FILHO, S.C.U.F.V.; DETMANN, E.U. et al. Cinética ruminal das frações de carboidratos, produção de gás, digestibilidade in vitro da matéria seca e NDT estimado da silagem de milho com diferentes proporções de grãos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.6, p.2332-2339, 2002.

CAPPELLE, E. R.; VALADARES FILHO, S. C.; SILVA, J. F. C. et al. Estimativas do valor energético a partir de características químicas e bromatológicas dos alimentos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.6, p.1837-1856, 2001.

CASTLE, M.E.; WATSON, J.N. The relationship between the M.D. content of herbage for silage making and effluent production. **Journal of the British Grassland Society**, v.28, n.3, p.135-138, 1973.

CASTRO, F.G. **Uso de pré-umurchecimento, inoculantes bacteriano-enzimático ou ácido propiônico na produção de silagens de Tifton-85 (*Cynodon sp*)**. 2002. 136p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CRUZ, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A. [2009]. **Cultivo de milho**. Disponível em: <http://www.cnpms.EMBRAPA.br/publicacoes/milho_5_ed/cultivares.htm>. Acessado em: maio 31, 2017.

CYSNEIROS, C. D. S. S., Ferreira, R. N., Oliveira, M. A. et al. Produção, caracterização e avaliação de enzimas fibrolíticas na digestibilidade da forragem de milho. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, n.4, p.426-435, 2013.

DANIEL, J.P.; ZOPOLLATO, M.; NUSSIO, L.G. Uso de enzimas fibrolíticas na nutrição de ruminantes. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM, 5, 2010, Viçosa. **Anais...** Viçosa, 2010, p.391-417.

DANNER, H.; HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; BRAUN, R. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.1, p.562-567, 2002.

DAWSON, K. A.; TRICARICO, J. M. The use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance microbial activities in the rumen and the performance of ruminant animals. In: **Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of the Fifteenth Annual Symposium Nottingham University Press, Loughborough, Leics, UK. pp.** 1999. p. 303-312.

DETMANN, E.; QUEIROZ, A. D.; CECON, P. R. et al. Consumo de fibra em detergente neutro por bovinos em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1763-1777, 2003.

DICK, R. P.; BREAKWELL, D. P.; TURCO, Ronald F. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. **Methods for assessing soil quality**, n. methodsforasses, p. 247-271, 1996.

DOLCI, P.; TABOCCO, E.; COCOLIN, L.; BORREANI, G. Microbial dynamics during aerobic exposure of corn silage stored under oxygen barrier or polyethylene films. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.21, p.7499-7507, 2011.

DRIEHUIS, F. Occurrence of mycotoxins in silage. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2, São Pedro. **Proceedings...** São Pedro, 2011. p.20.

DRIEHUIS, F.; ELFERINK, S.J.W.H.O.; SPOELSTRA, S.F. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, p.583-594, 1999.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; VAN WIKSELAAR, P. G. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, v.56, n.4, p.330-343, 2001.

EDWARDS, R. A., McDONALD, P. **Fermentation of Silage - A Review**. West Des Moines: Iowa, 1978, 115p.

FERNANDES, L. O.; PAES, J.; REIS, R. et al. Cultivares de milho e sorgo para a produção de silagem—safra 2003/2004. **FAZU em Revista**, n. 06, p.83-86, 2010.

FERNANDES, L. O.; PAES, J.; REIS, R. et al. Avaliação de cultivares de milho e sorgo para a produção de silagem. **FAZU em Revista**, Uberaba, n.4, p.48-53, 2007.

FERRARI JR, E.; POSSENTI, R. A.; LIMA, M. L. P. et al. Características agronômicas, composição química e qualidade de silagens de oito cultivares de milho. **Boletim de Indústria Animal**, v.62, n.1, p.19-27, 2005.

FONTANELI, R.S. et al. Rendimento e valor nutritivo de cereais de inverno para silagem. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, Passo Fundo, RS. **Resultados experimentais...** Passo Fundo: RCBPA, 2011. p.186-189.

FONTANELI, R.S.; FONTANELI, R.S. Qualidade de forragem. In: FONTANELI, R.S. et al. **Forrageiras para integração lavoura-pecuária-floresta na região Sul-Brasileira**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009. Cap.1, p.25-31.

GIBSON, T.; STIRLING, A. C.; KEDDIE, R. M. et al. Bacteriological changes in silage at controlled temperatures. **Journal of general microbiology**, v.19, p.112-129, 1988.

GIMENES, A. L. G.; MIZUBUTI, I. Y.; MOREIRA, F. B. et al. Composição química e estabilidade aeróbia em silagem de milho preparadas com inoculantes bacteriano e/ou enzimático. **Acta Scientiarum**, v.28, n.2, p.153-158, 2006.

GONÇALVES, J. S. et al. Valor nutritivo de silagens de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) com adição de diferentes níveis dos subprodutos do processamento de acerola (*Malpighia glabra* L.) e de goiaba (*Psidium guajava* L.). **Revista Ciência Agrônômica**, v.35, n.01, p.131-137, 2004.

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

HRISTOV, H. D. Fresnal Zones in Wireless Links, Zone Plate Lenses and Antennas. **Artech House, Inc.**, 2000.

HUISDEN, C. M.; ADESOGAN, A. T.; KIM, S. C. et al. Effect of applying molasses or inoculants containing homofermentative or heterofermentative bacteria at two rates on the

fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.690-697, 2009.

ÍTAVO, C. C. B. F.; MORAIS, M. G.; ÍTAVO, L. C. V. et al. 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, 2006b.

JASTER, E.D. Complex interactions from inoculants, enzymes explored. **Feedstuffs**, Dec. 19, 1994.

JUNIOR, A.; GOMES, H.; DO NASCIMENTO, H.G. et al. Características químicas bromatológicas de plantas remanescentes a cultura do mini milho. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.17, n.3, p.344-354, 2016.

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.

JOBIM, C. C.; PEREIRA, J. R. A.; SANTOS, G. T. Sistemas de produção de leite com ênfase na utilização de volumosos conservados. In: REIS, R.A. et al. (Ed.). **Volumosos na produção de ruminantes**. 1.ed. Jaboticabal: Funep, 2005. p.31-82.

JUNGES, D. **Aditivo microbiano na silagem de milho em diferentes tempos de armazenamento e avaliação da estabilidade aeróbia por termografia em infravermelho**. 2010. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

KRISTENSEN, N.B.; SLOTH, K.H.; HØJBERG, O. et al. Effects of microbial inoculants on corn silage fermentation, microbial contents, aerobic stability, and milk production under field conditions. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.3764-3774.

KUNG JR., L. Side effects of microbial inoculants on silage fermentation In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 1., 2009, São Pedro. **Proceedings**... Piracicaba: FEALQ, 2009. p.7-26.

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

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, 2003. p.305-360.

KUNG JR., L; MUCK, R. E. Animal response to silages additives. In: THE SILAGE: FIELD TO FEED BUNK NORTH AMERICAN CONFERENCE. Hershey, 1997. **Proceedings**. Hershey: National Regional Agricultural Engineering Service. 1997. P. 200-209.

KUNG JR., L.; RANJIT, N. K. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.5, p.1149-1155, 2001.

KUNG, L.; GRIEVE, D. B.; THOMAS, J. W.; HUBER, J. T. Added Ammonia or Microbial Inocula for Fermentation and Nitrogenous Compounds of Alfalfa Ensiled at Various Percents of Dry Matter¹. **Journal of Dairy Science**, v.67, n.2, p.299-306, 1984.

KUNG JUNIOR, L.; SHAVER, R. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. **Focus on Forage**, v.3, p.1-5, 2001

LALA, B.; PEREIRA, V. V.; POSSAMAI, A. P. S. et al. 2010. Aditivos no processo de ensilagem. **BioEng, Tupã**, v.4 n.3, p. 175-183, 2010.

LANA, R. D. P. Nutrição e alimentação animal (mitos e realidades). **Viçosa: UFV**, v. 111, p. 112, 2005.

LEIBENSPERGER, R.Y.; PITT, R.E. A model of clostridial dominance in ensilage. **Grass and Forage Science**, v.42, n.3, p.297-317, 1987.

LOURES, D. R. S. **Enzimas fibrolíticas e emurchecimento no controle de perdas na silagem e na digestão de nutrientes em bovinos alimentados com ração contendo silagem de capim Tanzânia**. 2004. 146p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MCALLISTER, T. W.; SPARLING, M. B., FLASHMAN, L. A. et al. Differential working memory load effects after mild traumatic brain injury. **Neuroimage**, v.14, n.5, p.1004-1012, 2001.

MCDONALD, P.; HEBDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. 2 eds. Marlow: Chalcombe Publications, 1991. 340p.

MELLO, R. Silagem de milho, sorgo e gramíneas tropicais. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.1, n.1, p.48-58, 2004.

MENDES, C. Q.; SUSI, I.; NUSSIO, L.G. et al. 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.

MITTELMANN, A.; DE SOUZA SOBRINHO, F.; SILVA, J. et al. Avaliação de híbridos comerciais de milho para utilização como silagem na Região Sul do Brasil. **Ciência Rural (UFMS. Impresso)**, Santa Maria, v. 35, n.3, p. 684-690, 2005.

MOON, N. J. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **Journal of Applied Bacteriology**, v.55, p.453-460, 1983.

MUCK, R. E. Factors influencing silage quality and their implications for management. **Journal of Dairy Science**, v.71, n.11, p.2992-3002, 1988.

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

NEIVA, J. N. M.; NUNES, F. C. S., CÂNDIDO, M. J. D. et al. Valor nutritivo de silagens de capim-elefante enriquecidas com subproduto do processamento do maracujá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.04, p.1845-1851, 2006.

NEUMANN, M.; MUHLBACH, P. R. F.; NÖRNBERG, J. L. et al. Efeito do tamanho de partícula e da altura de colheita das plantas de milho (*Zea mays L.*) para ensilagem na produção do novilho superprecoce. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.5, p.1614-1623, 2007.

NEUMANN, M.; LEÃO, G. F. M.; COELHO, M. G. et al. Aspectos produtivos, nutricionais e bioeconômicos de híbridos de milho para produção de silagem. **Archivos de Zootecnia**, v.66, n.253, p.51-57, 2017.

NEWBOLD, C. J.; EL HASSAN, S. M.; WANG, J. et al. Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. **British Journal of Nutrition**, v.78, n.02, p.237-249, 1997.

NSEREKO, V. L.; SMILEY, B. K.; RUTHERFORD, W. M. et al. Influence of inoculating forage with lactic acid bacterial strains that produce ferulate esterase on ensilage and ruminal degradation of fiber. **Animal Feed Science and Technology**, v.145, p.122- 135, 2008.

NKOSI, B. D.; MEESKE, R.; PALIC, D. et al. Effects of ensiling whole crop maize with bacterial inoculants on the fermentation, aerobic stability, and growth performance of lambs. **Animal Feed Science and Technology**, v.154, p.193-203, 2009.

OLIVEIRA, L. B.; PIRES, A. J. V.; CARVALHO, G. G. P. et al. Perdas e valor nutritivo de silagens de milho, sorgo-sudão, sorgo forrageiro e girassol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.1, p.61-67, 2010.

OWENS, F. N.; ZINN, R. A.; KIM, Y. K. Limits to starch digestion in the ruminant small intestine. **Journal of Animal Science**, v.63, n.5, p.1634-1648, 1986.

PATRIZI, W. L., MADRUGA JÚNIOR C. R. F., MINETTO T. P. et al. Efeito de aditivos biológicos comerciais na silagem de capim Elefante (*Pennisetum purpureum* Schum). **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.3, p.392-397, 2004.

PAZIANI, S. F.; DUARTE, A. P.; NUSSIO, L. G. et al. Características agronômicas e bromatológicas de híbridos de milho para produção de silagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.3, p.411-417, 2009.

PAZIANI, S. F.; DUARTE, A. P.; NUSSIO, L. G. et al. Características agronômicas e bromatológicas de híbridos de milho para produção de silagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.38, n.3, p. 411-417, 2009.

PEDROSO, A. D. F., NUSSIO, L. G., PAZIANI, S. et al . Fermentation and epiphytic microflora dynamics in sugar cane silage. **Scientia Agricola**, v.62, n.5, p.427-432, 2005.

PEREIRA, O. G.; SANTOS, E. M. Microbiologia e o processo de fermentação em silagens. In: SIMPOSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM, 3., 2006, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 2006. p.393-429.

PEREIRA, V. M. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulasas por *Aspergillus sulphureus* (Fresen) Wehmer**. 2012. 111p. Dissertação (mestrado em microbiologia agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PLAYNE, M. J.; MCDONALD, P. The buffering constituents of herbage and of silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.17, n.6, p.264-268, 1966.

QUEIROZ, A. C.; SILVA, D. J. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. **Viçosa: Universidade Federal de Viçosa**, 2002.

RASBY, R. Understandig feed analysis. In: University of Nebraska-Lincoln. Lincoln, Nebraska, EUA, 2011.

REGO, A. C.; AGUIAR PAIVA, P. C. D.; MUNIZ, J. A. et al. Degradação ruminal de silagem de capim-elefante com adição de vagem de algaroba triturada. **Revista ciência agrônômica**, v. 42, n.1, p.199-207, 2011.

RÊGO, M. M. T.; NEIVA, J. N. M., RÊGO, A. C. D. et al. Chemical and bromatological characteristics of elephant grass silages with the addition of dried cashew stalk. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 02, p. 255-261, 2010.

REICH, L. J.; KUNG JR., L. Effects of combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with various lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Animal Feed Science and Technology**, v.159, p.105-109, 2010.

REINEHR, L.L et al. Avaliação Nutricional da Silagem de Diferentes Híbridos de Milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 29. 2012. Águas de Lindóia.

REIS, R. A.; ANTONIALLI A. C.; MOREIRA M. et al. Características morfológicas e químicas de híbridos de milho (*Zea mays* L.) cultivados na safrinha. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 52, n. 304, p. 887-902, 2005.

REIS, R. A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; ALMEIDA, E. O. et al. Efeito de doses de *Lactobacillus buchneri* “CEPA NCIMB 40788” sobre as perdas nos períodos de fermentação e pós-abertura da silagem de grãos úmidos de milho. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, p.923-934, 2008.

RODRIGUES, P. H. M.; ANDRADE, S. J. T.; RUZANTE, J. M et al. Valor nutritivo da silagem de milho sob o efeito da inoculação de bactérias ácido lácticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.6, p.2380-2385, 2002.

ROTZ, C.A.; MUCK, R.E. Changes in forage quality during harvest and storage. In: FAHEY JR., G.C. **Forage quality, evaluation, and utilization**. Madison. American Society of Agronomy. p. 828 - 868, 1994

SÁ, C. R. L. NEIVA, J. N. M., DE SOUZA GONÇALVES, J. et al. Composição bromatológica e características fermentativas de silagens de capim elefante (*Pennisetum*

purpureum Schum.) com níveis crescentes de adição do subproduto da Manga (*Mangifera indica* L.). **Revista Ciência Agronômica**, v. 38, n. 02, p. 199-203, 2007.

SANTOS, R. D.; FERRARI, R. A. Extração aquosa enzimática de óleo de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.1, p.132-138, 2005.

SCHMIDT, P.; SOUZA, C. M.; BACH, B. C. Uso estratégico de aditivos em silagens: Quando e como usar. **Simpósio: Produção e Utilização de Forragens Conservadas, Maringá. Anais Maringá: Nova Sthampa**, p. 243-264, 2014.

SHEPERD, A.C.; KUNG JÚNIOR, L. An enzyme additive for corn silage: effects on silage composition and animal performance. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.1760-1766, 1996.

SIQUEIRA, G. R.; Reis, R. A.; Schocken-Iturrino, R. P. et al. Perdas de silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e bacterianos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 2000-2009, 2007.

SOUSA, D. P.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, I. S. Uso de Aditivos em Forragens Conservadas. In: I Simpósio mato-grossense de bovinocultura de corte, 2011.

TILLEY, J. M. A; TERRY, R. A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Grass and forage science**, v. 18, n. 2, p. 104-111, 1963.

THEURER, C. B. Grain processing effects on starch utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.63, n.4, p.1649-1662, 1986.

TOMICH, T. R; PEREIRA, L. G. R.; GONÇALVES, L. C. et al. Características Químicas para Avaliação do Processo Fermentativo de Silagens: uma Proposta para Qualificação da Fermentação. 21 ed. Embrapa Pantanal-Documentos (INFOTECA-E), 2003. 20p.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of dairy science**, v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.

VIEIRA, F. A. P.; BORGES, I.; STEHLING, C. A. V. et al. Qualidade de silagens de sorgo com aditivos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.6, p.764-772, 2004.

VIEIRA, V. C.; MARTIN, T. N.; MENEZES, L. F. G. et al. Caracterização bromatológica de silagens de milho de genótipos super precoce. **Ciência Rural**, v.43, n.11, p.1925-1931, 2013.

WATSON, S. J.; NASH, M. J. The conservation of grass and forage crops. 2 ed., Edinburgh: Publicado por Oliver e Boyd, 1960. 758p.

WHITE, B. A.; MACKIE, R. I.; DOERNER, K. C. Enzymatic hydrolysis of forage cell walls. In: JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.; HATFIELD, R.D.; RALPH, J. **Forage cell wall structure and digestibility**, ASA, CSSA, Madison, p.455-498, 1993.

WHITTENBURY, R. **An investigation of the lactic acid bacteria**. Ph.D. thesis. Univ. Of Edinburgh. UK. 1961.

WILKINSON, J. M.; BOLSEN, K. K.; LIN, C. J. History of silage. In: BUSTON, D.R.; MUCK, E.R.; HERRISON, J.H. (Eds). **Silage Science and Technology**. Madison, ASA-CSSA-SSSA, Agronomy, 42, p.1-30, 2003.

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

WOOLFORD, M.K. **The silage fermentation**. New York: Microbiology series. 350p.

ZAGO, C. P. Cultura do sorgo para produção de silagem de alto valor nutritivo. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, v.4, p. 169-217, 1991.

ZOPOLLATTO, M.; NUSSIO, L. G.; MARI, L. J. et al. Alterações na composição morfológica em função do estágio de maturação em cultivares de milho para produção de silagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.3, p.452-461, 2009.

ZANCHETTA, A. [2010]. **Celulases e suas aplicações**. Disponível em: <<http://www.rc.unesp.br/ib/ceis/mundoleveduras/2013/Celulases.pdf>>. Acessado em: agosto 04, 2017.