



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO NORTE DO TOCANTINS  
CENTRO DO CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTEGRADO EM ZOOTECNIA NOS TRÓPICOS**

**Inoculação bacteriana e tempo de ensilagem sobre o valor nutritivo e a estabilidade  
aeróbia de silagens de grãos de milho reidratados**

**PEDRO HYAGO DA SILVA MILHOMEM**

**ARAGUAINA-TO  
2024**

**PEDRO HYAGO DA SILVA MILHOMEM**

**Inoculação bacteriana e tempo de ensilagem sobre o valor nutritivo e a estabilidade aeróbia de silagens de grãos de milho reidratados**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Integrado em Zootecnia nos Trópicos da Universidade Federal do Norte do Tocantins como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Zootecnia nos Trópicos.

Area de concentração: Produção animal

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Deborah Alves Ferreira

**ARAGUAÍNA-TO 2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Geração de Ficha Catalográfica SGFC-UFNT

**Gerado automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

M644i Milhomem, Pedro Hyago da Silva.

Inoculação bacteriana e tempo de ensilagem sobre o valor nutritivo e a estabilidade aeróbia de silagens de grãos de milho reidratados / Pedro Hyago da Silva Milhomem. - Centro de Ciências Agrárias - CCA, TO, 2025.

88 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) (Pós-Graduação - Programa de Pós-Graduação Integrado em Zootecnia nos Trópicos - PPGIZT) -- Universidade Federal do Norte do Tocantins, 2025.

Orientadora: Deborah Alves ferreira.

1. Microrganismos. 2. Prolaminas. 3. Ruminantes.

**CDD 636.089**

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**PEDRO HYAGO DA SILVA MILHOMEM**

**Inoculação bacteriana e tempo de ensilagem sobre o valor nutritivo e a estabilidade aeróbia de silagens de grãos de milho reidratados**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Integrado em Zootecnia nos Trópicos da Universidade Federal do Norte do Tocantins como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Zootecnia nos Trópicos.

**BANCA EXAMINADORA**

Aprovada em: 20/12/2024

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Deborah Alves Ferreira - UFNT

---

Prof. Dr. Antonio Clementino dos Santos - UFAPE

---

Prof. Dr. Gilberto de Lima Macedo Júnior - UFU

**ARAGUAÍNA-TO 2024**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, dedico minha mais sincera gratidão. Sua infinita bondade e presença constante em minha vida têm sido o alicerce de todas as minhas conquistas. É em Sua força que encontro propósito e direção, e sem Ele nada disso seria possível.

Aos meus amados pais, Leila Maria e José Ailton, expresso meu eterno reconhecimento e respeito. Por meio do amor incondicional, da paciência e dos ensinamentos que me deram, construíram a base que sustenta meus valores e minha determinação. Tudo o que alcancei até hoje é reflexo do exemplo de caráter e dedicação que vocês me transmitiram.

À minha querida noiva, Yasmine Alexandre, deixo registrado meu profundo agradecimento. Sua presença ao meu lado tem sido uma fonte constante de apoio e inspiração. Com seu amor e companheirismo, cada desafio torna-se mais leve, e cada vitória, mais significativa. Você é, sem dúvidas, parte essencial desta caminhada.

Ao Programa de Pós-Graduação Integrado em Zootecnia nos Trópicos da Universidade Federal do Norte do Tocantins, pela oportunidade de cursar o mestrado

À minha orientadora, Dra. Deborah Alves Ferreira, quem devo grande parte do meu desenvolvimento acadêmico, por todo o seu ensinamento, orientação, paciência e dedicação. Sou profundamente grato pela oportunidade de aprender com você.

Ao técnico do laboratório de Bromatologia e Nutrição da UFNT, Josimar Almeida, pelo auxílio e orientação valiosa em todas as análises laboratoriais.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, sem a qual este trabalho não teria sido possível.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho, meu sincero muito obrigado. Cada ajuda, seja grande ou pequena, foi crucial para a realização deste projeto.

## Resumo

Foram conduzidos dois experimentos com os objetivos de determinar: 1) as interações entre tipo de endosperma, tempo de armazenamento e inoculação bacteriana na composição química, fermentação e digestibilidade das silagens de milho reidratado; 2) os efeitos da inoculação com *Lentilactobacillus buchneri* e *Lentilactobacillus hilgardii*, isolados ou combinados, sobre o perfil fermentativo, estabilidade aeróbia e degradabilidade ruminal *in vitro*. No primeiro experimento, foi adotado um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial ( $2 \times 3 \times 5$ ), considerando dois híbridos de milho de diferentes vitreosidades (K9960 e K9606), três tratamentos (sem inoculante - controle, inoculados com *L. buchneri* e *L. hilgardii* - LHLB, e a combinação destes com *Pediococcus pentosaceus* - LHLBPP) e cinco tempos de armazenamento (40, 80, 120, 160 e 200 dias). Os inoculantes reduziram a produção de etanol e ácido butírico, além de aumentarem a formação de 1,2-propanodiol. O híbrido K9960 apresentou maiores teores de proteína bruta e prolaminas, enquanto os inoculantes reduziram significativamente a concentração de prolaminas ao longo do armazenamento, melhorando a degradabilidade da matéria seca e orgânica. No segundo experimento, utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial ( $3 \times 6$ ), considerando três tratamentos (controle, *L. buchneri* - LB e *L. buchneri* combinado com *L. hilgardii* - LHLB) e seis tempos de armazenamento (15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias). A inoculação com LHLB proporcionou maior estabilidade aeróbia, alcançando 288 horas aos 15 dias de fermentação. A degradabilidade ruminal *in vitro* da matéria orgânica aumentou com o tempo de ensilagem, atingindo valores máximos aos 60 dias nos tratamentos controle (84,5%) e LHLB (89,1%). O uso de inoculantes também reduziu o *lag time* e melhorou a cinética de fermentação. Conclui-se que a escolha adequada de híbridos e inoculantes pode melhorar a fermentação, estabilidade aeróbia e digestibilidade da silagem de milho reidratado, sendo uma estratégia viável para otimizar a eficiência alimentar de ruminantes.

Palavras chave: Microorganismos, Prolaminas, Ruminantes, Vitreosidade.

## Abstract

Two experiments were conducted to determine: 1) the interactions between endosperm type, storage time, and bacterial inoculation on the chemical composition, fermentation, and digestibility of rehydrated corn silages; 2) the effects of inoculation with *Lentilactobacillus buchneri* and *Lentilactobacillus hilgardii*, either individually or in combination, on the fermentative profile, aerobic stability, and in vitro ruminal degradability. In the first experiment, a completely randomized factorial design ( $2 \times 3 \times 5$ ) was used, considering two corn hybrids with different vitreousness levels (K9960 and K9606), three treatments (without inoculant - control, inoculated with *L. buchneri* and *L. hilgardii* - LHLB, and their combination with *Pediococcus pentosaceus* - LHLBPP), and five storage times (40, 80, 120, 160, and 200 days). The inoculants reduced ethanol and butyric acid production while increasing 1,2-propanediol formation. The K9960 hybrid showed higher crude protein and prolamin content, whereas the inoculants significantly reduced prolamin concentration over storage, improving dry matter and organic matter degradability. In the second experiment, a completely randomized factorial design ( $3 \times 6$ ) was used, considering three treatments (control, *L. buchneri* - LB, and *L. buchneri* combined with *L. hilgardii* - LHLB) and six storage times (15, 30, 45, 60, 75, and 90 days). Inoculation with LHLB provided greater aerobic stability, reaching 288 hours at 15 days of fermentation. The in vitro ruminal degradability of organic matter increased with ensiling time, reaching peak values at 60 days in the control (84.5%) and LHLB (89.1%) treatments. The use of inoculants also reduced lag time and improved fermentation kinetics. It is concluded that the appropriate selection of hybrids and inoculants can enhance fermentation, aerobic stability, and digestibility of rehydrated corn silage, making it a viable strategy to optimize ruminant feed efficiency.

Keywords: Microorganisms, Prolamins, Ruminants, Vitreousness.

## Sumário

Resumo .....	6
Abstract .....	7
Capítulo 1- considerações gerais .....	10
1 Introdução.....	10
2. Revisão de literatura.....	11
2.1 Estrutura do grão de milho .....	11
2.2 Silagem de milho reidratado.....	14
2.3 Inoculantes microbianos na silagem de milho reidratado .....	19
Referências .....	25
Capítulo 2- Tipo de endosperma, tempo de fermentação e inoculação bacteriana sobre o perfil de fermentação, estabilidade aeróbia e degradabilidade ruminal <i>in vitro</i> de silagem de milho reidratado.....	34
Resumo .....	34
Abstract .....	35
1. Introdução.....	36
2.2. Análises químicas.....	38
2.3. Teste de estabilidade aeróbia .....	39
2.4. Análises microbiológicas.....	39
2.5. Ensaio de produção de gases .....	39
2.6. Análises estatísticas.....	41
3. Resultados.....	41
3.1. Características químicas e perfil fermentativo.....	41
3.2 Degradabilidade ruminal <i>in vitro</i> .....	48
4. Discussão .....	52
4.1. Características químicas e perfil fermentativo.....	52
4.2 Degradabilidade ruminal <i>in vitro</i> .....	56
5 Conclusão .....	58
Referências .....	59
Capítulo 3-Tempo de fermentação e inoculação com <i>Lentilactobacillus buchneri</i> com ou sem <i>L. hilgardii</i> sobre o perfil de fermentação, estabilidade aeróbia e degradabilidade ruminal <i>in vitro</i> de silagem de milho reidratado. ....	64
Resumo .....	64
Abstract .....	65
1. Introdução.....	66
2. Materiais e métodos .....	67
2.1. Ensilagem .....	67
2.2. Análises químicas.....	68
2.3. Teste de estabilidade aeróbia .....	69
2.4. Ensaio de produção de gases .....	69

2.5. Análises estatísticas.....	70
3. Resultados.....	71
3.1 Características químicas e perfil fermentativo.....	71
3.2 Degradabilidade ruminal <i>in vitro</i> .....	75
4 Discussão .....	79
4.1. Características químicas e perfil fermentativo.....	79
4.2 Degradabilidade ruminal <i>in vitro</i> .....	83
5 Conclusão .....	84
Referências .....	85

## Capítulo 1- considerações gerais

### 1 Introdução

O milho é um dos principais cultivos agrícolas do Brasil e desempenha um papel essencial na alimentação animal, sendo amplamente utilizado na formulação de rações para ruminantes e monogástricos (Beigh et al., 2017; Huntington, 1997). Sua alta disponibilidade e valor nutricional tornam esse grão uma fonte fundamental de energia nas dietas animais, contribuindo para o desempenho produtivo e a eficiência alimentar

Entretanto o amido presente no milho está envolto em uma complexa matriz de proteínas, denominadas prolaminas (García-Lara et al., 2019), que dificulta a sua degradação ruminal e digestão intestinal. Desse modo, ocasiona impacto direto na eficiência e produtividade animal, sendo necessário buscar meios de processamento para contornar esse problema (Owens, 2005; Theurer, 1986).

Diante dos principais métodos de processamento como moagem, floculação e laminação, a reidratação e ensilagem do grão demonstra ser a mais eficiente em reduzir a quantidade de prolaminas (Berchielli et al., 2011).

A silagem dos grãos de milho apresenta baixa a estabilidade aeróbia, ocasionando redução na qualidade nutritiva e perdas de parte do material ensilado. No entanto, há maneiras de reduzir esse impacto, especialmente quando combinada com o uso de aditivos como bactérias heterofermentativas obrigatórias (Saylor et al., 2020; Almeida, 2024). Esses microrganismos são capazes de converter ácido lático em ácido acético (Oude Elferink et al., 2001), que possui ação antifúngica e aumenta consideravelmente a estabilidade aeróbia das silagens (Danner et al., 2003).

Estudos demonstram que o *Lentilactobacillus buchneri* aumenta a estabilidade aeróbia de silagens de milho reidratado (Silva et al., 2018; Silva et al., 2019) e tem potencial para aumentar a degradabilidade ruminal da matéria seca (Silva et al., 2018). O *Lentilactobacillus hilgardii*, em estudos recentes, vem mostrando eficácia em aumentar a estabilidade aeróbia, isoladamente ou

associado com o *L. buchneri*, principalmente em tempos curtos de fermentação (Droin et al., 2019; Ferrero et al., 2019; Silva et al., 2020; Ferrero et al., 2021). Entretanto, são escassos estudos em silagens de milho reidratado.

## 2. Revisão de literatura

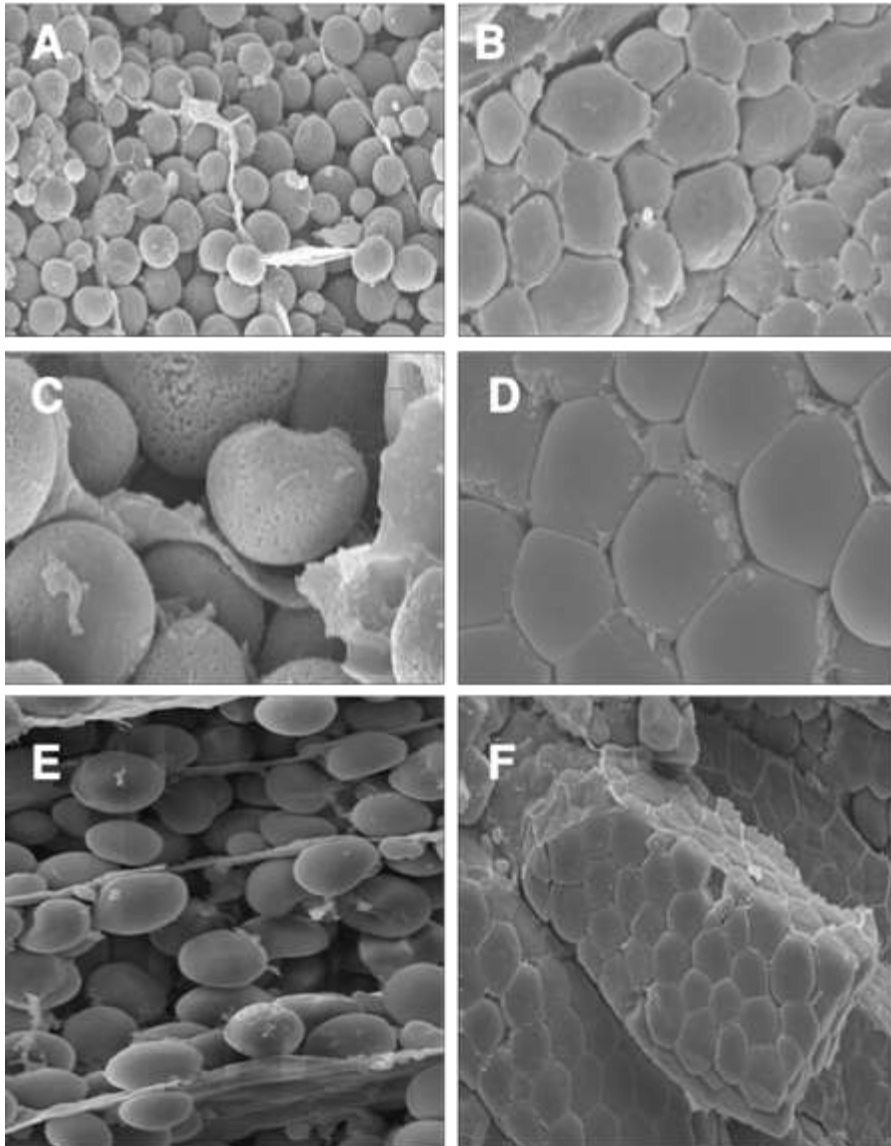
### 2.1 Estrutura do grão de milho

O grão de milho é uma estrutura complexa composta por diferentes partes. Na sua forma mais básica, sua anatomia consiste em quatro partes principais: o pericarpo, embrião (gérmen), endosperma e pedicelo (ponta). Geralmente, amarelo ou branco, com algumas variedades que podem exibir uma gama de colorações, indo do preto ao vermelho, tendo um peso médio de 250 a 300 mg (Paes, 2008).

O pedicelo, a menor estrutura do grão de milho, é a única parte que não é coberta pelo pericarpo e a sua função principal é conectar o grão ao sabugo. Já o pericarpo, constitui cerca de 7% do peso do grão e é subdividido em epicarpo, mesocarpo e endocarpo e possui um papel crucial na proteção do grão contra estresses bióticos e abióticos. O gérmen representa cerca de 12% do peso do grão, contendo a maior fração lipídica, constituindo cerca de 85% da quantidade total presente no milho, além de ser uma fonte importante de proteínas e açúcares (García-Lara et al., 2019).

O endosperma, representando a maior parte do peso seco do grão, consiste principalmente em 86% amido e 10% proteínas de reserva chamadas prolaminas (no milho, as prolaminas são denominadas zeínas) (Xu et al., 2019). Os grânulos de amido podem estar dispersos de forma farinácea ou envolvidos por uma matriz proteica densa (Figura 1), conferindo-lhes um aspecto vítreo (Robutti et al., 1974). Essa diferenciação óptica é útil na identificação de diferentes tipos de grãos.

Figura 1. Ultramicrografia do endosperma de variedades de milho diferindo na dureza dos grãos. A, C e E - variedade Cunha (53,52% de vitreosidade). B, D e F – variedade Cristal (82,57% de vitreosidade)



Fonte: Davide et al. (2010)

Existem cinco classes gerais de milho – dentado, duro, pipoca, farináceo e doce (García-Lara et al., 2019). A textura do grão de milho é chamada vitreosidade e sua denominação é devido a proporção entre o endosperma vítreo e farináceo em relação ao endosperma total (Gayral et al., 2016). Híbridos com quantidades de amido semelhantes podem apresentar diferenças na vitreosidade. Allen et al. (2021) mostram dois híbridos de milho, um farináceo (SR 158) contendo 726 g kg<sup>-1</sup> de amido e 24,5% de vitreosidade e outro vítreo (Z75W) contendo 713 g kg<sup>-1</sup> de amido e 66,4% de vitreosidade. Fernandes et al. (2021) também avaliaram dois híbridos de milho que continham 657,4 g kg<sup>-1</sup> de

amido, 51,4 g kg<sup>-1</sup> de zeínas e 79,2% de vitreosidade (IAC 8390) e 667,3 g kg<sup>-1</sup> de amido, 40,4% de zeínas e 59,1% de vitreosidade (AG 1051). Philippeau et al. (1999) avaliaram oito híbridos de milho dentados e seis duros. Em média, os híbridos dentados apresentaram 680 g kg<sup>-1</sup> de amido e 51,4% de vitreosidade. Já os híbridos duros, 671 g kg<sup>-1</sup> de amido e 71,8% de vitreosidade.

A dureza do grão de milho é diretamente influenciada pela quantidade de zeínas que compõem a matriz proteica ao redor dos grânulos de amido (Kljak et al., 2011). Essa correlação foi observada por Kljak et al. (2011) que estudaram oito híbridos comerciais de milho. O híbrido com maior teor de zeínas (65,15 g kg<sup>-1</sup>) apresentou vitreosidade de 72,89%, enquanto no híbrido com menor teor de zeínas (51,62 g kg<sup>-1</sup>), a vitreosidade foi de 60,13%.

Outro fator que exerce uma influência significativa no aumento da vitreosidade dos grãos de milho é tempo de maturação da planta no momento da colheita dos grãos. Pereira et al. (2004) observaram que, à medida que a planta amadurece, a vitreosidade aumenta de forma linear ( $p < 0,01$ ), variando de 38,2% no início de aparecimento da linha do leite à 47,9% no estágio de camada preta, para híbridos dentados. Para híbridos duros, os valores foram, respectivamente, de 59,9% e 74,2%. Fernandes et al. (2021) também observaram esse comportamento ( $p < 0,01$ ). Os valores médios de dois híbridos foram de 42,21% de vitreosidade quando colhido com 50 g kg<sup>-1</sup> de MS, 57,97% em ponto de grão úmido (70 g kg<sup>-1</sup> de MS) e de 69,18 em ponto de grão seco (80 g kg<sup>-1</sup> de MS).

Embora o amido presente no milho tenha alta digestibilidade nos ruminantes, podendo exceder 97% (Orskov, 1986), existem fatores que pode interferir. Por exemplo, a matriz proteica que envolve os grânulos de amido pode ser um obstáculo na sua digestibilidade (Allen e Ying, 2021). Pereira et al. (2004) observaram que a degradabilidade ruminal da matéria seca, em 24 horas, reduziu de 73,3 para 19% e de 86,2 para 42,3% em híbridos duros e dentados, respectivamente, com o aumento da vitreosidade dos grãos no momento da colheita.

Allen et al. (2021) avaliaram a degradabilidade ruminal e a digestão intestinal e total do amido, em vacas leiteiras recebendo dietas com 29% de amido, confeccionadas com dois híbridos de milho diferentes, um farináceo e outro vítreo. Para o milho moído fino, a degradabilidade ruminal foi de

61,1% do ingerido para o híbrido farináceo e de 33,3% para o vítreo. Mesmo havendo compensação intestinal, a digestibilidade no trato total foi de 92,2% do ingerido para o híbrido farináceo e de 85,9% para o vítreo.

O conhecimento sobre a vitreosidade é essencial, em razão dos grãos de milho mais vítreos apresentarem menor digestibilidade. Essa característica impacta no aproveitamento dos nutrientes e, por consequência, o desempenho dos animais que os consomem (Corona et al., 2006). De acordo com Correa et al. (2002), o tipo de milho mais comum no Brasil é o de endosperma com textura dura, vítrea. Isso implica no desenvolvimento e uso de tecnologias para a sua atenuação.

## 2.2 Silagem de milho reidratado

A ensilagem de grãos de milho permite ao produtor aproveitar os períodos de menor custo para aquisição dos grãos, facilitando o armazenamento e reduzindo o ataque de pragas, agregando valor ao sistema de produção. Além disso, é uma solução para produtores com dificuldade de colheita e armazenamento de milho úmido em regiões em que o momento de colheita e ensilagem coincide com o período das chuvas (Ferraretto et al., 2018).

A qualidade da silagem depende de uma série de fatores, desde a escolha adequada do híbrido até os cuidados durante todo o processo de produção (Muck, 1988). Além disso, o grau de processamento do material, a higiene do silo, o tipo de silo, tempo de fechamento, compactação e vedação do silo são aspectos técnicos que não podem ser negligenciados (Borreani et al., 2018; Ramos et al., 2021).

A silagem também demanda estratégias após a abertura do silo para garantir que os animais recebam um alimento com qualidade nutricional semelhante ao original (Macedo et al., 2019) ou ainda melhor. Esse cuidado inclui o monitoramento da temperatura e a remoção regular de porções de silagem para evitar o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis e que podem comprometer o valor nutricional e a segurança do alimento (Velho et al., 2006; Bernardes et al., 2021). Essas práticas são essenciais para minimizar perdas de nutrientes e manter a estabilidade aeróbia da silagem durante o período de seu fornecimento aos animais.

Mombach et al. (2019) observaram que a inclusão de 30% de água na matéria natural da silagem de milho reidratado, resultando em 38,42% de umidade final, resultou em um perfil fermentativo otimizado e menores perdas de matéria seca e efluentes, sendo essa a proporção recomendada para a ensilagem de milho seco moído. Este nível de inclusão de água proporcionou a manutenção da qualidade nutricional e a eficiência do processo de ensilagem.

Silagens de grãos de milho podem apresentar baixa eficiência fermentativa devido ao baixo teor de umidade, quando comparado às forragens, e baixos teores de açúcares solúveis, principal substrato das bactérias anaeróbias (Kung et al., 2007). Kung et al. (2018) apresenta alguns parâmetros fermentativos para silagens de grão úmido de milho (Tabela 1). Entretanto, trabalhos mostram que silagens de milho reidratado vêm apresentando parâmetros fermentativos adequados, capazes de preservar o material ensilado (Tabela 2).

Tabela 1. Parâmetros fermentativos sugeridos para silagens de milho grão úmido

Umidade g kg <sup>-1</sup> de MS	pH	Ácido lático g kg <sup>-1</sup> de MS	Ácido butírico g kg <sup>-1</sup> de MS	Etanol g kg <sup>-1</sup> de MS	Amônia g kg <sup>-1</sup> de N
700 - 750	4,0 - 4,5	5,0 - 20,0	0	2,0 - 20,0	< 10,0

Fonte: Adaptado de Kung et al. (2018)

Tabela 2.

Parâmetros fermentativos de silagens de milho reidratado, por diferentes autores.

Tempo de fermentação (dias)	Umidade* g kg <sup>-1</sup> de MS	pH	Ácido lático g kg <sup>-1</sup> de MS	Amônia g kg <sup>-1</sup> de MS	Autor
60	375	3,95	27,6	0,91	Almeida (2024)
60	350	4,15	23,7	0,55	Silva et al. (2019)
60	330	3,80	14,0	0,49	Arcari et al. (2016)
60	300	4,70	10,7	-	Fernandes et al. (2021)
30	300	4,40	9,5	0,18	Ferrareto et al. (2015)
30	350	4,40	13,6	-	Rezende et al. (2014)
124	350	4,20	27,6	0,71	Silva et al. (2018)

\* Umidade no momento da ensilagem

Durante o processo de fermentação do milho grão reidratado, ocorre a solubilização da matriz proteica que envolve os grânulos de amido. Esse processo é majoritariamente conduzido por enzimas microbianas, que contribuem com 60% da solubilização, enquanto enzimas do próprio grão participam com 30% e fungos e produtos finais da fermentação com os 10% restantes (Junges et al., 2017).

O tempo de ensilagem exerce influência significativa na qualidade final da silagem de milho reidratado (Tabela 3). A recomendação atual é de pelo menos 60 dias de fermentação. Períodos longos proporcionam mais tempo para ação proteolítica dos microrganismos, havendo aumentos da degradabilidade ruminal da matéria seca e do amido, entretanto, os ganhos mais significativos ocorrem nos primeiros dois meses de fermentação (Silva et al., 2019; Gomes et al., 2020; Fernandes et al., 2021).

O aumento da digestibilidade com a ensilagem do grão de milho reflete no desempenho animal. Silva et al. (2022) observaram em bovinos de corte que a substituição do milho seco pelo grão reidratado e ensilado melhorou a eficiência alimentar em 13,3% e reduziu a ingestão de matéria seca em 10,3%. Além disso, o milho reidratado finamente moído reduziu em até 55% as perdas de amido fecal em comparação ao milho seco de mesma granulometria, indicando maior aproveitamento do amido dietético. Durães et al. (2024) relataram que a digestibilidade da matéria seca e do amido em bovinos de leite aumentou em cerca de 5,52% e 6,32% respectivamente com o uso de silagem de milho reidratado em relação a dietas com milho moído seco, mantendo um mesmo nível diário de ingestão de matéria seca, mantendo uma produção 9,64% maior de leite.

Tabela 3. Efeito do tempo de fermentação na degradabilidade ruminal da matéria seca (MS) ou do amido de silagens de milho reidratado, por diferentes autores.

<i>In situ</i> ou <i>in vitro</i>	MS ou Amido	Tempo de fermentação (dias)	Degradabilidade g kg <sup>-1</sup> de MS ou amido	Autor
<i>In vitro</i> 7h	Amido	0	508	Ferraretto et al. (2015)
		30	649	
<i>In vitro</i> 7h	Amido	0	380	Ferraretto et al. (2018)
		28	520	
<i>In situ</i> DE 5%/h	Amido	3	630	Arcari et al. (2016)
		30	700	
		60	740	
		120	770	
		330	880	
<i>In situ</i> 12h	MS	0	480	Gomes et al. (2020)
		30	650	
		60	810	
		120	840	
<i>In situ</i> 24h	MS	15	887	Silva et al. (2019)
		60	893	
		180	914	
<i>In situ</i> 24h	MS	0	690	Fernandes et al. (2021)
		7	780	
		60	890	
		120	900	
	Amido	0	860	
		7	910	
		60	950	
		120	960	

DE 5%/h = degradabilidade efetiva na taxa de passagem de 5%/h

Em uma meta-análise, Jacovaci et al. (2021) compararam resultados de desempenho de bovinos de corte recebendo, pelo menos, 300 g kg<sup>-1</sup> de grão de milho seco ou de silagens de grão (grão úmido ou reidratado) tipo *flint* na dieta. Os autores verificaram um aumento da eficiência alimentar de 0,164 para 0,194 (+18,3%) quando os grãos são ensilados. Isso ocorreu devido à redução do consumo de matéria seca e aumento da digestibilidade do amido no trato digestivo total, mantendo-se o ganho de peso. Os autores concluíram que a ensilagem aumenta, em média, em 25,7% o valor nutritivo dos grãos de milho.

Arcari et al. (2016) avaliaram a substituição crescente do milho grão seco pela silagem de grão reidratado para vacas leiteiras no final da lactação, com produção média de 22 kg dia<sup>-1</sup> de leite. Os resultados mostraram aumento da digestibilidade da matéria seca e do amido da dieta no trato digestivo total, em 6,1% e 8,8%, respectivamente, e da produção de leite corrigida para 3,5% de gordura em 2,65 kg dia<sup>-1</sup>.

A silagem de milho reidratado apresenta alta suscetibilidade à perda de estabilidade aeróbia devido ao crescimento de fungos e leveduras, principalmente devido à grande presença de amido que pode ser utilizado como substrato por esses microrganismos (Kung et al., 2007). Entretanto, estudos mostram que a estabilidade aeróbia de silagens de milho reidratado pode variar significativamente. De acordo com Rezende et al. (2014), as diferenças encontradas podem estar relacionadas ao teor de água utilizado na reidratação, que quanto maior, melhor o ambiente para o desenvolvimento de fungos e leveduras quando o alimento é exposto ao oxigênio. Outro fator relevante é o tempo de fermentação e isso ocorre, segundo Silva et al. (2019), provavelmente devido ao acúmulo de ácido acético e propiônico, que possuem propriedades antifúngicas.

Silva et al. (2016) relataram que silagens de milho reidratado, com 35% de umidade e 45 dias de fermentação, perderam a estabilidade em 17 horas após a exposição ao ar. Rezende et al. (2014) verificaram aumento da temperatura a partir de 40 horas, em silagens de milho com 35 e 40% de umidade, fermentadas por 30 dias. Silva et al. (2019) observaram estabilidade aeróbia de 75 horas para a silagem de milho reidratado, com 35% de umidade e fermentado por 60 dias. Nesse estudo, o

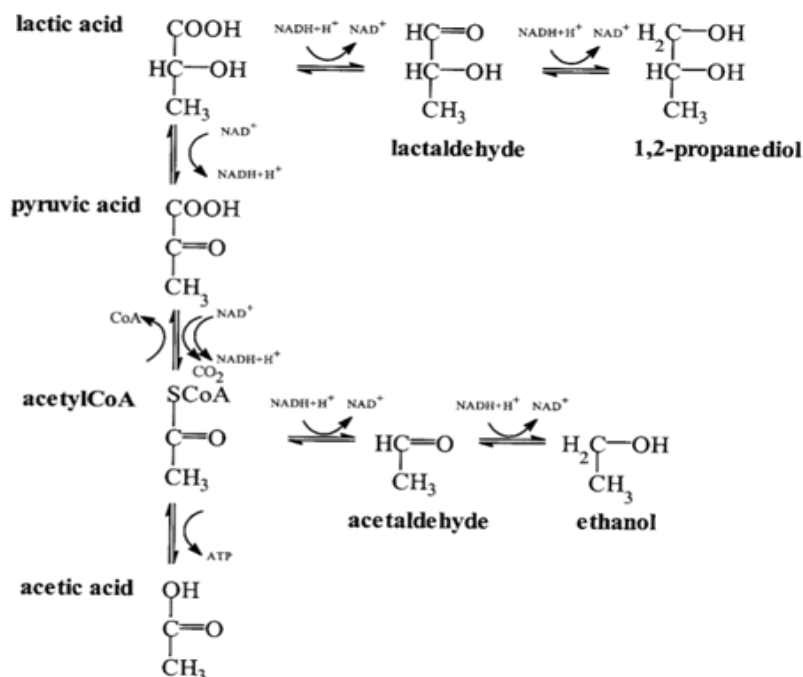
aumento do tempo de fermentação proporcionou aumento da estabilidade aeróbia. Dessa forma, verifica-se a importância da busca de medidas adicionais de manejo necessárias para mitigar esse e garantir a durabilidade da silagem ao longo do armazenamento e após a abertura.

### 2.3 Inoculantes microbianos na silagem de milho reidratado

Ao adicionar inoculantes bacterianos à silagem, é introduzido uma população específica de microrganismos, geralmente bactérias ácido lácticas (BAL) selecionadas (Fabiszewska et al., 2019). Dentre os inoculantes bacterianos mais comumente utilizados estão o *Lactiplantibacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *Enterococcus faecium* (homofermentativas), *Lentilactobacillus buchneri* e *Propionibacterium acidipropionici* (heterofermentativas) (McDonald et al., 1991; Blajman et al., 2020; Wang et al., 2022; Diógenes et al., 2023).

As BAL homofermentativas convertem glicose e frutose em ácido láctico (Henderson, 1993). O ácido láctico é um ácido forte ( $pK_a = 3,86$ ), capaz de reduzir o pH do material ensilado e garantir a estabilidade do material em anaerobiose. O uso desses microrganismos como inoculantes de silagens pode garantir um perfil fermentativo adequado, reduzir perda de nutrientes e preservar a qualidade do alimento (Nunes et al., 2024).

Figura 2. Via metabólica proposta para a degradação anaeróbica do ácido láctico pelo *L. buchneri* em quantidades equimolares de 1,2 propanediol, ácido acético e traços de etanol



Fonte: Elferink et al. (2001)

A demanda por reduzir a deterioração aeróbia dá-se em função das perdas após a abertura dos silos, durante seu fornecimento aos animais, seja por redução de energia e valor nutritivo ou produção de micotoxinas (Woolford.,1990). Danner et al. (2003) demonstraram que o ácido acético, produzido pelas BAL heterofermentativas, tem a propriedade de inibir o crescimento de fungos filamentosos e leveduras, aumentando a estabilidade aeróbia das silagens inoculadas.

Em ambiente de pH próximo à 4, devido ao seu pKa de 4,76, o ácido acético estará, em grande parte, sob a forma não dissociada. Esta forma tem facilidade de penetrar na membrana fúngica e, dentro da célula, dissocia-se devido ao pH mais alto (Brul e Coote, 1999). Segundo Bracey et al. (1998), os prótons liberados internamente por ácidos fracos causam um desequilíbrio na homeostase do pH. Como consequência, a célula se utiliza de mecanismos compensatórios com alto gasto energético, reduzindo a energia disponível para o crescimento normal.

O *L. buchneri* vem sendo amplamente estudado e é usado comercialmente como inoculante de silagens (Zheng et al., 2020), com o intuito de aumentar a estabilidade aeróbia. A inoculação com *L. buchneri* mostrou-se efetiva em aumentar a estabilidade aeróbia em silagens de milho (Ranjit e Kung Jr., 2000), cana-de-açúcar (Gomes et al., 2021), grão úmido de milho (Silva et al., 2019; Silva et al., 2020) e grão de milho reidratado (Silva et al., 2018; Silva et al., 2019). De forma geral, as silagens inoculadas com *L. buchneri* apresentam redução significativa da contagem de leveduras no momento da abertura e estabilidade aeróbia maior que 240 horas (tabela 4).

A busca por um perfil fermentativo mais eficiente, visando maior estabilidade aeróbia e qualidade nutricional das silagens, mesmo em tempos mais curtos de fermentação, tem levado ao desenvolvimento de estratégias que combinam diferentes microrganismos. Estudos recentes investigam o efeito combinado dos inoculantes *L. buchneri* e *L. hilgardii*.

Tabela 4. Efeito do uso de inoculantes, em diferentes tempos de fermentação, na estabilidade aeróbia de silagens de milho grão úmido e reidratado, por diferentes autores.

Tipo de silagem de grão de milho	Tempo de fermentação (dias)	Tipo de inoculante	Estabilidade aeróbia (horas)	Autor
Reidratado	60	Controle	49	Almeida (2024)
		LHLB	>216	
		LBLP	>216	
Reidratado	15	Controle	20	Silva et al. (2019)
		LB	50	
	30	Controle	60	
		LB	140	
	60	Controle	80	
		LB	165	
	120	Controle	100	
		LB	260	
Reidratado	124	Controle	71	Silva et al. (2018)
		LB	288	
		LPPA	52	
Úmido	30	Controle	16	Silva et al. (2024)
		LB	248	
	60	Controle	56	
		LB	>250	
Úmido	30	Controle	240	Pupo e Ferraretto (2023)
		LBPP	240	
	90	Controle	240	
		LBPP	240	
Úmido	10	Controle	22	
		LH	56	
		LB	42	
		LHLB	65	
	30	Controle	31	

		LH	>250	Silva et al. (2020)
		LB	>250	
		LHLB	>250	
	90	Controle	49	
		LH	>250	
		LB	>250	
		LHLB	>250	
Úmido	15	Controle	15	
		LB	15	
	30	Controle	40	
		LB	70	Silva et al. (2019)
	60	Controle	50	
		LB	170	
	120	Controle	70	
		LB	125	

Controle = água; LB = *Lentilactobacillus buchneri*; LH = *Lentilactobacillus hilgardii*; LP = *Lactiplantibacillus plantarum*; PA = *Pediococcus acidilactici*; PP = *Pediococcus pentosaceus*.

O *L. hilgardii* é uma BAL heterofermentativa e apresenta potencial para aumentar a produção de ácido acético isoladamente ou em associação com o *L. buchneri* aos 100 e 250 dias de ensilagem do milho (Ferrero et al., 2019). Drouin et al. (2019) relataram que o *L. buchneri* e o *L. hilgardii* produziram silagens de milho com o pH um pouco mais elevado, devido a conversão de lactato em acetato e produção de 1,2 propanodiol. Nair et al. (2020) também observaram maior teor de acetato (26,2 x 13,9 mg g<sup>-1</sup> MS) em silagens de milho inoculadas com *L. hilgardii* e *L. buchneri*, após 120 dias de fermentação. Os pesquisadores também verificaram menores contagens de leveduras e estabilidade aeróbia três vezes maior nas silagens inoculadas em relação à controle (sem aditivo). Entretanto, nesse estudo, o teor de ácido láctico e o pH foram semelhantes entre as silagens controle e inoculadas, com médias de 48,7 mg g<sup>-1</sup> MS e 3,78, respectivamente.

Silva et al. (2020) avaliaram a adição do *L. hilgardii* isolado ou associado ao *L. buchneri* à silagem de grão úmido. Os grãos foram colhidos com 710 g kg<sup>-1</sup> de MS, moídos e ensilados por 10, 30 ou 92 dias. Assim como relatado por Drouin et al. (2019), Silva et al. (2020) também observaram maior pH nas silagens inoculadas com os dois microrganismos. Houve também maior produção de ácido acético e 1,2 propanodiol e menor produção de etanol. A população de leveduras foi reduzida já a partir de 10 dias de ensilagem, resultando em aumento da estabilidade aeróbia das silagens de grão úmido, principalmente quando os microrganismos estão associados. Aos 30 e 92 dias, a estabilidade das silagens aumenta de 31 e 49 horas no tratamento controle, respectivamente, para >250 h nos tratamentos com *L. hilgardii* e *L. buchneri* associados ou isolados.

O *P. pentosaceus*, por ser uma bactéria homofermentativa, combinada ao *L. buchneri* e *L. hilgardii* poderia contribuir para a maior produção de ácido lático, maior abaixamento do pH e menores perdas fermentativas.

Pupo e Ferraretto (2023) avaliaram a silagem de grão úmido de milho inoculada com *L. buchneri* e *P. pentosaceus* aos 30 e 90 dias de fermentação. Os pesquisadores verificaram que, mesmo na presença do *P. pentosaceus*, o teor de ácido lático foi menor e o pH foi um pouco maior nas silagens inoculadas, independente do tempo de fermentação. Além disso, a inoculação promoveu aumento dos teores de ácido acético e redução do etanol. Este resultado sugere que o *L. buchneri* foi capaz de metabolizar o ácido lático em ácido acético. Nesse estudo, não houve quebra da estabilidade aeróbia até 240h, tanto na silagem controle, como na inoculada. Além disso, observou-se maior teor de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) nas silagens inoculadas, sugerindo que houve maior proteólise durante a fase fermentativa. Junges et al. (2017) explica que, embora as BAL não possuam alta capacidade proteolítica, podem promover um ambiente mais favorável para bactérias que o fazem, devido ao maior pH verificado nas silagens inoculadas.

Silva et al. (2018) mostraram que a inoculação com *L. buchneri* não só prolonga a estabilidade aeróbia, como também promove o aumento da proteólise, resultando em maior teor de amônia e redução das prolaminas em silagens de milho reidratado. Essa proteólise adicional foi um achado

interessante, pois, embora o objetivo inicial do inoculante fosse estabilizar a silagem, observou-se também um aumento na solubilização da matriz proteica. Esse efeito favoreceu a degradabilidade ruminal da matéria seca e a qualidade nutricional da silagem.

Droin et al. (2023) avaliaram silagens de milho úmido inoculadas com *L. buchneri* e a combinação de *L. hilgardii* e *L. buchneri*. Os pesquisadores observaram aumento do teor de N-NH<sub>3</sub> e da degradabilidade ruminal *in vitro* 7h aos 120 dias de fermentação e sugeriram a quebra da matriz proteica foi maior nas silagens inoculadas com ambas as bactérias. Segundo os autores, a maior expressão de enzimas ligadas ao metabolismo do aspartato, aminoácido presente em grande quantidade nas zeínas, ocorreu nas silagens inoculadas com *L. hilgardii* e *L. buchneri*, corroborando com a maior proteólise nesse tratamento.

Esses achados indicam que o uso estratégico de múltiplos inoculantes pode potencializar a eficiência nutricional da silagem, beneficiando a absorção de nutrientes e melhorando o desempenho animal. No entanto, são necessárias mais pesquisas para entender completamente a interação entre esses inoculantes.

## Referências

- Allen, M. S., Longuski, R.A., Ying, Y., 2021. Effects of corn grain endosperm type and fineness of grind on feed intake, feeding behavior, and productive performance of lactating dairy cows. *Jornal of Dairy Science* 104, 7630-7640. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18991>
- Allen, M. S., Ying, Y., 2021. Effects of corn grain endosperm type and conservation method on site of digestion, ruminal digestion kinetics, and flow of nitrogen fractions to the duodenum in lactating dairy cows. *Jornal of Dairy Science* 104, 7617-7629. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18882>
- Almeida, S.T.R., 2024. Utilization of reconstituted corn grain silage in supplements for finishing beef cattle on pasture: evaluation of supplement aerobic stability and cattle performance. Dissertation of Master's degree in Animal Science. Unesp: Jaboticabal, 67f. <https://hdl.handle.net/11449/256017>
- Arcari, M. A., Martins, C. M. M. R., Tomazi, T., Gonçalves, J. L., Santos, M. V. D., 2016a. Effect of substituting dry corn with rehydrated ensiled corn on dairy cow milk yield and nutrient digestibility. *Animal Feed science and technology.*, 221, 167-173. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.08.005>
- Arcari, M. A., Martins, C. M. M. R., Tomazi, T., Santos, M. V., 2016b. Effect of the ensiling time of hydrated ground corn on silage composition and in situ starch degradability. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.* 53, 60-71. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v53i1p60-71>
- Beigh, Y. A., Ganai, A. M., & Ahmad, H. A. (2017). Prospects of complete feed system in ruminant feeding: A review. *Veterinary world*, 10(4), 424. doi: [10.14202/vetworld.2017.424-437](https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.424-437)
- Berchielli, Telma Teresinha; PIRES, Alexandre Vaz; OLIVEIRA, Simone Gisele de. *Nutrição de ruminantes.* 2011.
- Bernardes, T.F., Oliveira, I.L., Casagrande, D.R., Ferrero, F., Tabacco, E, Borreani, G., 2021. Feed-out rate used as a tool to manage the aerobic deterioration of corn silages in tropical and temperate climates. *Jornal of Dairy Science.* 104, 10828-10840. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20419>

- Blajman, J. E., Vinderola, G., Paez, R. B., Signorini, M. L., 2020. The role of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria for alfalfa silage: a meta-analysis. *The Journal of Agricultural Science*. 158, 107-118. <https://doi.org/10.1017/S0021859620000386>
- Borreani, G., Tabacco, E., Schmidt, R. J., Holmes, B. J., Muck, R., 2018. A Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages *Journal of Dairy Science*. 101, 3952-3979. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13837>
- Bracey, D., Holyoak, C.D., Coote, P.J., 1988. Comparison of the inhibitory effect of sorbic acid and amphotericin B on *Saccharomyces cerevisiae*: is growth inhibition dependent on reduced intracellular pH? *Journal of Applied Microbiology*. 85, 1056-1066. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1998.tb05271.x>
- Brul, S. Coote, P., 1999. Review. Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology* 50, 1-17. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00072-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00072-0)
- Correa, C. E. S., Shaver, R. D., Pereira, M. N., Lauer, J. G., Kohn, K., 2002. Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability *Journal of Dairy Science*. 85, 3008-3012. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74386-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74386-5)
- Corona, L., Owens, F. N., Zinn, R. A., 2006. Impact of corn vitreousness and processing on site and extent of digestion by feedlot cattle. *Journal Animal Science*. 84, 3020-3031. <https://doi.org/10.2527/jas.2005-603>
- Cunha, M.V., FOSTER, M.A., 1992. Sugar-Glycerol Cofermentations in Lactobacilli: the Fate of Lactate. *J. Bacteriol.* 174, 1013-1019. <https://doi.org/10.1128/jb.174.3.1013-1019.1992>
- Danner, H., Holzer, M., Mayrhuber, E, Braun, R., 2003. Acetic Acid Increases Stability of Silage under Aerobic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 562-567. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.562-567.2003>

- Davide, L.M.C. Ramalho, M.A.P., Figueiredo, U.J., Souza, J.C. 2010.Ultraestrutura e vitreosidade dos endospermas de milhos tropicais diferindo na textura. *Anais do XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo*, 2010, Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo. CD-Rom.
- Diogénes, L. V., Pereira Filho, J. M., Edvan, R. L., De Oliveira, J. P. F., Nascimento, R. R. D., Santos, E. M., ... & Bezerra, L. R. (2023). Effect of Different Additives on the Quality of Rehydrated Corn Grain Silage: A Systematic Review. *Ruminants*, 3(4), 425-444. <https://doi.org/10.3390/ruminants3040035>
- Drouin, P., Tremblay, J., Chaucheyras-Durand, F., 2019. Dynamic succession of microbiota during ensiling of whole plant corn following inoculation with *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus hilgardii* alone or in combination. *Microorganism*. 7, 595. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120595>
- Drouin, P., da Silva, E. B., Tremblay, J., Chevaux, E., Apper, E., Castex, M., 2023. Inoculation with *Lentilactobacillus buchneri* alone or in combination with *Lentilactobacillus hilgardii* modifies gene expression, fermentation profile, and starch digestibility in high-moisture corn. *Frontiers in Microbiology*. 14, 1253588. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1253588>
- Durães ,HF ,Oliveira ,ERD ,Silva ,JT ,Gandra ,JR ,Teixeira ,RA ,Neves ,NF & ... ,Peixoto ,ELT (2024 ).(Milho reidratado ensilado com diferentes concentrações de protease na dieta de vacas leiteiras :impactos na ingestão ,digestibilidade ,parâmetros ruminais e sanguíneos ,produção e composição do leite. *New Zealand Journal of Agricultural Research* , 1-17.
- Elferink, S. J., Krooneman, J., Gottschal, J. C., Spoelstra, S. F., Faber, F., Driehuis, F., 2001. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 125-132. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.125-132.2001>
- Fabiszewska, A.U., Zielinska, K. J., Wrobel, B., 2019. Trends in designing microbial silage quality by biotechnological methods using lactic acid bacteria inoculants: a minireview. *World Journal of Microbiology. Biotech*. 35, 1-8. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2649-2>

- Fernandes, J., Silva, E.B., Carvalho-Estrada, P.A., Daniel, J.L.P., Nussio, L.G., 2021. Influence of hybrid, moisture, and length of storage on the fermentation profile and starch digestibility of corn grain silages. *Animal Feed Science and Technology* 271, 114707. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114707>
- Ferraretto, L. F., Fredin, S. M., Shaver, R. D., 2015. Influence of ensiling, exogenous protease addition, and bacterial inoculation on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated and high-moisture corn. *Journal of Dairy Science*. 98, 7318-7327. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9891>
- Ferraretto, L. F., Silva Filho, W. I., Fernandes, T., Kim, D. H., Sultana, H., 2018. Effect of ensiling time on fermentation profile and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated corn with or without varied concentrations of wet brewers grains. *Journal of Dairy Science*. 101, 4643-4649. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14329>
- Ferrero, F., Piano, S., Tabacco, E., Borreani, G., 2019.. Effects of conservation period and *Lactobacillus hilgardii* inoculum on the fermentation profile and aerobic stability of whole corn and sorghum silages. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99, 2530-2540. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9463>
- García-Lara, S., Chuck-Hernandez, C., Serna-Saldivar, S.O., 2019. Development and structure of the corn kernel. In: Serna-Saldivar, S.O. (Ed.) *Corn: Chemistry and Technology*. 3. Ed. Duxford: Elsevier Science, p. 147-163. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00006-1>
- Gayral, M., Gaillard, C., Bakan, B., Dalgalarroondo, M., Elmorjani, K., Delluc, C., Marion, D. , 2016. Transition from vitreous to floury endosperm in maize (*Zea mays* L.) kernels is related to protein and starch gradients. *Journal Cereal Science*. 68, 148-154. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.01.013>
- Gomes, A. L., Bueno, A. V., Jacovaci, F. A., Donadel, G., Ferraretto, L. F., Nussio, L. G., Daniel, J. L., 2020. Effects of processing, moisture, and storage length on the fermentation profile, particle size, and ruminal disappearance of reconstituted corn grain. *Journal Animal science*. 98. skaa332. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa332>

- Gomes, A.L.M.G., Bueno, A.V.I., Osmari, M.P., Machado, J., Nússio, L.G., Jobim, C.C., Daniel, J.L.P., 2021 Effects of obligate heterofermentative lactic acid bacteria alone or in combination on the conservation of sugarcane silage. *Frontiers in Microbiology*. 12, 643879, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.643879>
- Henderson, N., 1993. Silage additives. *Animal Feed Science and Technology*. 45, 35-56. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(93\)90070-Z](https://doi.org/10.1016/0377-8401(93)90070-Z)
- Huntington, G. B., 1997. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. *Jornal animal science*. 75, 852-867. <https://doi.org/10.2527/1997.753852x>
- Jacovaci, F. A., Salvo, P. A. R., Jobim, C. C., Daniel, J. L. P., 2021. Effect of ensiling on the feeding value of flint corn grain for feedlot beef cattle: A meta-analysis. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 50, e20200111, 2021. <https://doi.org/10.37496/rbz5020200111>
- Junges, D., Morais, G., Spoto, M. H. F., Santos, P. S., Adesogan, A. T., Nussio, L. G., Daniel, J. L. P., 2017. Influence of various proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. *Jornal of Dairy Science*. 100, 9048-9051. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12943>
- Kljak, K., Darko, G. R. B. E., Darko, A. L. E. U., 2011. Relationships between kernel physical properties and zein content in corn hybrids. *Bull. AUASVM Agric*. 68, 188-194.
- Kung, Jr., L., Schmidt, R. J., Ebling, T. E., Hu, W., 2007. The Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the Fermentation and Aerobic Stability of Ground and Whole High-Moisture Corn. *Jornal of Dairy Science* 90, 2309-2314. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-713>
- L. Kung Jr., Shaver, R. D., Grant, R. J., Schmidt, R. J., 2018. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Jornal of Dairy Science* 101, 4020-4033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>
- Macêdo, S. A. J., Neto, J. M. C., da Silva, M. A., Santos, E. M. 2019. Potencialidades e limitações de plantas forrageiras para ensilagem: Revisão. *Revista Brasileira de higiene e saude animal*. 13, 320-337. <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/55811>

- McDonald, P., Henderson, A. R., Heron, S. J. E. The biochemistry of silage. 2.ed. Madison: Chalcombe, 1991. 340p.
- Mombach, M. A., Pereira, D. H., Pina, D. S., Bolson, D. C., Pedreira, B. C., 2019. Silage of rehydrated corn grain. *Arquivo Brasileiro de medicina veterinaria e Zootecnia*. 71, 959-966. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9676>
- MUCK, R. E. Factors influencing silage quality and their implications for management. *Jornal of Dairy Science*. 71, 2992-3002. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79897-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79897-5)
- Nair, J., Huaxin, N., Andrada, E., Yang, H. E., Chevaux, E., Drouin, P., Wang, Y. Effects of inoculation of corn silage with *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus buchneri* on silage quality, aerobic stability, nutrient digestibility, and growth performance of growing beef cattle. *Jornal Animal Science*. 98, skaa267. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa267>
- Nunes, F.C., Cylene Guimarães, K., Abrão Pessoa, F. O., Pereira Cunha, F., Rafael de Souza Pereira, V. C., do Prado Paim, T., & Bezerra Fernandes, P. (2024). Use of bacterial inoculant in rehydrated corn grain silage. *Journal of Applied Animal Research*, 52(1), 2400534. <https://doi.org/10.1080/09712119.2024.2400534>
- Orskov, E.R.,1986. Starch digestion and utilization in ruminants. *Jornal Animal Science*. 63:1624-1633. <https://doi.org/10.2527/jas1986.6351624x>
- PAES, M. C. D., 2008. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. *Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)*, 1-6.
- Pereira, M. N., Von Pinho, R. G., Bruno, R. G. D. S., Caestine, G. A., 2004. Ruminal degradability of hard or soft texture corn grain at three maturity stages. *Science Agriculture*. 61, 358-363. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162004000400002>
- Philippeau, C., Monredon, F.D., Michalet-Doreau, B., 1999. Relationship Between Ruminal Starch Degradation and the Physical. *Jornal Animal Science*. 77, 238-243. <https://doi.org/10.2527/1999.771238x>

- Pupo, M.R., Ferraretto, L. F., 2023. Effects of laboratory ensiling method, microbial inoculation, and storage length on the fermentation profile and nutrient composition of whole-plant corn silage and high-moisture corn. *Animal Feed Science and Technology*. 306, 115818. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115818>
- Ramos, B. L. P., Pires, A. J. V., Cruz, N. T. ., Santos, A. P. ., Nascimento, L. M. G. ., Santos, H. P., Amorim, J. M. S., 2021. Perdas no Processo de Ensilagem: Uma breve revisão. *Research, Society and Development*10, e8910514660. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14660>
- Ranjit, N. K.; Kung Jr., L., 2000. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Jornal of Dairy Science*. 83, 526-535. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74912-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74912-5)
- Rezende, A. V., Rabelo, C. H., Veiga, R. M., Andrade, L. P., Härter, C. J., Rabelo, F. H., Reis, R. A., 2014. Rehydration of corn grain with acid whey improves the silage quality. *Animal Feed Science and Technology*. 197, 213-221. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.07.009>
- Robutti, J.L., Hoseney, R.C., Wassom, C.E., 1974. Modified opaque-2 corn endosperms. II. Structure viewed with a scanning electron microscope. *Cereal Chem*. 51, 173-180.
- Saylor, B.A., Casale, F., Sultana, H., Ferraretto, L.F., 2020. Effect of microbial inoculation and particle size on fermentation profile, aerobic stability, and ruminal in situ starch degradation of high-moisture corn ensiled for a short period. *Jornal of Dairy Science*. 103, 379-395. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16831>
- Silva, C. M., Amaral, P. N. C. D., Baggio, R. A., Tubin, J. S. B., Conte, R. A., Pivo, J. C. D., Paiano, D., 2016. Stability of high moisture corn silage and corn rehydrated. *Revista Brasileira de Saúde e produção Animal* 17, 331-343. <https://doi.org/10.1590/S1519-99402016000300001>
- Silva, N.C., Nascimento, C.F., Nascimento, F.A., Resende, F.D., Daniel, J.L.P., Siqueira, G.R., 2018. Fermentation and aerobic stability of rehydrated corn grain silage treated with different doses of *Lactobacillus buchneri* or a combination of *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*. *Jornal of Dairy Science*. 101, 4158-4167. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13797>

- Silva, N. C., Nascimento, C. F., Campos, V. M., Alves, M. A., Resende, F. D., Daniel, J. L., & Siqueira, G. R. Influence of storage length and inoculation with *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of high-moisture corn and rehydrated corn grain silage. *Animal Feed Science and Technology*. 251, 124-133. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.03.003>
- Silva, E. B., Smith, M.L., Savage, R.M., Polukis, S.A., Drouin, P., Kung Jr., L., 2020. Effects of *Lactobacillus hilgardii* 4785 and *Lactobacillus buchneri* 40788 on the bacterial community, fermentation and aerobic stability of high-moisture corn silage. *Journal of Applied Microbiology* . 130, 1481-1493. <https://doi.org/10.1111/jam.14892>
- Silva, E.B., Polukis, S.A., Smith, M.L., Voshell, R.S., Leggett, M.J., Jones, P.B., Kung Jr., L., 2024. The use of *Lentilactobacillus buchneri* PJB1 and *Lactiplantibacillus plantarum* MTD1 on the ensiling of whole-plant corn silage, snaplage, and high-moisture corn. *Jornal of Dairy Scienci*. 107, 883-901. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23672>
- Theures, R, C. B., 1986. Grain processing effects on starch utilization by ruminants. *Jornal Animal Science*. 63, 1649-1662. <https://doi.org/10.2527/jas1986.6351649x>
- Velho, J. P., Mühlbach, P. R. F., Genro, T. C. M., Sanchez, L. M. B., Nörnberg, J. L., Orqis, M. G., Falkenberg, J. R., 2006. Changes in chemical composition of maize silages after increasing periods of air exposure at" feed-out". *Ciência Rural*. 36, 916-923. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000300029>
- Xu, A., Qiu, J., Yin, Z., Wei, C., 2019. Morphological characteristics of endosperm in different regions of maize kernels with different vitreousness. *Jornal Cereal Science*. 87, 273-279. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.04.010>
- Wang, Y. L., Wang, W. K., Wu, Q. C., Zhang, F., Li, W. J., Yang, Z. M., Yang, H. J., 2022. The Effect of different lactic acid bacteria inoculants on silage quality, phenolic acid profiles, bacterial community and in vitro rumen fermentation characteristic of whole corn silage. *Fermentation*. 8, 285. <https://doi.org/10.3390/fermentation8060285>

Woolford, M.K., 1990. The detrimental effect of air on silage. Journal of Applied Microbiology . 68, 101-116.

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G., Lebeer, S., 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactocillaceae and Leuconostocaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70, 2782-2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

Capítulo 2- Tipo de endosperma, tempo de fermentação e inoculação bacteriana sobre o perfil de fermentação, estabilidade aeróbia e degradabilidade ruminal *in vitro* de silagem de milho reidratado.

### Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto do tempo de armazenamento e da inoculação microbiana nas características fermentativas, estabilidade aeróbia e degradabilidade ruminal *in vitro* de silagens de milho reidratado, utilizando dois híbridos com diferentes vitreosidades (K9960 e K9606). O estudo foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial ( $2 \times 3 \times 5$ ), considerando dois híbridos, três inoculantes e cinco tempos de fermentação, com quatro repetições por tratamento, e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Os tratamentos incluíram silagem controle (sem aditivo) e inoculada com *Lentilactobacillus hilgardii* e *Lentilactobacillus buchneri* (LHLB) e combinação desses com *Pediococcus pentosaceus* (LHLBPP). Foram utilizados 120 minisilos, avaliados ao longo de cinco tempos de armazenamento (40, 80, 120, 160 e 200 dias). Os resultados mostraram aumento da matéria seca ao longo do tempo de fermentação e redução do pH até 120 dias de armazenamento, com valores mais altos para o tratamento LHLB em todos os períodos avaliados. O híbrido K9960 apresentou maiores valores de proteína bruta e prolaminas, enquanto que os inoculantes promoveram redução significativa no teor de prolaminas ao longo do tempo de armazenamento. Os inoculantes reduziram a produção de etanol, ácido butírico e aumentaram a formação de 1,2-propanodiol nos tratamentos com LHLB e LHLBPP. Além disso, as silagens inoculadas apresentaram maior contagem de bactérias ácido-láticas e maior degradabilidade da matéria seca e orgânica, com diferenças entre os híbridos. Os resultados confirmam que a escolha de inoculantes e híbridos adequados pode melhorar a qualidade fermentativa e a disponibilidade nutricional das silagens de milho reidratado, promovendo maior eficiência na alimentação animal.

Palavras chave: Híbrido, Prolaminas, Ruminante, Vitreosidade.

## Abstract

The objective of this study was to evaluate the impact of storage time and microbial inoculation on the fermentative characteristics, aerobic stability, and in vitro ruminal degradability of rehydrated corn silages, using two hybrids with different vitreousness levels (K9960 and K9606). The study was conducted in a completely randomized design with a factorial arrangement ( $2 \times 3 \times 5$ ), considering two hybrids, three inoculants, and five fermentation times, with four replicates per treatment. Means were compared using Tukey's test. The treatments included control silage (without additive) and silage inoculated with *Lentilactobacillus hilgardii* and *Lentilactobacillus buchneri* (LHLB), as well as their combination with *Pediococcus pentosaceus* (LHLBPP). A total of 120 mini-silos were used and evaluated over five storage periods (40, 80, 120, 160, and 200 days). The results showed an increase in dry matter over the fermentation period and a pH reduction until 120 days of storage, with higher values observed for the LHLB treatment in all evaluated periods. The K9960 hybrid presented higher crude protein and prolamin contents, while the inoculants significantly reduced the prolamin content over the storage period. Inoculants decreased ethanol and butyric acid production while increasing 1,2-propanediol formation in the LHLB and LHLBPP treatments. Additionally, inoculated silages exhibited higher counts of lactic acid bacteria and greater dry matter and organic matter degradability, with differences between hybrids. The results confirm that selecting appropriate inoculants and hybrids can enhance the fermentative quality and nutritional availability of rehydrated corn silages, promoting greater efficiency in animal feeding.

**Keywords:** Hybrid, Prolamins, Ruminant, Vitreousness.

## 1. Introdução

O milho é amplamente reconhecido como o grão mais utilizado em dietas para ruminantes devido à sua elevada concentração de amido, excelente valor energético e disponibilidade ao longo do ano. Esses atributos tornam o milho uma escolha estratégica para atender às demandas nutricionais em sistemas de produção intensiva (Silvestre e Millen, 2021). Entretanto, o armazenamento na forma de grãos secos pode apresentar limitações, como ataque por pragas em armazenamento inadequado e baixa digestibilidade inicial do amido em grão mais vítreos (Lorini et al., 2015; Zurak et al., 2020).

Nesse contexto, a ensilagem de milho reidratado surge como alternativa eficiente, que permite a conservação dos nutrientes, a melhora do perfil fermentativo e a otimização da digestibilidade, especialmente quando associada ao uso de inoculantes bacterianos que potencializam a qualidade da fermentação e a estabilidade aeróbia (Martins et al., 2024; Nunes et al., 2024).

Além dos inoculantes, a interação entre híbridos de milho com características distintas de vitreosidade também exerce influência significativa sobre os parâmetros fermentativos e degradabilidade ruminal. Híbridos de endosperma mais vítreo apresentam menor digestibilidade inicial, devido à barreira física imposta pela matriz proteica que encapsula os grânulos de amido, enquanto híbridos mais farináceos podem favorecer uma fermentação mais rápida (Almeida et al., 2020; Fernandes et al., 2021).

A hipótese deste estudo é que o uso de inoculantes, aliado ao tempo de ensilagem, reduz as diferenças na degradabilidade entre híbridos de milho de alta e baixa vitreosidade, tornando-os semelhantes em termos de digestibilidade para ruminantes.

O objetivo foi investigar os efeitos combinados do tipo de endosperma, tempo de armazenamento e inoculação com *L. hilgardii*, *L. buchneri* e *P. pentosaceus* sobre o perfil fermentativo, a estabilidade aeróbia e a degradabilidade ruminal *in vitro* da silagem de grãos de milho reidratado.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Ensilagem

Dois híbridos de milho (K9960 e K9606, KWS, São Paulo, Brasil) foram obtidos na fazenda Degger, no município de Araguaína, Tocantins, Brasil.

A vitreosidade dos grãos foi determinada através de dissecação manual (Dombrink-Kurtzman e Bietz, 1993; Pereira et al., 2004). Os grãos foram moídos em moinho de martelo (Perozin, Concórdia, SC) com peneira de 2 mm. Cada um dos híbridos foi dividido em 12 pilhas (20 kg pilha<sup>-1</sup>), reidratados com água livre de cloro usando um regador e misturados manualmente para atingirem 370 g kg<sup>-1</sup> de umidade.

Quatro pilhas (repetições) de cada híbrido foram tratadas com um dos três inoculantes a seguir: 1) Controle (sem aditivo); 2) *Lentilactobacillus hilgardii* (H; CNCM I-4785, Lallemand, France) + *Lentilactobacillus buchneri* (B; NCIMB 40788, Lallemand, France) (>3 x 10<sup>11</sup> ufc g<sup>-1</sup>), na dose de 3 x 10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup> de milho reidratado; 3) *Lentilactobacillus hilgardii* + *Lentilactobacillus buchneri* (>2 x 10<sup>11</sup> ufc g<sup>-1</sup>) + *Pediococcus pentosaceus* (P; NCIMB 12455, Lallemand, France) (>1 x 10<sup>11</sup> ufc g<sup>-1</sup>), na dose de 3 x 10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup> de milho reidratado. Os inoculantes foram diluídos em água livre de cloro e aplicados na dosagem recomendada pelo fabricante. Para melhor distribuição do inoculante, eles foram adicionados na água de reidratação.

De cada pilha foram confeccionados cinco mini-silos (tempos de estocagem), compactados com êmbolo de madeira para alcançar a densidade de 850 kg m<sup>-2</sup> de matéria fresca. Os silos foram confeccionados em tubos de PVC, de 40 cm de comprimento e 10 cm de diâmetro, com tampa equipada com uma válvula para liberar os gases. Foram produzidos um total de 120 silos, sendo dois híbridos, três inoculantes e cinco tempos de estocagem (40, 80, 120, 160 e 200 dias), com quatro repetições por tratamento. Após a abertura, o conteúdo de cada silo foi homogeneizado e amostrado para mensuração da composição química e das características fermentativas. Para a abertura de 120 dias, também foram realizadas as mensurações dos produtos da fermentação, contagem microbiana, teste de estabilidade aeróbia e degradabilidade *in vitro*.

## 2.2. Análises químicas

Uma amostra foi pré-seca à 55°C, até peso constante, moídas em moinho tipo Wiley com peneira de 1 mm para análise de matéria seca (MS), cinzas (método 942.05; AOAC, 1990), extrato etéreo (EE) (método 920.39; AOAC, 1990), proteína bruta (PB) (método 954.01; AOAC, 1990) e prolaminas (Nellis et al., 2013).

Foi preparado o extrato aquoso com 30 g da amostra fresca e 270 ml de água destilada, homogeneizados por quatro minutos. O pH foi mensurado em pHmetro digital e o N amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) determinado por meio de destilação com cloreto de cálcio e óxido de magnésio (método 941.04; AOAC, 1990). Nas amostras com 120 dias de estocagem foram determinados os ácidos orgânicos e o etanol por cromatografia líquida de alta performance (HPLC Prominence Shimadzu, Kyoto, Japan) com detector UV modelo SPD-20 e uma coluna Aminex HPX-87H com fase móvel composta por ácido sulfúrico 5 mM em modo isocrático durante 37 min.

A tabela 1 apresenta as análises químicas e microbiológicas realizadas no material original e no material reidratado, antes da ensilagem.

Tabela 1. Vitreosidade do grão, composição química, pH e contagem microbiana da silagem de milho reidratado, não tratado (TC) ou tratado com *L. hilgardii* e *L. buchneri* (LHLB) ou *L. hilgardii*, *L. buchneri* e *P. pentosaceus* (LHLBPP) antes da ensilagem.

Antes da reidratação	K9960			K9606		
Vitreosidade, g kg <sup>-1</sup> de endosperma	685,60			509,00		
PB, g kg <sup>-1</sup> de MS	83,50			74,49		
Prolaminas, g kg <sup>-1</sup> de MS	80,10			64,18		
EE, g kg <sup>-1</sup> de MS	39,80			39,70		
Após a reidratação	TC	LHLB	LHLBPP	TC	LHLB	LHLBPP
MS, g kg <sup>-1</sup> de MN	621,63	616,27	609,48	637,13	628,67	620,71
pH	6,90	6,87	6,81	6,70	6,72	6,60
BAL, log ufc g <sup>-1</sup> silagem fresca	3,91	5,22	5,16	3,97	5,18	5,27
Fungos, log ufc g <sup>-1</sup> silagem fresca	4,23	4,79	4,70	4,85	4,66	4,69

<sup>a</sup> PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; MS = material seca; MN = matéria natural; BAL = bactérias ácido lácticas

### 2.3. Teste de estabilidade aeróbia

Para monitorar a estabilidade aeróbia das amostras estocadas por 120 dias, 1,5 kg de cada silagem foi colocada em baldes plásticos de 8L. Os baldes permaneceram em uma sala com temperatura constante de 25°C por 12 dias. A cada 1 h, a temperatura das silagens era registrada em termômetro digital (tipo espeto) inserido no centro da massa; a temperatura ambiente também foi mensurada em um sensor de temperatura e umidade (HTC-2, Supermedy). A estabilidade aeróbia foi determinada como o número de horas em que as silagens não ultrapassam em 2°C a temperatura ambiente (Ranjik e Kung, 2000). Ainda, aos quatro, oito e 12 dias de avaliação foi retirada uma amostra para determinação do pH.

### 2.4. Análises microbiológicas

No material após o tratamento, antes da ensilagem, e após 120 dias de estocagem foram realizadas as contagens de bactérias ácido lácticas (LAB), leveduras e fungos filamentosos. O extrato aquoso foi preparado com 30 g da amostra fresca e 270 ml de água peptonada estéril, homogêneos por quatro minutos. Foram feitas 10 diluições seriadas e plaqueadas (*pour plate*) em ágar Yeast Extract Glucose Chloramphenicol (YGC, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil), mantidas à 28 °C, por três dias para contagem de leveduras e cinco dias para contagem de fungos filamentosos (Tabacco et al., 2009). O extrato diluído em série também foi plaqueado (*pour plate*) em ágar Man, Rogosa, and Sharpe (MRS, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil), mantidos à 35 °C, por três dias, para contagem de bactérias ácido lácticas (LAB).

### 2.5. Ensaio de produção de gases

O Ensaio de produção de gases foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animal da Universidade Federal do Tocantins sob o número 23.101.002.481/20-15.

Foi realizado um ensaio de produção de gases, de acordo com a metodologia descrita por Maurício et al. (1999). A inoculação foi realizada utilizando líquido ruminal, obtido de múltiplos locais do rúmen, de um bovino adulto mestiço com uma fístula ruminal, recebendo dieta a base de gramíneas dos gêneros *Megathyrsus* e *Urochloa* à vontade e 1,5 kg dia<sup>-1</sup> de milho moído.

A pressão gerada pelos gases acumulados na parte superior dos frascos incubados foi mensurada utilizando-se um transdutor de pressão do tipo SNDWAY SW-512B, com uma agulha de 0,6 mm de diâmetro conectada em sua extremidade, lida em leitor digital e registrada em computador. As leituras foram realizadas nos tempos de dois, quatro, seis, oito, 10, 12, 15, 18, 21 e 24 horas após a incubação. Utilizou-se os dados de pressão em PSI (pressão por polegada quadrada) para o cálculo do volume de gases produzidos através da equação matemática desenvolvida por Feitosa e Souza (2020), para as condições experimentais do Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Ciências Agrárias da UFNT

$$V = -0,0195 + 3,7989P + 0,0174P^2 \quad (R^2 = 0,9875)$$

Em que: V = Volume (mL); P = Pressão (PSI)

Os resíduos remanescentes nos frascos de fermentação após 24h foram filtrados em cadinhos de vidro de porosidade 01, à vácuo. Os resíduos foram secos em estufa a 105 °C e pesados, e, em seguida, foram incinerados em mufla a 500 °C e pesados. Os resultados foram utilizados para os cálculos das degradabilidades da matéria seca e da matéria orgânica.

Os dados de produção acumulada de gases foram ajustados para o modelo de Gompertz.

$$V_T = V_F \times \exp(-b \exp(-k \times t))$$

Em que: V<sub>t</sub> = volume de gases acumulado no tempo; V<sub>f</sub> = volume total de gases produzido; b = parâmetro de formação, sem interpretação biológica; k = taxa específica de produção de gases; t = tempo de fermentação

Calcularam-se as degradabilidades efetivas da matéria seca para as taxas de passagem de 2, 5 e 8% h<sup>-1</sup>, correspondendo ao baixo, médio e alto consumo, conforme Agricultural Research Council (1984). Empregou-se a equação proposta por France et al. (1993).

$$DE = S_0 e^{-kT} (1 - kI) / (S_0 + U_0)$$

Em que: DE = degradabilidade efetiva da matéria seca (%); S<sub>0</sub> = fração degradável presente no tempo zero; k = taxa de passagem (%/h); T = Tempo de colonização (lag time); I = integral não analítica derivada numericamente; U<sub>0</sub> = fração não degradável presente no tempo zero

## 2.6. Análises estatísticas

Os dados de perfil de fermentação foram analisados em um delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 3 x 5, através do Programa SISVAR<sup>®</sup> (versão 5.6). O modelo incluiu o efeito fixo dos híbridos (H: = K9960 ou K9606), dos inoculantes (I = TC, LHLB ou LHLBPP), do tempo (T = 40, 80, 120, 160 e 200 dias) e suas interações (H x I; H x T; I x T; H x I x T).

As análises de estabilidade aeróbia, microbiológicas e de ácidos orgânicos, realizadas aos 120 dias de fermentação, foram analisadas em um delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 3, através do Programa SISVAR<sup>®</sup> (versão 5.6). O modelo incluiu o efeito fixo dos híbridos (H: = K9960 ou K9606), dos inoculantes (I = TC, LHLB ou LHLBPP) e sua interação (H x I). As médias foram comparadas pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ). No ensaio de produção de gás, as curvas de produção de gás foram avaliadas quanto ao paralelismo e identidade ( $p < 0,05$ ) (Regazzi e Silva, 2004). A DMS e DMO foram analisadas em um delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 3 x 2, através do Programa SISVAR<sup>®</sup> (versão 5.6). O modelo incluiu o efeito fixo dos híbridos (H: = K9960 ou K9606), dos inoculantes (I = TC, LHLB ou LHLBPP), do tempo (T = zero e dias) e suas interações (H x I; H x T; I x T; H x I x T).

## 3. Resultados

### 3.1. Características químicas e perfil fermentativo

Observou-se aumento dos teores de matéria seca ( $p = 0,0002$ ) ao longo do tempo de fermentação. O pH das silagens reduziu até 120 dias de estocagem ( $p < 0,0001$ ), independentemente do híbrido ou do inoculante utilizado. O inoculante LHLB produziu silagens com maiores valores de pH ( $p < 0,0001$ ) em todos os períodos avaliados (Tabela 2).

O híbrido K9960 apresentou maiores valores de PB em todos os tempos de ensilagem ( $p < 0,0001$ ). Houve redução aos 160 dias e aumento aos 200 dias dos teores de PB em todos os tratamentos avaliados. O uso dos inoculantes não influenciou os valores de PB ( $p = 0,5359$ ) (Tabela 2).

Houve interação entre híbrido, inoculante e tempo de ensilagem para os valores de prolaminas ( $p < 0,0001$ ) e amônia ( $p = 0,0012$ ) (Tabela 2). De forma geral, maiores valores de prolaminas foram observados para o híbrido K9960 ( $p < 0,0001$ ) e para o tratamento sem inoculante ( $p < 0,0001$ ); ao longo do tempo observou-se redução dos teores de prolaminas ( $p < 0,0001$ ). Os teores de amônia foram maiores para o híbrido K9960 ( $p < 0,0001$ ) e para o inoculante LHLB ( $p < 0,0001$ ) e aumentaram ao longo da fermentação ( $p < 0,0001$ ).

Tabela 2. Composição química das silagens de milho reidratado a partir dos híbridos K9960 e K9606, de acordo com o tipo de inoculante e o tempo de estocagem.

		MS, g kg <sup>-1</sup> de MN	pH	PB g kg <sup>-1</sup> de MS	Prolaminas g kg <sup>-1</sup> de MS	NH <sub>3</sub> , g kg <sup>-1</sup> de MS	Cinzas g kg <sup>-1</sup> de MS
	TC	614,26	4,60	84,41	45,53	0,48	11,26
40d	K9960 LHLB	619,68	4,87	85,50	47,53	0,56	9,80
	LHLBPP	605,17	4,61	85,61	51,95	0,41	11,51
	TC	615,65	4,63	68,94	37,09	0,46	12,71
K9606	LHLB	610,24	4,81	71,53	35,85	0,52	12,56
	LHLBPP	618,72	4,52	74,11	37,50	0,42	13,60
	TC	611,03	4,10	85,43	50,13	0,58	11,03
80d	K9960 LHLB	616,65	4,42	82,79	42,75	0,71	10,60
	LHLBPP	611,84	4,18	89,24	44,46	0,61	10,53
	TC	618,80	4,15	73,52	33,24	0,63	13,86
K9606	LHLB	622,85	4,40	79,89	26,32	0,65	12,55
	LHLBPP	618,65	4,09	72,87	26,64	0,60	14,13
	TC	617,29	3,56	85,49	44,33	0,96	11,67
K9960	LHLB	612,43	3,92	82,86	30,18	1,14	11,21
	LHLBPP	611,33	3,64	87,05	29,99	0,95	11,54
	TC	624,25	3,60	76,96	25,80	0,86	15,35
K9606	LHLB	609,28	3,90	72,10	13,49	1,02	12,43
	LHLBPP	632,87	3,59	72,79	17,52	0,87	13,48

	TC	613,96	3,64	73,46	47,54	0,61	15,67
160d	K9960 LHLB	613,86	3,95	68,83	24,82	0,91	11,19
	LHLBPP	609,91	3,71	72,78	22,94	0,78	13,39
	TC	626,82	3,62	62,46	20,44	0,69	14,67
K9606	LHLB	618,54	3,94	58,32	19,96	0,82	12,98
	LHLBPP	625,03	3,67	58,76	10,29	0,71	14,43
	TC	618,99	3,62	93,45	27,56	0,95	12,13
200d	K9960 LHLB	623,77	3,95	103,90	12,78	1,37	10,37
	LHLBPP	624,18	3,69	98,76	12,81	1,18	10,19
	TC	625,57	3,62	95,58	24,87	0,99	13,24
K9606	LHLB	627,42	3,93	87,64	16,94	1,16	12,72
	LHLBPP	643,30	3,65	99,45	16,92	0,96	13,62
	EPM	3,0136	0,0261	0,9837	0,4932	0,0058	0,1722
	H	<0,0001	0,0364	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	I	0,4849	<0,0001	0,5359	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	T	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<i>P</i> <i>valor</i>	H x I	0,0042	0,0074	0,7725	0,0004	<0,0001	0,4026
	H x T	0,5337	0,9382	0,2565	<0,0001	<0,0001	0,0643
	I x T	0,1191	0,1523	0,8518	<0,0001	<0,0001	0,2370
	H x I x T	0,7980	0,8294	0,1670	<0,0001	0,0012	0,1695

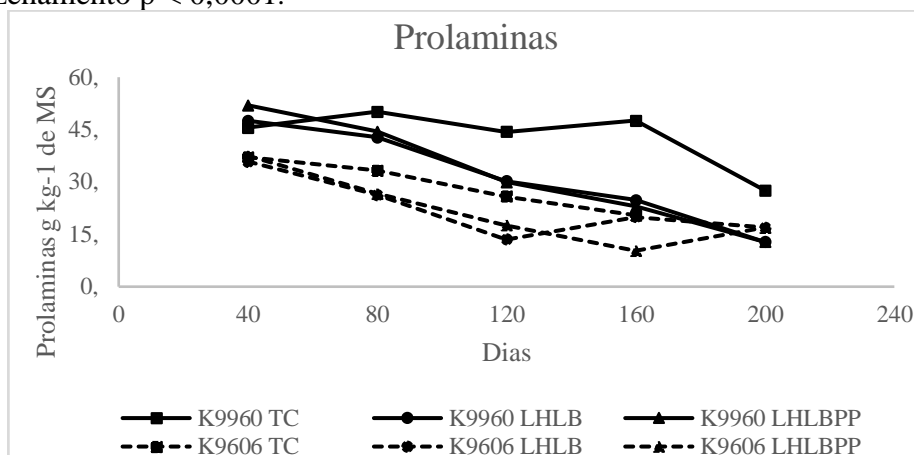
MS = Matéria seca; PB = proteína bruta; NH<sub>3</sub> = amônia; TC = tratamento controle; LHLB = *L. hilgardii* e *L. buchneri*; LHLBPP = *L. hilgardii*, *L. buchneri* e *P. pentosaceus*; H = efeito do tipo híbrido; I = efeito do inoculante; T = efeito do tempo de armazenamento; H × I = interação do tipo híbrido e o inoculante; H × T = interação do tipo híbrido e tempo de armazenamento; I × T = interação entre o inoculante e tempo de armazenamento; H × I × T = interação do tipo híbrido, inoculante e tempo de armazenamento

A figura 1 mostra que a concentração de prolaminas reduziu ao longo do tempo de armazenamento, em todos os tratamentos. O híbrido de maior vitreosidade (K9960) apresentou concentrações iniciais mais elevadas e a redução ao longo do tempo foi mais pronunciada nos tratamentos inoculados ( $p < 0,0001$ ). Esse efeito demonstrou que o uso dos inoculantes acelerou a

quebra das prolaminas, o que pode favorecer a disponibilidade de proteínas solúveis e do amido ao longo do tempo de ensilagem.

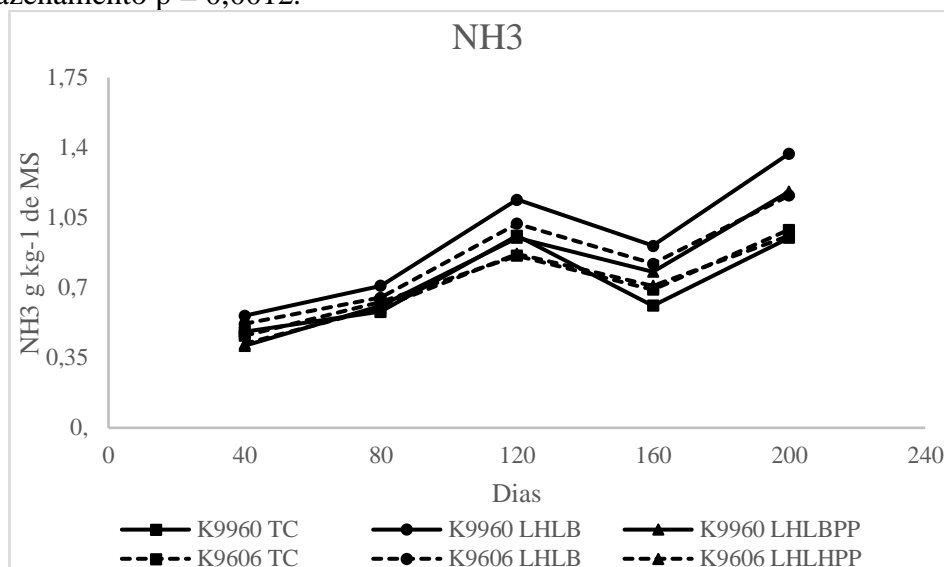
O tratamento com a combinação de *L. buchneri*, *L. hilgardii* e *P. pentosaceus* (LHLBPP) apresentou o maior efeito na redução da concentração de prolaminas, especialmente após 120 dias de armazenamento. Já os tratamentos controle mantiveram níveis mais elevados de prolaminas ao longo do período.

Figura 1. Concentração de prolaminas ( $\text{g kg}^{-1}$  de MS) em silagens de milho reidratado produzidas com híbridos de alta (K9960) e baixa (K9606) vitreosidade, sem inoculante (TC - controle) e com tratamentos contendo *Lactobacillus hilgardii* e *Lactobacillus buchneri* (LHLB), isolados ou combinados com *Pediococcus pentosaceus* (LHLBPP). EPM = 0,4932. Efeito de inoculante,  $p < 0,0001$ ; Efeito do híbrido,  $p < 0,0001$ ; efeito do tempo de armazenamento,  $p < 0,0001$ ; interação entre inoculante e tempo de armazenamento,  $p < 0,0001$ ; interação entre híbrido e inoculante  $p < 0,0001$ ; interação entre híbrido e tempo de armazenamento  $p < 0,0001$ ; interação entre híbrido, inoculante e tempo de armazenamento  $p < 0,0001$ .



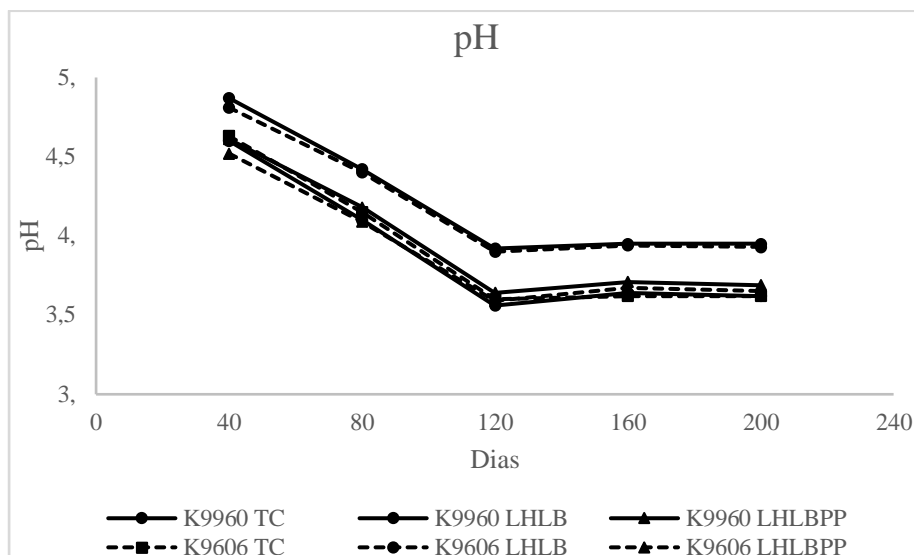
Houve um aumento progressivo das concentrações de  $\text{NH}_3$  ao longo do tempo, com picos em torno de 120 e 200 dias (figura 2). A liberação de  $\text{NH}_3$  foi influenciada pelo tempo de armazenamento ( $p < 0,0001$ ) e pelo tipo de inoculante utilizado ( $p < 0,0001$ ). Os tratamentos inoculados apresentaram maior liberação de  $\text{NH}_3$  do que o controle, sugerindo uma intensificação da proteólise mediada pela ação microbiana. O maior acúmulo de  $\text{NH}_3$  foi observado nos tratamentos contendo *L. buchneri* e *L. hilgardii* (LHLB), indicando maior atividade proteolítica ao longo da fermentação.

Figura 2. Concentração de amônia ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{g kg}^{-1}$  de MS) em silagens de milho reidratado produzidas com híbridos de alta (K9960) e baixa (K9606) vitreosidade, sem inoculante (TC - controle) e com tratamentos contendo *Lactobacillus hilgardii* e *Lactobacillus buchneri* (LHLB), isolados ou combinados com *Pediococcus pentosaceus* (LHLBPP). EPM = 0,0058 Efeito de inoculante,  $P < 0,0001$ ; Efeito do híbrido,  $p < 0,0001$ ; efeito do tempo de armazenamento,  $p < 0,0001$ ; interação entre inoculante e tempo de armazenamento,  $p < 0,0001$ ; interação entre híbrido e inoculante  $p < 0,0001$ ; interação entre híbrido e tempo de armazenamento  $p < 0,0001$ ; interação entre híbrido, inoculante e tempo de armazenamento  $p = 0,0012$ .



Houve uma redução acentuada do pH nos primeiros 120 dias de ensilagem, seguida de uma estabilização posterior (Figura 3). Os maiores valores de pH foram registrados nos tratamentos inoculados, especialmente no tratamento contendo *L. buchneri* e *L. hilgardii* (LHLB). Esse resultado pode estar associado à maior conversão de ácido lático em ácido acético e 1,2-propanodiol promovida por esses microrganismos, uma vez que o ácido acético é um ácido mais fraco em comparação ao ácido lático, resultando em um pH final mais elevado. No tratamento LHLBPP, a presença de *Pediococcus pentosaceus* favoreceu uma maior produção de ácido lático, mesmo na presença de *L. hilgardii* e *L. buchneri*, o que pode ter contribuído para um menor aumento do pH em relação ao LHLB.

Figura 3. Valores de pH em silagens de milho reidratado produzidas com híbridos de alta (K9960) e baixa (K9606) vitreosidade, sem inoculante (TC - controle) e com tratamentos contendo *Lactobacillus hilgardii* e *Lactobacillus buchneri* (LHLB), isolados ou combinados com *Pediococcus pentosaceus* (LHLBPP). EPM = 0,0261. Efeito de inoculante,  $P < 0,0001$ ; Efeito do híbrido,  $p = 0,0364$ ; efeito do tempo de armazenamento,  $p < 0,0001$ ; interação entre inoculante e tempo de armazenamento,  $p = 0,1523$ ; interação entre híbrido e inoculante  $p = 0,0074$ ; interação entre híbrido e tempo de armazenamento  $p = 0,9382$ ; interação entre híbrido, inoculante e tempo de armazenamento  $p = 0,8294$ .



Os teores de ácido lático não foram influenciados pela aplicação de inoculantes ( $p = 0,9256$ ) ou híbrido ( $p = 0,0712$ ). No entanto, os valores de ácido acético foram superiores para o híbrido K9960 em comparação ao K9606 ( $p < 0,0001$ ), havendo também quantidades superiores no tratamento LHLB ( $p < 0,0001$ ). Observou-se uma interação entre o híbrido e o inoculante para a produção de ácido acético ( $p < 0,0001$ ). Adicionalmente, as silagens inoculadas apresentaram uma menor concentração de ácido butírico ( $p = 0,0001$ ) e uma maior produção de 1,2-propanodiol nas formulações contendo *L. hilgardii* e *L. buchneri* (LHLB) e a combinação *L. hilgardii*, *L. buchneri* e *P. pentosaceus* (LHLBPP) (Tabela 3).

A produção de etanol foi reduzida nas silagens tratadas com inoculantes em relação ao controle ( $p = 0,0015$ ). Os teores de ácido isovalérico foram semelhantes independente do tratamento ( $p = 0,0676$ ). (Tabela 3)

No que diz respeito à contagem de bactérias ácido-láticas, as silagens inoculadas com LHLB apresentaram teores maiores ( $p < 0,0001$ ). Por outro lado, não houve diferenças na contagem de

fungos entre os híbridos ( $p=0,9082$ ) ou entre os tratamentos com e sem inoculante ( $p = 0,4861$ )

(Tabela 3).

Tabela 3.

Ácidos orgânicos, contagem microbiana e de estabilidade aeróbia de silagens de milho reidratado aos 120 dias de ensilagem, a partir dos híbridos K9960 e K9606 e contendo diferentes inoculantes microbianos.

		Ácido lático	Ácido acético	Ácido butírico	Ácido isovalérico	1,2 Propanodiol	Etanol	BAL, log ufc g <sup>-1</sup>	Fung os	AS, h
	TC	6,32	5,65	6,24	1,29	1,22	5,95	3,20	1,97	288
K9960	LHLB	6,67	2,17	2,06	0,95	1,97	4,07	8,06	1,41	288
	LHLBPP	4,33	1,99	1,70	1,12	2,54	3,70	7,15	1,21	288
	TC	7,23	1,64	2,45	1,06	1,36	4,67	6,28	1,16	288
K9606	LHLB	6,94	2,13	1,80	0,98	3,36	4,16	7,70	1,76	288
	LHLBPP	8,47	1,55	1,25	0,96	3,61	3,98	5,72	1,70	288
	EPM	0,2366	0,1725	0,3126	0,0479	0,2407	0,2071	0,0690	-	0
	H	0,0712	< 0,0001	0,0032	0,0874	0,0202	0,1109	0,1117	0,90 82	-
<i>P</i>	- I	0,9256	< 0,0001	0,0001	0,0676	0,0012	0,0015	< 0,0001	0,48 61	-
<i>valor</i>	H x I	0,2141	< 0,0001	0,0066	0,3081	0,3177	0,1704	< 0,0001	< 0,00 01	-

Ácido lático CV = 33,96%; Ácido acético CV = 23,70%; Ácido butírico CV = 41,93%; Ácido Isovalérico CV = 15,70%; 1,2 Propanodiol CV = 35,55%; Etanol CV = 16,23%

3.2 Degradabilidade ruminal *in vitro*

Tabela 4.

Volume de gases acumulado no tempo (A), taxa específica de produção de gases (k) e tempo de colonização (*lag time*) das silagens de milho reidratado antes e aos 120 dias de ensilagem, a partir dos híbridos K9960 e K9606 e contendo diferentes inoculantes microbianos.

			A, ml	k (ml/g MS/h)	<i>lag time</i> , h	R <sup>2</sup>
0d	K9960	TC	217,70	0,1117	3,90	0,9938
		LHLB	239,50	0,1074	3,45	0,9968
		LHLBPP	202,40	0,1226	3,15	0,9942
	K9606	TC	207,80	0,1305	4,19	0,9932
		LHLB	196,90	0,1539	3,21	0,9965
		LHLBPP	187,70	0,1490	3,32	0,9907
120d	K9960	TC	250,60	0,1263	4,22	0,9965
		LHLB	211,50	0,1594	4,52	0,9960
		LHLBPP	221,30	0,1589	4,95	0,9961
	K9606	TC	224,60	0,1552	3,82	0,9954
		LHLB	233,00	0,1702	4,35	0,9981
		LHLBPP	245,50	0,1795	4,44	0,9963

TC = tratamento controle; LHLB = *L. hilgardii* e *L. buchneri*; LHLBPP = *L. hilgardii*, *L. buchneri* e *P. pentosaceus*

O híbrido K9606 apresentou maiores valores de degradabilidade da matéria seca (DMS) e da matéria orgânica (DMO) em comparação ao K9960 ( $p < 0,0001$ ). Além disso, as silagens inoculadas apresentaram maior DMS e DMO em relação ao controle ( $p < 0,0001$ ). No entanto, não foi observada interação entre o tempo de armazenamento e o tipo de híbrido ( $p = 0,1563$ ). Por outro lado, houve interação entre inoculante e o tempo de armazenamento para os valores de DMS ( $p = 0,0023$ ), indicando que o efeito do inoculante varia de acordo com o período de armazenamento.

Tabela 5. Degradabilidade da matéria seca (DMS), degradabilidade da matéria orgânica (DMO) e degradabilidades efetivas (DE) das silagens de milho reidratado antes e aos 120 dias de ensilagem, a partir dos híbridos K9960 e K9606 e contendo diferentes inoculantes microbianos.

		DMS, g/kg de MS	DMO, g/kg de MO	DE 2%/h, g kg <sup>-1</sup> de MS	DE 5%/h, g kg <sup>-1</sup> de MS	DE 8%/h, g kg <sup>-1</sup> de MS	
0d	TC	81,93	83,25	804,28	761,80	719,01	
	K9960	LHLB	81,27	82,28	794,83	752,56	710,01
		LHLBPP	81,95	82,86	801,07	759,45	717,51
		TC	85,36	85,92	830,95	788,30	745,30
	K9606	LHLB	87,69	88,58	857,73	815,27	772,39
		LHLBPP	87,04	88,34	855,16	812,50	769,43
120d	TC	88,09	89,02	860,75	816,28	771,46	
	K9960	LHLB	91,31	92,41	895,01	851,07	806,69
		LHLBPP	90,80	91,92	890,25	846,51	802,34
		TC	91,54	92,60	896,63	852,33	807,59
	K9606	LHLB	95,49	96,42	934,38	889,28	843,69
		LHLBPP	95,32	96,38	939,71	895,00	849,78
<i>p</i> - Valor	H	< 0,0001	< 0,0001	-	-	-	
	I	< 0,0001	< 0,0001	-	-	-	
	T	< 0,0001	< 0,0001	-	-	-	
	H x I	0,0622	0,0295	-	-	-	
	H x T	0,1563	0,2319	-	-	-	
	I x T	0,0023	0,0032	-	-	-	
	H x I x T	0,3412	0,1523	-	-	-	

TC = tratamento controle; LHLB = *L. hilgardii* e *L. buchneri*; LHLBPP = *L. hilgardii*, *L. buchneri* e *P. pentosaceus*;

Fig. 4 Cinética de fermentação de silagens de milho reidratado aos 120 dias de ensilagem, a partir dos híbridos K9960 e K9606 e contendo diferentes inoculantes microbianos.

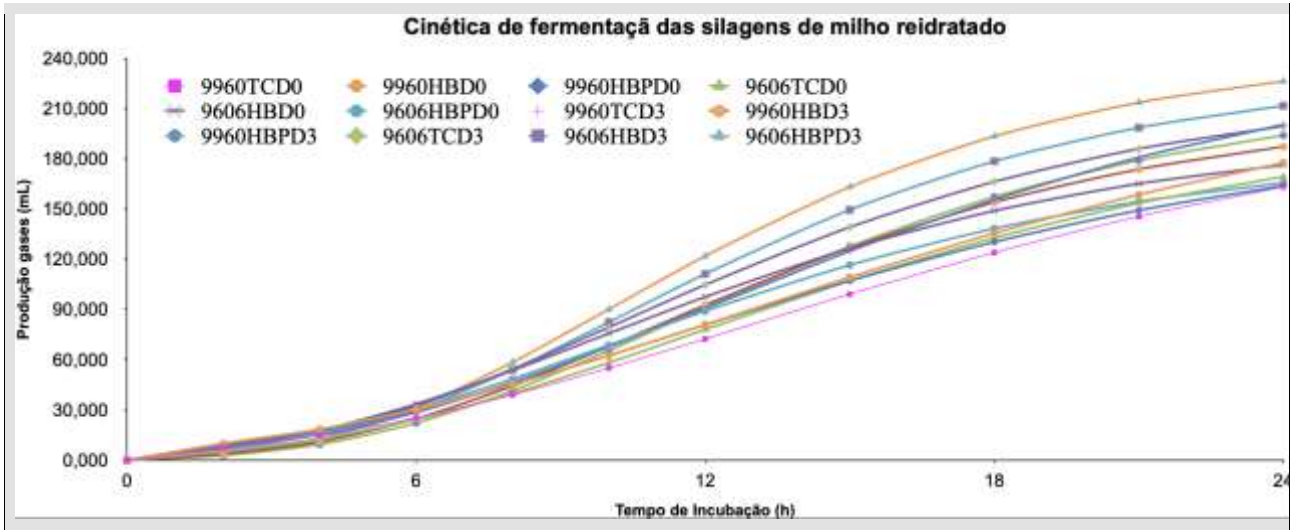


Fig. 5 Cinética de fermentação de silagens de milho reidratado aos 120 dias de ensilagem.

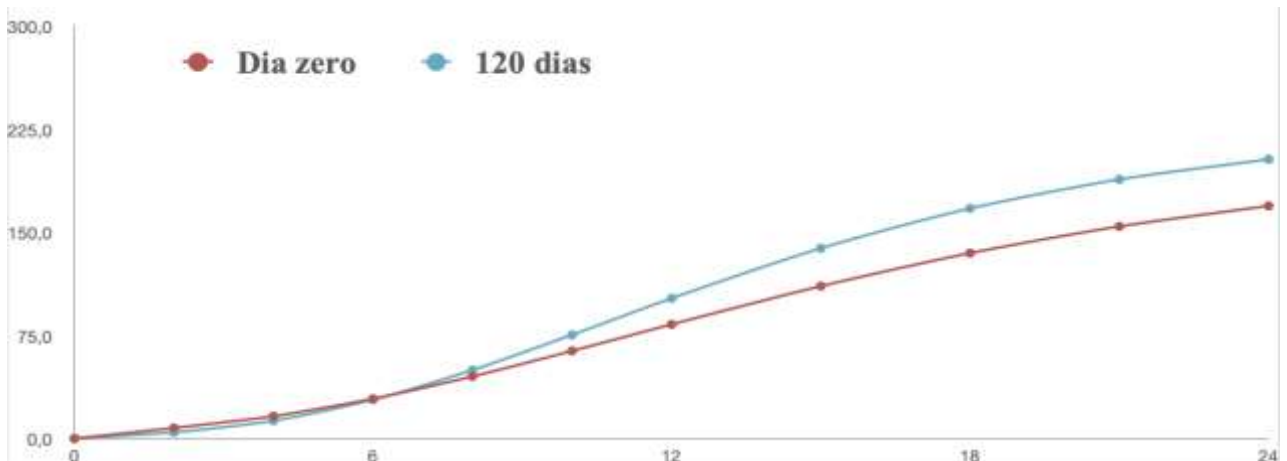


Fig. 6 Cinética de fermentação de silagens de milho reidratado a partir dos híbridos K9960 e K9606

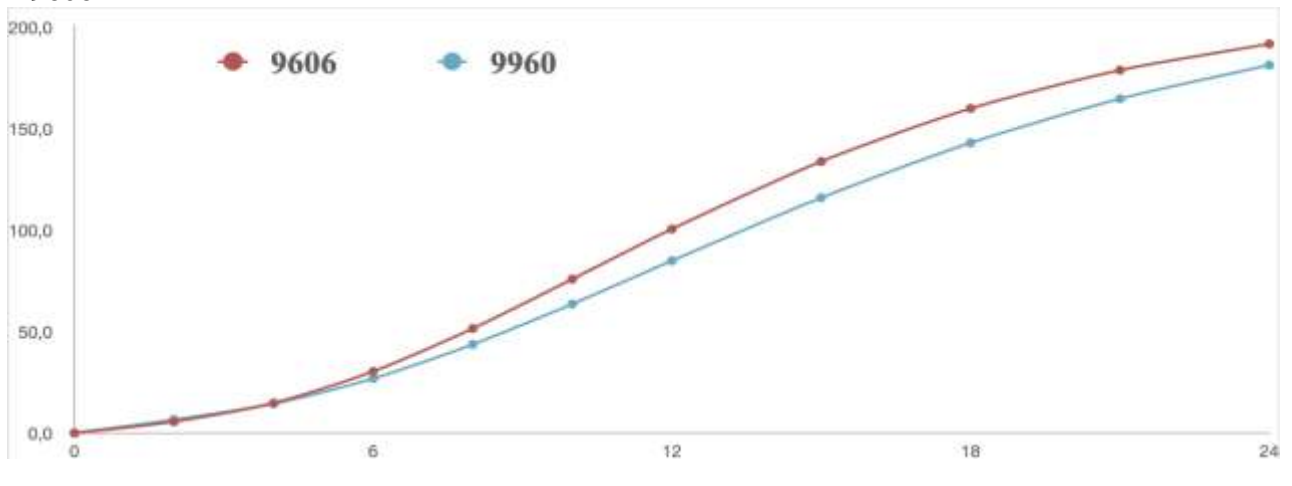
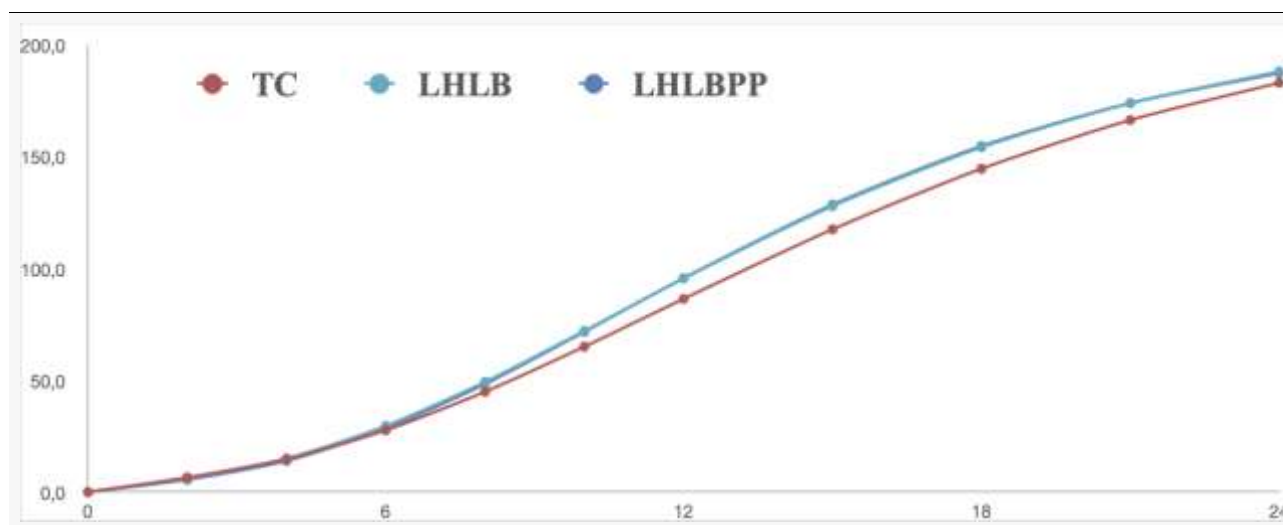


Fig. 7 Cinética de fermentação de silagens de milho reidratado contendo diferentes inoculantes microbianos



Os resultados do teste de paralelismo de curvas demonstraram diferenças entre o dia 0 e 120 dias de ensilagem ( $p < 0,05$ ), confirmando o impacto do tempo de armazenamento na produção cumulativa de gases. Aos 120 dias, a maior produção acumulativa de gases reflete o avanço na fermentação, com maior degradação da matriz proteica e liberação de substratos fermentáveis ao longo do tempo. Além disso, os híbridos apresentaram respostas distintas, com o híbrido K9606 mostrando maior produção cumulativa de gases em comparação ao K9960 ( $p < 0,05$ ), indicando diferenças intrínsecas na composição estrutural e disponibilidade de substratos fermentáveis. Os tratamentos inoculados também se destacaram em relação ao controle, com maior produção acumulativa de gases, indicando que a inoculação promoveu uma fermentação mais eficiente e ativa. No entanto, os tratamentos inoculados foram similares entre si, sugerindo que tanto o LHLB quanto a combinação LHLBPP tiveram efeitos comparáveis na dinâmica de fermentação ( $p < 0,05$ ).

Tabela 6. Teste de paralelismo e identidade de curvas<sup>d</sup> de produção de gases em 24 h de silagens de milho reidratado aos 120 dias de ensilagem (1a), a partir dos híbridos K9960 e K9606 (1b) e contendo diferentes inoculantes microbianos (1c)

Figura	Tratamentos	Paralelismo	Identidade
1a)	Dia 0	a	B
	Dia 120	a	A
1b)	K9960	a	B
	K9606	a	A
1c)	TC	a	B
	LHLB	a	A
	LHLBPP	a	A

TC = tratamento controle; LHLB = *L. hilgardii* e *L. buchneri*; LHLBPP = *L. hilgardii*, *L. buchneri* e *P. pentosaceus*; <sup>d</sup>Regazzi e Silva (2004) (p<0,05)

#### 4. Discussão

##### 4.1. Características químicas e perfil fermentativo

A vitreosidade dos híbridos *flint* geralmente varia entre 668,0 e 791,0 g kg<sup>-1</sup> de endosperma, enquanto nos híbridos dentados esse valor fica entre 385,0 e 573,0 g kg<sup>-1</sup> (Philippeau et al., 1999). Com base nesses intervalos, o híbrido K9960, que apresentou vitreosidade de 685,6 g kg<sup>-1</sup>, pode ser classificado como *flint*, enquanto o híbrido K9606, com 509,0 g kg<sup>-1</sup>, se enquadra na categoria dos híbridos dentados.

Ao longo do período de ensilagem, os teores de matéria seca (MS) apresentaram um comportamento crescente, conforme observado nos tratamentos avaliados. Esse comportamento está associado à perda gradual de umidade do material durante a fermentação, devido à liberação de efluentes e à degradação de substratos fermentáveis (Borreani et al., 2018). Valores apresentados de MS durante todo o período de ensilagem está dentro do intervalo esperado (600 a 700 g kg<sup>-1</sup>) indicando que as condições de fermentação foram apropriadas e estão alinhadas com os padrões indicados na literatura, como os de Carvalho et al. (2020) e Mombach et al. (2019), que destacaram

a importância de níveis de umidade adequados no momento da ensilagem para evitar fermentações indesejáveis.

A redução do pH das silagens até 120 dias de estocagem, independentemente do híbrido ou inoculante, indica que o processo fermentativo foi eficiente em todos os tratamentos. Esse decréscimo no pH indica a estabilização do ambiente anaeróbico e a consolidação da fase de fermentação, favorecendo a preservação da silagem (Silva et al., 2016).

Os valores mais elevados de pH observados nas silagens inoculadas com LHLB podem ter ocorrido devido à conversão de ácido láctico em ácidos mais fracos, como o ácido acético e o 1,2-propanodiol, característica típica de bactérias heterofermentativas (Oude Elferink et al., 2001). Entretanto, nesta condição experimental, os teores de ácido acético não foram mais elevados nos tratamentos inoculados, sugerindo a possibilidade de uma flora epifítica nativa que contribuiu para a produção desse ácido mesmo no controle. Esse fenômeno pode ter influenciado diretamente a estabilidade aeróbia observada no controle, além de justificar o não crescimento de fungos nesse tratamento.

No tratamento LHLBPP, o menor valor de pH pode ser atribuído ao fato de *Pediococcus pentosaceus* ser uma bactéria homofermentativa obrigatória, caracterizada pela produção predominante de ácido láctico durante a fermentação. Essa característica resulta em uma menor quantidade de ácidos fracos, como o acético, uma vez que esses compostos estão associados à fermentação heterofermentativa (Jiang et al., 2020).

Os teores de ácido láctico, principal responsável pela estabilização inicial do pH na ensilagem, não diferiram entre os tratamentos, evidenciando que a fermentação até a abertura de 120 dias ocorreu de maneira semelhante independente do inoculante utilizado.

Houve uma interação significativa entre híbrido e inoculante para a produção de ácido acético. No híbrido K9906, os inoculantes apresentaram maiores concentrações desse ácido em relação ao K9606. Esse resultado indica que o efeito dos inoculantes na produção de ácido acético foi mais expressivo no híbrido K9960, possivelmente devido a diferenças na composição estrutural dos grãos

e na fermentação dos carboidratos. Além disso, a produção de 1,2-propanodiol foi superior nos tratamentos inoculados, confirmando a ação do *Lentilactobacillus hilgardii* e do *Lentilactobacillus buchneri*, especialmente no híbrido K9606 com LHLB e LHLBPP. Essa produção é característica de um metabolismo heterofermentativo, que melhora a estabilidade aeróbia da silagem ao inibir o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes (Oude Elferink et al., 2001; Nair et al., 2022).

A concentração de ácido butírico, associado à presença de clostrídios e fermentações indesejáveis (Siemerink et al., 2011), foi menor nas silagens tratadas com inoculante, indicando controle mais eficiente do processo fermentativo nesses tratamentos. Além disso, a redução da produção de etanol nas silagens inoculadas, pode estar relacionado à maior participação da via do 2,3-butanodiol, uma rota metabólica que se torna relevante quando a produção de etanol e ácido láctico é reduzida. Nessa via, compostos como 2,3-butanodiol atuam como aceitadores alternativos de elétrons, diminuindo a formação de etanol durante a fermentação (Daniel et al., 2013).

As contagens de bactérias ácido-láticas foram significativamente maiores nas silagens tratadas com LHLB, evidenciando o sucesso na colonização do substrato por microrganismos benéficos (Eikmeyer et al., 2013; Valle et al., 2024). Apesar dessas melhorias, as contagens de fungos não diferiram entre os híbridos ou inoculantes. Esse resultado pode ser atribuído ao tempo de abertura analisado, de 120 dias, período em que pode ter ocorrido o equilíbrio necessário para atingir quantidade de ácidos orgânicos antifúngicos em todos os tratamentos (Scuderi et al., 2023).

Os maiores valores de PB encontrados no híbrido K9960 podem estar relacionados à composição genética deste híbrido, que apresenta maior conteúdo proteico intrínseco (Rossi et al., 2016). A variação nos teores de PB ao longo do tempo com redução aos 160 dias e aumento aos 200 dias reflete as dinâmicas da fermentação e os processos de degradação e síntese proteica na silagem. Essa oscilação pode estar relacionada à transformação das proteínas em compostos nitrogenados mais simples, como nitrogênio amoniacal, durante as etapas de ensilagem. Esse comportamento pode ser influenciado pelo metabolismo microbiano e pela composição original do material ensilado,

destacando a complexidade do processo fermentativo e a interação entre fatores bioquímicos e estruturais no ambiente anaeróbico da silagem (Jungles et al., 2017; Gomes et al., 2020).

A relação entre os teores de nitrogênio amoniacal e a redução das prolaminas ao longo do tempo de fermentação reflete a interação entre a proteólise e o metabolismo microbiano durante a ensilagem. A proteólise, que envolve a quebra de proteínas estruturais, como as prolaminas (particularmente as zeínas), leva à liberação de nitrogênio em formas mais simples, como o nitrogênio amoniacal, contribuindo para o aumento desse composto ao longo do período de armazenamento (Baron et al., 1986; Diogenes et al., 2023). Além disso, a inoculação também potencializa o aumento de nitrogênio amoniacal, como observado nos tratamentos inoculados com LHLB e LHLBPP, evidenciando a influência dos microrganismos adicionados na intensificação desse processo durante a fermentação (Ferraretto et al., 2015).

No ambiente ruminal, esse aumento na disponibilidade de nitrogênio solúvel pode ter impacto positivo. Uma vez que, o maior teor de nitrogênio amoniacal pode favorecer a síntese de proteína microbiana, desde que haja um suprimento adequado de energia fermentável para otimizar a captura desse nitrogênio pelos microrganismos ruminais (Marques et al., 2024).

A redução dos teores de prolaminas ao longo do armazenamento pode ser explicada pela ação combinada das enzimas endógenas do milho e das bactérias lácticas (Jungles et al., 2017). O híbrido K9960, que apresentou maiores valores iniciais de prolaminas, sugere uma maior presença de proteínas zeínicas que encapsulam o amido no grão de milho. Esse fator pode dificultar a digestibilidade inicial (Correa et al., 2002) mas, ao longo do tempo, os inoculantes contribuíram para a degradação dessas proteínas. O tratamento sem inoculante apresentou maiores valores de prolaminas, reforçando que os tratamentos com inoculantes, como LHLB e LHLBPP, aceleram a quebra das proteínas, promovendo maior acessibilidade do amido e melhorando a qualidade nutricional da silagem ao longo do tempo (Silva et al., 2018). Esse efeito pode estar relacionado à ação dos microrganismos proteolíticos e das proteases vegetais, cuja atividade pode ter sido facilitada pelo aumento do pH causado pela inoculação com bactérias ácido-láticas heterofermentativas. Esse

ambiente menos ácido favorece o funcionamento das enzimas proteolíticas, contribuindo para a degradação de proteínas estruturais, como as zeínas, e, conseqüentemente, melhorando a digestibilidade do amido (Junges et al., 2017).

Dessa forma, a relação entre a redução de prolaminas e o aumento do nitrogênio amoniacal demonstra como a dinâmica da proteólise afeta a composição química da silagem e sua qualidade final. Além disso, essa interação contribui para a melhoria da disponibilidade de nutrientes essenciais, como o amido, e destaca a importância de escolher híbridos e inoculantes adequados para maximizar os benefícios da ensilagem.

#### 4.2 Degradabilidade ruminal *in vitro*

A maior DMS e DMO observada no híbrido K9606 pode estar relacionada à composição química desse híbrido, como a menor resistência estrutural, características que favorecem a fermentação e a digestibilidade. Por outro lado, o híbrido K9960 apresentou menores valores de DMS e DMO, o que pode ser atribuído a diferenças genéticas que influenciam a estrutura e composição das paredes celulares, tornando-o menos suscetível à degradação (Lopes et al., 2009). corroborando com a literatura que associa híbridos com maior proporção de endosperma vítreo a menor digestibilidade do amido (Corrêa et al., 2002; Pereira et al., 2004).

As silagens inoculadas demonstraram maior DMS e DMO em comparação à silagem controle, indicando que os microrganismos adicionados contribuíram para uma fermentação mais eficiente e para a quebra de componentes estruturais do grão. Esse resultado está alinhado com estudos que apontam o uso de inoculantes contendo bactérias heterofermentativas, como promotores de melhorias na digestibilidade das silagens devido à produção de ácidos orgânicos específicos e à maior proteólise (Silva et al., 2018).

No entanto, apesar de o tratamento com LHLBPP apresentar maior DMS e DMO em relação ao controle, seu desempenho foi similar ao do LHLB. Essa semelhança pode ser atribuída ao fato de que o *Pediococcus pentosaceus*, uma bactéria homofermentativa presente no tratamento LHLBPP, provavelmente exerceu sua influência de forma mais significativa nos primeiros momentos da

ensilagem, quando sua ação é predominante devido à produção rápida de ácido lático, Baron et al. (1986) observou, em grãos reidratados e ensilados, que a produção de ácido lático ocorre nos primeiros 15 dias de fermentação. Com o avanço da fermentação, os efeitos do *Lentilactobacillus hilgardii* e do *Lentilactobacillus buchneri* podem ter prevalecido, igualando os resultados finais entre os dois tratamentos inoculados (Nair et al., 2022).

A interação significativa entre o inoculante e o tempo de armazenamento para os valores de DMS destaca que o efeito positivo do inoculante na fermentação. Isso reflete a adaptação e o metabolismo dos microrganismos ao ambiente anaeróbico, favorecendo processos como a degradação proteica e a conversão de açúcares em ácidos orgânicos durante estágios específicos da fermentação (Fernandes et al., 2021).

Os testes de paralelismo e identidade das curvas de produção de gases em 24 horas indicaram comportamentos distintos entre os híbridos e os inoculantes analisados. As silagens armazenadas por 120 dias demonstraram maior produção acumulativa de gases em relação ao Dia 0. Esse comportamento reflete o impacto na fermentação promovendo uma maior quebra de matriz proteica e disponibilidade de substratos fermentáveis para a degradação ruminal em relação ao tempo de ensilagem (Ferraretto et al., 2015).

Entre os híbridos, o K9606 apresentou maior produção de gases acumulados em relação ao K9960. Esse resultado está alinhado com as características previamente descritas para o híbrido K9606 como menor vitreosidade e menor teor de prolaminas, consequentemente maior aproveitamento do amido pelos microrganismos ruminais (Correa et al., 2002; Mauricio et al., 2003).

As silagens tratadas com LHLB e LHLBPP apresentaram maior produção cumulativa de gases em relação ao controle, evidenciando maior fermentação ruminal. Esse resultado está relacionado às características desses tratamentos, que apresentaram menor teor de prolaminas e maior concentração de nitrogênio amoniacal, fatores que aumentam a disponibilidade de substratos fermentáveis para os microrganismos ruminais (Silva et al., 2018). Além disso, a maior DMS e DMO observada nesses

tratamentos indica maior digestibilidade da matéria seca e orgânica, reforçando sua associação com o aumento na produção de gases e metano (CH<sub>4</sub>) durante a fermentação ruminal. Estudos prévios também corroboram que a maior digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (IVDOM) está diretamente ligada ao potencial de produção de gases e metano (Ovani et al.,2023).

O híbrido K9606, por apresentar menor vitreosidade e teor de prolaminas, apresentou maiores valores de k em relação ao K9960, antes da ensilagem (tempo zero). Após 120 dias de fermentação, a taxa de produção de gases da silagem não inoculada continuou maior para o híbrido K9606. Entretanto, o uso dos inoculantes LHLB e LHLBPP aumentaram k do híbrido mais vítreo para valores semelhantes à silagem controle do híbrido menos vítreo. Esse resultado exalta que o uso de inoculantes contendo LHLB podem melhorar a fermentação ruminal de híbridos considerados duros (*flint*). Houve uma tendência de aumento do *lag time* com a ensilagem. Durante a fermentação anaeróbia, os microrganismos do silo consomem carboidratos solúveis para a produção de ácidos orgânicos (Ali e Tahir, 2021). Essa redução pode ter levado ao aumento do lag time da silagem.

## 5 Conclusão

Os resultados deste estudo demonstraram que os inoculantes LHLB e LHLBPP foram eficazes em melhorar a qualidade fermentativa das silagens de milho reidratado, promovendo maior degradação das prolaminas e aumentando a degradabilidade da matéria seca *in vitro*.

Entre os híbridos avaliados, o híbrido que apresentou melhor resposta aos tratamentos foi K9606, exibindo maior degradabilidade da matéria seca e melhor eficiência na fermentação. Em contraste, a maior vitreosidade do híbrido K9960 influenciou negativamente sua degradabilidade, reforçando a importância da escolha do material genético.

A alta estabilidade aeróbia observada, mesmo no tratamento controle, sugere a possível ação de uma flora epifítica na produção de ácidos antifúngicos, o que deve ser considerado em estudos futuros.

## Referências

- Almeida Carvalho-Estrada, P., Fernandes, J., da Silva, E. B., Tizioto, P., de Fátima Paziani, S., Duarte, A. P., ... & Nussio, L. G. (2020). Effects of hybrid, kernel maturity, and storage period on the bacterial community in high-moisture and rehydrated corn grain silages. *Systematic and Applied Microbiology*, 43(5), 126131. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126131>
- Ali, M. F., & Tahir, M. (2021). An overview on the factors affecting water-soluble carbohydrates concentration during ensiling of silage. *Journal of Plant and Environment*, 3(1), 63-80. <https://doi.org/10.33687/jpe.003.01.3702>
- Baron, V. S., Stevenson, K. R., & Buchanan-Smith, J. G. (1986). Proteolysis and fermentation of grain-corn ensiled at several moisture levels and under several simulated storage methods. *Canadian Journal of Animal Science*, 66(2), 451-461. <https://doi.org/10.4141/cjas86-047>
- Borreani, G. I. O. R. G. I. O., Tabacco, E. R. N. E. S. T. O., Schmidt, R. J., Holmes, B. J., & Muck, R. A. (2018). Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *Journal of dairy science*, 101(5), 3952-3979. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13837>
- Carvalho Benini, M., Carvalho, W. T. V., Pereira, R. V. G., Tavares, Q. G., Minighin, D. C., de Jesus Nunes, R. F., ... & Silva, L. V. (2020). Avaliação química da silagem de grão de milho reidratado em diferentes níveis de adição de água. *Pubvet*, 14, 119. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v14n7a612.1-6>
- Daniel, J. L. P., Weiß, K., Custódio, L., Neto, A. S., Santos, M. C., Zopollatto, M., & Nussio, L. G. (2013). Occurrence of volatile organic compounds in sugarcane silages. *Animal Feed Science and Technology*, 185(1-2), 101-105. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.06.011>
- Diogénes, L. V., Pereira Filho, J. M., Edvan, R. L., De Oliveira, J. P. F., Nascimento, R. R. D., Santos, E. M., ... & Bezerra, L. R. (2023). Effect of Different Additives on the Quality of Rehydrated Corn Grain Silage: A Systematic Review. *Ruminants*, 3(4), 425-444. <https://doi.org/10.3390/ruminants3040035>

- Eikmeyer, F. G., Köfinger, P., Poschenel, A., Jünemann, S., Zakrzewski, M., Heinl, S., ... & Schlüter, A. (2013). Metagenome analyses reveal the influence of the inoculant *Lactobacillus buchneri* CD034 on the microbial community involved in grass ensiling. *Journal of Biotechnology*, *167*(3), 334-343. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.07.021>
- Ferraretto, L. F., Fredin, S. M., & Shaver, R. D. (2015). Influence of ensiling, exogenous protease addition, and bacterial inoculation on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated and high-moisture corn. *Journal of Dairy Science*, *98*(10), 7318-7327. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9891>
- Fernandes, J., da Silva, E. B., de Almeida Carvalho-Estrada, P., Daniel, J. L. P., & Nussio, L. G. (2021). Influence of hybrid, moisture, and length of storage on the fermentation profile and starch digestibility of corn grain silages. *Animal Feed Science and Technology*, *271*, 114707. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114707>
- Gomes, A. L., Bueno, A. V., Jacovaci, F. A., Donadel, G., Ferraretto, L. F., Nussio, L. G., ... & Daniel, J. L. (2020). Effects of processing, moisture, and storage length on the fermentation profile, particle size, and ruminal disappearance of reconstituted corn grain. *Journal of Animal Science*, *98*(11), skaa332. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa332>
- Jiang, D., Li, B., Zheng, M., Niu, D., Zuo, S., & Xu, C. (2020). Effects of *Pediococcus pentosaceus* on fermentation, aerobic stability and microbial communities during ensiling and aerobic spoilage of total mixed ration silage containing alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Grassland Science*, *66*(4), 215-224. <https://doi.org/10.1111/grs.12272>
- Junges, D., Morais, G., Spoto, M. H. F., Santos, P. S., Adesogan, A. T., Nussio, L. G., & Daniel, J. L. P. (2017). Influence of various proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. *Journal of dairy science*, *100*(11), 9048-9051. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12943>

- Kung Jr, L., Shaver, R. D., Grant, R. J., & Schmidt, R. J. (2018). Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Journal of Dairy Science*, *101*(5), 4020-4033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>
- Lorini, I., Krzyzanowski, F. C., França-Neto, J. D. B., Henning, A. A., & Henning, F. A. (2015). Manejo integrado de pragas de grãos e sementes armazenadas. *CEP*, *86001*, 970.
- Mari, L. J., Schmidt, R. J., Nussio, L. G., Hallada, C. M., & Kung Jr, L. (2009). An evaluation of the effectiveness of *Lactobacillus buchneri* 40788 to alter fermentation and improve the aerobic stability of corn silage in farm silos. *Journal of Dairy Science*, *92*(3), 1174-1176. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1700>
- Martins, B. M., Rotta, P. P., & da Silva, A. L. (2024). Replacement of dry ground corn for rehydrated corn or high moisture corn with high vitreousness for lactating dairy cows.
- Maurício, R. M., Pereira, L. G. R., Gonçalves, L. C., Rodriguez, N. M., Martins, R. G. R., & Rodrigues, J. A. S. (2003). Potencial da técnica in vitro semi-automática de produção de gases para avaliação de silagens de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Revista Brasileira de Zootecnia*, *32*, 1013-1020. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982003000400029>
- Mombach, M. A., Pereira, D. H., Pina, D. S., Bolson, D. C., & Pedreira, B. C. (2019). Silage of rehydrated corn grain. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, *71*, 959-966. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9676>
- Nair, J., Yang, H. E., Redman, A. A., Chevaux, E., Drouin, P., McAllister, T. A., & Wang, Y. (2022). Effects of a mixture of *Lentilactobacillus hilgardii*, *Lentilactobacillus buchneri*, *Pediococcus pentosaceus* and fibrolytic enzymes on silage fermentation, aerobic stability, and performance of growing beef cattle. *Translational Animal Science*, *6*(4), txac144. <https://doi.org/10.1093/tas/txac144>
- Nellis, S. E., Hoffman, P. C., & Shaver, R. D. (2013). A modified method to quantify prolamin proteins in dry and high-moisture corn. *Journal of Dairy Science*, *96*(7), 4647-4652. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6575>

- Nunes, F.C., Cylene Guimarães, K., Abrão Pessoa, F. O., Pereira Cunha, F., Rafael de Souza Pereira, V. C., do Prado Paim, T., & Bezerra Fernandes, P. (2024). Use of bacterial inoculant in rehydrated corn grain silage. *Journal of Applied Animal Research*, 52(1), 2400534. <https://doi.org/10.1080/09712119.2024.2400534>
- Oude Elferink, S. J., Krooneman, J., Gottschal, J. C., Spoelstra, S. F., Faber, F., & Driehuis, F. (2001). Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Applied and Environmental microbiology*, 67(1), 125-132. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.125-132.2001>
- Ovani, V. S., Pérez-Márquez, S., da Silva, B. T. N., Louvandini, H., Abdalla, A. L., & de Azevedo Olival, A. (2023). Potential of *Chloroleucon acacioides* trees as an alternative feed supplement for grazing ruminants in a tropical silvopastoral system. *Journal of Agriculture and Food Research*, 11, 100524. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100524>
- Rossi, E. S., Faria, M. V., Mendes, M. C., Neumann, M., Gabriel, A., & Conte, M. V. D. (2016). Bromatological characteristics and ruminal digestibility of grain corn hybrids with different vitreousness in silage maturity. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 38, 337-344. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i3.28703>
- Scuderi, R. A., Drouin, P., & Apper, E. (2023). Inoculation with heterofermentative strains *Lentilactobacillus buchneri* CNCM 40788 and *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 either alone or combined improves fermentation and aerobic stability of ensiled triticale (X-triticosecale). *AIMS Agriculture & Food*, 8(3). [10.3934/agrfood.2023048](https://doi.org/10.3934/agrfood.2023048)
- Siemerink, M. A., Kuit, W., López Contreras, A. M., Eggink, G., van der Oost, J., & Kengen, S. W. (2011). D-2, 3-butanediol production due to heterologous expression of an acetoin reductase in *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(8), 2582-2588. <https://doi.org/10.1128/AEM.01616-10>
- Silva, C. M., Amaral, P. N. C. D., Baggio, R. A., Tubin, J. S. B., Conte, R. A., Pivo, J. C. D., ... & Paiano, D. (2016). Estabilidade de silagens de grãos úmidos de milho e milho reidratado. *Revista*

*Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 17, 331-343. <https://doi.org/10.1590/S1519-99402016000300001>

Silva, N. C., Nascimento, C. F., Nascimento, F. A., De Resende, F. D., Daniel, J. L. P., & Siqueira, G. R. (2018). Fermentation and aerobic stability of rehydrated corn grain silage treated with different doses of *Lactobacillus buchneri* or a combination of *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4158-4167. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13797>

Silvestre, A. M., & Millen, D. D. (2021). The 2019 Brazilian survey on nutritional practices provided by feedlot cattle consulting nutritionists. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 50, e20200189. <https://doi.org/10.37496/rbz5020200189>

Valle, T. A. D., Morais, J. P. G. D., Facco, F. B., Gandra, J. R., Campana, M., Capucho, E., & Garcia, T. M. (2024). Chitosan decreases fermentation losses and improves aerobic stability of rehydrated corn silage. *Ciência Rural*, 55(3), e20230164. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20230164>

Zurak, D., Kljak, K., & Grbeša, D. (2020). The composition of floury and vitreous endosperm affects starch digestibility kinetics of the whole maize kernel. *Journal of Cereal Science*, 95, 103079. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.103079>

Capítulo 3-Tempo de fermentação e inoculação com *Lentilactobacillus buchneri* com ou sem *L. hilgardii* sobre o perfil de fermentação, estabilidade aeróbia e degradabilidade ruminal *in vitro* de silagem de milho reidratado.

#### Resumo

A silagem de grãos de milho reidratados surge como alternativa para melhorar a digestibilidade do amido de grãos vítreos, otimizando a eficiência alimentar em ruminantes. Avaliou-se o impacto da inoculação com *Lentilactobacillus buchneri* (LB) isolado ou combinado com *Lentilactobacillus hilgardii* (LHLB) sobre o perfil fermentativo, estabilidade aeróbia e degradabilidade ruminal *in vitro* em silagens de milho reidratado. O estudo foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial  $3 \times 6$ , sendo três inoculantes (controle, LB e LHLB) e seis tempos de estocagem (15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias), com as médias comparadas pelo teste de Tukey. Os resultados indicaram que o tratamento com LHLB proporcionou maior estabilidade aeróbia, alcançando 288 horas aos 15 dias de fermentação. O pH variou significativamente entre os tratamentos e tempos, sendo mais estável no LHLB. A degradabilidade ruminal *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO) aumentou com o tempo de ensilagem, atingindo valores máximos aos 60 dias nos tratamentos controle (84,5%) e LHLB (89,1%). O uso de inoculantes também reduziu o *lag time* e melhorou a cinética de fermentação. Conclui-se que a associação de *L. hilgardii* e *L. buchneri* potencializa a qualidade fermentativa e a estabilidade aeróbia da silagem de grãos de milho reidratado, com benefícios observados já em curtos períodos de armazenamento.

Palavras chave: Conservação de grãos, Inoculante, Prolaminas, Ruminante.

## Abstract

Rehydrated corn grain silage emerges as an alternative to improve the digestibility of vitreous grain starch, optimizing feed efficiency in ruminants. This study evaluated the impact of inoculation with *Lentilactobacillus buchneri* (LB) alone or in combination with *Lentilactobacillus hilgardii* (LHLB) on the fermentation profile, aerobic stability, and in vitro ruminal degradability of rehydrated corn silage. The study was conducted in a completely randomized design in a  $3 \times 6$  factorial scheme, with three inoculants (control, LB, and LHLB) and six storage times (15, 30, 45, 60, 75, and 90 days), with means compared using Tukey's test. The results indicated that the LHLB treatment provided greater aerobic stability, reaching 288 hours at 15 days of fermentation. The pH varied significantly among treatments and storage times, being more stable in LHLB. The in vitro ruminal organic matter degradability (IVOMD) increased with ensiling time, reaching maximum values at 60 days in the control (84.5%) and LHLB (89.1%) treatments. The use of inoculants also reduced lag time and improved fermentation kinetics. It is concluded that the combination of *L. hilgardii* and *L. buchneri* enhances the fermentative quality and aerobic stability of rehydrated corn grain silage, with benefits observed even in short storage periods.

**Keywords:** Grain conservation, Inoculant, Prolamins, Ruminant.

## 1. Introdução

O milho se destaca como a principal fonte energética utilizada nas dietas para ruminantes devido ao seu alto teor de amido e grande disponibilidade no mercado brasileiro (Silvestre & Millen, 2021). Entretanto o milho predominante no Brasil tem maior proporção de endosperma vítreo e essa característica dificulta a digestibilidade do amido, tornando necessário a busca por métodos de processamento que melhorem sua digestibilidade (Correa et al., 2002).

A silagem de grãos de milho reidratados surge como uma alternativa promissora para contornar a baixa digestibilidade de grão vítreos. O processo de reidratação promove alterações significativas na matriz proteica e na disponibilidade do amido, potencializando sua degradabilidade ruminal (Jungles et al., 2017). No entanto, desafios como a estabilidade aeróbia e o controle de perdas por fermentação inadequada demandam estratégias que assegurem a eficiência do processo de ensilagem (Silva et al., 2016).

O *Lentilactobacillus buchneri* é uma bactéria heterofermentativa amplamente reconhecida por sua capacidade de aumentar a produção de ácido acético e prolongar a estabilidade aeróbia das silagens (Silva et al., 2019), enquanto *Lentilactobacillus hilgardii* tem mostrado resultados promissores em combinações, promovendo um perfil fermentativo equilibrado uma vez que otimiza a produção e conversão de ácidos orgânicos em curtos tempos de fermentação (Droin et al., 2023). A interação entre essas espécies pode ser decisiva para maximizar os benefícios da silagem de grãos reidratados.

O tempo de armazenamento influencia diretamente a dinâmica fermentativa e a estabilidade da silagem após a abertura. Estudos recentes indicam que períodos prolongados de ensilagem podem intensificar a degradação da matriz proteica e melhorar a digestibilidade ruminal do amido (Silva et al., 2019), refletindo em maior eficiência alimentar (Arcari et al., 2016). No entanto, ainda são limitados os dados que investigam como a interação entre o tempo de ensilagem e o uso de *Lentilactobacillus buchneri* associado ou não *L. hilgardii* afeta a degradabilidade e parâmetros fermentativos da silagem de grãos de milho reidratado

Nós hipotetizamos que o uso do *L. buchneri* associado ao *L. hilgardii* poderia aumentar a degradabilidade ruminal e a estabilidade aeróbia de silagens de milho reidratado, mesmo em tempos curtos de fermentação. Portanto, o objetivo foi avaliar como a inoculação com *L. buchneri*, com ou sem *L. hilgardii*, afeta o perfil fermentativo, a estabilidade aeróbia e a degradabilidade ruminal *in vitro* da silagem de grãos de milho reidratados em tempos curtos de fermentação.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Ensilagem

O milho grão foi obtido no comércio local, no município de Araguaína, Tocantins, Brasil. A vitreosidade dos grãos foi determinada através de dissecação manual (Dombrink-Kurtzman e Bietz, 1993; Pereira et al., 2004).

Os grãos foram moídos em moinho de martelo (Perozin, Concórdia, SC) com peneira de 2 mm. Após moagem, o material foi dividido em 12 pilhas (20 kg pilha<sup>-1</sup>), reidratados com água livre de cloro usando um regador e misturados manualmente para atingirem 350 g kg<sup>-1</sup> de umidade. Quatro pilhas (repetições) foram tratadas com um dos três inoculantes a seguir: 1) Controle (sem aditivo); 2) *Lentilactobacillus buchneri* (LB; NCIMB 40788, Lallemand, Brasil) (1 x 10<sup>11</sup> ufc g<sup>-1</sup>), na dose de 1 x 10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup> de milho reidratado; 3) *Lentilactobacillus hilgardii* (CNCM I-4785, Lallemand, Brasil) + *Lentilactobacillus buchneri* (LHLB; Lallemand, Brasil) (3 x 10<sup>11</sup> ufc g<sup>-1</sup>), na dose de 3 x 10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup> de milho reidratado. Os inoculantes foram diluídos em água livre de cloro e aplicados na dosagem recomendada pelo fabricante. Para melhor distribuição do inoculante, eles foram adicionados na água de reidratação.

De cada pilha foram confeccionados seis mini-silos (tempos de estocagem), compactados com êmbolo de madeira para alcançar a densidade de 850 kg m<sup>-2</sup> de matéria fresca. Os silos foram confeccionados em tubos de PVC, de 40 cm de comprimento e 10 cm de diâmetro, com tampa equipada com uma válvula para liberar os gases. Foram produzidos um total de 72 silos, sendo três inoculantes e seis tempos de estocagem (15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias), com quatro repetições por

tratamento. Após a abertura, o conteúdo de cada silo foi homogeneizado e amostrado para mensuração da composição química, das características fermentativas, teste de estabilidade aeróbia e degradabilidade *in vitro*.

## 2.2. Análises químicas

Uma amostra foi pré-seca à 55°C, até peso constante, moídas em moinho tipo Wiley com peneira de 1 mm para análise de matéria seca (MS), cinzas (método 942.05; AOAC, 1990), extrato etéreo (EE) (método 920.39; AOAC, 1990), proteína bruta (PB) (método 954.01; AOAC, 1990) e prolaminas (Nellis et al., 2013).

Foi preparado o extrato aquoso com 30 g da amostra fresca e 270 ml de água destilada, homogeneizados por quatro minutos. O pH foi mensurado em pHmetro digital e o N amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) determinado por meio de destilação com cloreto de cálcio e óxido de magnésio (método 941.04; AOAC, 1990).

A tabela 1 apresenta análises químicas realizadas no material de origem e no material reidratado, antes da ensilagem.

Tabela 1. Vitreosidade do grão, composição química, pH e matéria seca da silagem de milho reidratado, sem inoculante (TC) ou inoculado com *L. buchneri* ou *L. buchneri* e *L. hilgardii*.

	Antes da reidratação		
Vitreosidade g/kg de endosperma	680,93		
PB, g kg <sup>-1</sup> de MS	81,73		
EE g kg <sup>-1</sup> de MS	60,14		
MM g kg <sup>-1</sup> de MS	10,37		
	Após a reidratação		
	TC	LB	LHLB
MS, g kg <sup>-1</sup> de MN	655,87	658,82	659,01
pH	6,64	6,53	6,41

PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; MM = matéria mineral; MN= matéria natural

### 2.3. Teste de estabilidade aeróbia

Para monitorar a estabilidade aeróbia, 1,5 kg de cada silagem foi colocada em dois baldes plásticos de 8L. Os baldes permaneceram em uma sala com temperatura constante de 25°C por 12 dias. No primeiro balde, a cada 1 h, a temperatura das silagens era registrada em termômetro digital (tipo espeto; Supermedy) inserido no centro da massa; a temperatura ambiente também foi mensurada em um sensor de temperatura e umidade (HTC-2, Supermedy). A estabilidade aeróbia foi determinada como o número de horas em que as silagens não ultrapassam em 2°C a temperatura ambiente (Ranjik e Kung, 2000). Ainda, aos quatro, oito e 12 dias de avaliação foi retirada uma amostra do segundo balde para determinação do pH.

### 2.4. Ensaio de produção de gases

O Ensaio de produção de gases foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animal da Universidade Federal do Tocantins sob o número 19/2024.

Foi realizado um ensaio de produção de gases, de acordo com a metodologia descrita por Maurício et al. (1999). A inoculação foi realizada utilizando líquido ruminal, obtido de múltiplos locais do rúmen, de um bovino adulto mestiço com uma fístula ruminal, recebendo dieta a base de gramíneas dos gêneros *Megathyrsus* e *Urochloa* à vontade e 1,5 kg dia<sup>-1</sup> de milho moído.

A pressão gerada pelos gases acumulados na parte superior dos frascos incubados foi mensurada utilizando-se um transdutor de pressão do tipo SNDWAY SW-512B, com uma agulha de 0,6 mm de diâmetro conectada em sua extremidade, lida em leitor digital e registrada em computador. As leituras foram realizadas nos tempos de dois, quatro, seis, oito, 10, 12, 15, 18, 21 e 24 horas após a incubação. Utilizou-se os dados de pressão em PSI (pressão por polegada quadrada) para o cálculo do volume de gases produzidos através da equação matemática desenvolvida por Feitosa e Souza (2020), para as condições experimentais do Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Ciências Agrárias da UFNT.

$$V = -0,0195 + 3,7989P + 0,0174P^2 \quad (R^2 = 0,9875)$$

Em que: V = Volume (mL); P = Pressão (PSI)

Os resíduos remanescentes nos frascos de fermentação após 24 h foram filtrados em cadinhos de vidro de porosidade 01, à vácuo. Os resíduos foram secos em estufa a 105°C e pesados, e, em seguida, foram incinerados em mufla a 500°C e pesados. Os resultados foram utilizados para os cálculos das degradabilidades da matéria seca e da matéria orgânica.

Para a avaliação da cinética de fermentação, o modelo de Gompertz foi adotado e das curvas geradas, os atributos da produção de gás foram derivados, sendo eles: volume de gás produzido em 24h, a taxa de produção de gás (K), o lag time, o tempo de meia-vida (T<sub>0,5</sub>) e a taxa de produção de gás na T<sub>0,5</sub> ( $\mu_{0.5}$ ).

$$V_T = V_F \times \exp(-b \exp(-k \times t))$$

Em que: V<sub>t</sub> = volume de gases acumulado no tempo; V<sub>f</sub> = volume total de gases produzido; b = parâmetro de formação, sem interpretação biológica; k = taxa específica de produção de gases; t = tempo de fermentação.

## 2.5. Análises estatísticas

Os dados de perfil de fermentação, composição química e estabilidade aeróbia foram analisados em um delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 x 6, através do Programa SISVAR® (versão 5.6). O modelo incluiu o efeito fixo dos inoculantes (I = TC, LB ou LHLB), do tempo (T = 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias) e suas interações (I x T). As médias foram comparadas pelo teste Tukey (p<0,05).

Os dados do ensaio de produção de gás foram analisados no Programa RStudio® (2021) (versão 4.2.2) e avaliados quanto a normalidade usando o teste Shapiro-Wilk, aplicando a função “stats::shapiro.test”. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), usando a função “stats::anova” e as médias comparadas pelo teste Tukey (p<0,05).

### 3. Resultados

#### 3.1 Características químicas e perfil fermentativo

Durante o tempo de ensilagem, os teores de matéria seca mantiveram-se constantes ( $p = 0,2094$ ) e menores para o tratamento LB ( $p < 0,0001$ ). Houve efeito do tempo de ensilagem sobre os teores de extrato etéreo ( $p < 0,0001$ ) havendo uma maior redução nos teores aos 90 dias de ensilagem. Os teores de proteína bruta permaneceram constantes ao longo do período de ensilagem ( $p = 0,6254$ ). No entanto, observaram-se valores mais elevados no tratamento LB em comparação aos demais, mantendo-se superiores até os 75 dias de fermentação ( $p < 0,0001$ ). Os teores de matéria mineral se mantiveram constantes com redução na abertura de 90 dias ( $p < 0,0001$ ). (Tabela 2)

Tabela 2. Parâmetros fermentativos de silagem de milho reidratado contendo diferentes inoculantes e tempos de armazenamento.

		MS, g kg <sup>-1</sup> MN	EE, g kg <sup>-1</sup> MS	PB, g kg <sup>-1</sup> MS	MM, g kg <sup>-1</sup> MS	pH	NH <sub>3</sub> g kg <sup>-1</sup> MS	PG g kg <sup>-1</sup> MS	Prolaminas g kg <sup>-1</sup> MS
	TC	643,57	41,90	76,25	6,95	3,95	0,22	11,70	68,83
15d	LB	628,10	45,82	81,72	7,28	3,97	0,24	11,33	63,08
	LHLB	641,90	42,78	79,17	7,19	4,18	0,26	14,26	60,22
	TC	647,75	45,52	76,52	6,80	4,00	0,30	14,72	68,08
30d	LB	631,07	40,79	81,89	7,10	4,16	0,33	14,49	58,77
	LHLB	643,97	42,13	79,92	6,98	4,42	0,34	17,70	55,36
	TC	646,10	46,86	75,94	7,27	3,88	0,29	14,70	52,12
45d	LB	632,62	46,20	85,46	6,95	4,24	0,32	16,95	49,98
	LHLB	637,65	50,33	78,34	7,26	4,42	0,36	21,87	43,49
	TC	638,34	52,21	75,87	7,16	3,85	0,39	45,72	52,12

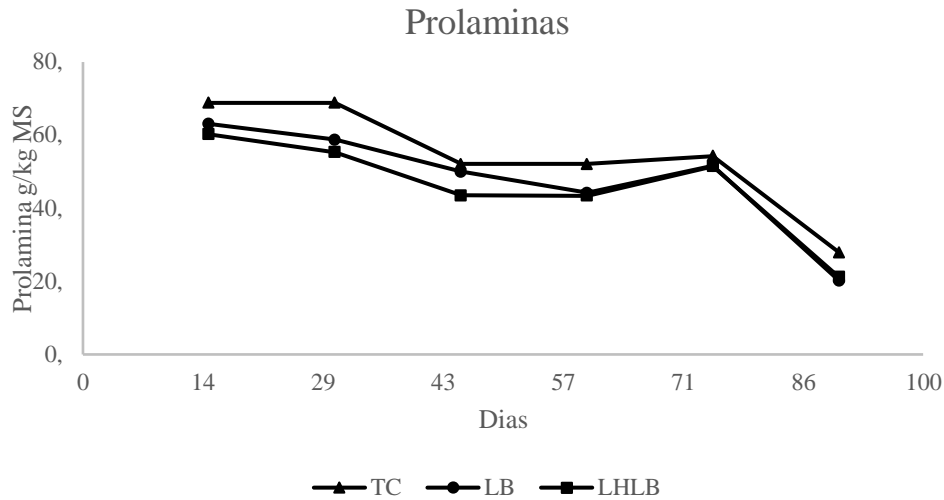
60d	LB	634,57	54,54	83,05	7,46	4,30	0,52	46,79	44,24
	LHLB	638,08	51,56	81,20	7,66	4,41	0,52	48,53	43,45
	TC	639,29	45,72	76,30	7,32	3,87	0,45	31,85	54,30
75d	LB	628,96	45,48	82,88	7,09	4,36	0,56	30,31	51,62
	LHLB	639,40	42,99	80,11	6,90	4,47	0,64	33,54	51,50
	TC	640,70	40,30	80,48	6,73	3,93	0,42	15,23	27,90
90d	LB	628,55	38,50	80,71	6,88	4,45	0,53	24,02	20,16
	LHLB	635,40	38,33	81,06	6,59	4,47	0,59	29,68	21,15
	EPM	1,2513	1,2851	0,6906	0,0609	0,0068	0,0057	0,8573	0,8029
	I	<0,0001	0,9175	<0,0001	0,5898	<0,000	<0,0001	<0,000	<0,0001
<i>P -</i>						1		1	
<i>valor</i>	T	0,2094	<0,0001	0,6254	<0,0001	<0,000	<0,0001	<0,000	<0,0001
						1		1	
	I x T	0,5471	0,9375	0,0405	0,0749	<0,000	<0,0001	0,1639	0,2808
						1			

MS = Matéria seca; MN=Matéria natural; NH<sub>3</sub> = amônia; PG = Perda por gases; TC = tratamento controle; LB = *L. buchneri*; LHLB = *L. hilgardii* e *L. buchneri*; I = efeito do inoculante; T = efeito do tempo de armazenamento; I × T = interação entre o inoculante e tempo de armazenamento.

A figura 1 demonstra a evolução da concentração de prolaminas (g. kg<sup>-1</sup> de matéria seca) ao longo do tempo de armazenamento (dias) para os diferentes tratamentos. Houve redução das prolaminas com o avanço do período de ensilagem, demonstrando a degradação proteica ao longo do tempo (p < 0,0001).

Ademais a degradação mais intensa de prolaminas nos tratamentos com inoculantes (p < 0,0001) indica que a ação dos microrganismos contribuiu para a quebra das proteínas de armazenamento, possivelmente aumentando a disponibilidade do amido.

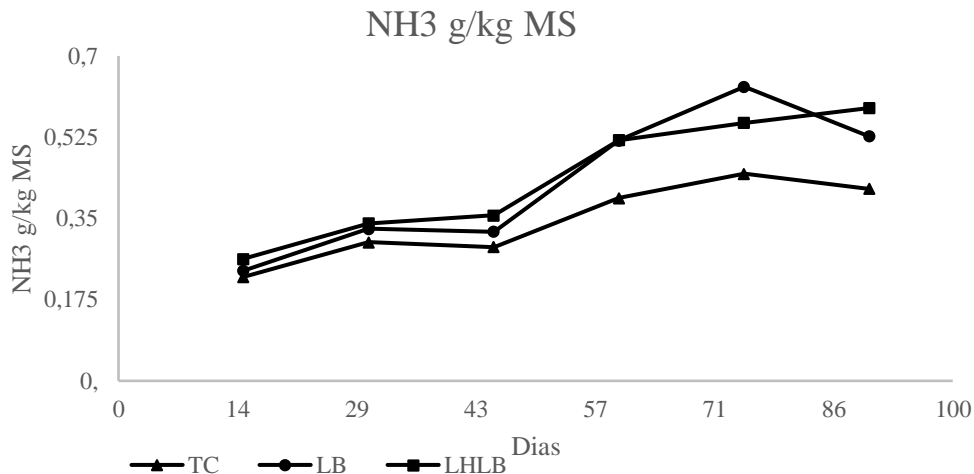
Figura 1. Degradação das prolaminas (g/kg de matéria seca) ao longo do período de armazenamento em silagens de grãos de milho reidratado submetidas a diferentes tratamentos. TC: controle sem inoculante; LB: *Lentilactobacillus buchneri*; LHLB: combinação de *Lentilactobacillus buchneri* e *Lentilactobacillus hilgardii*. EPM = 0,8573. Efeito do inoculante,  $p < 0,0001$ ; efeito do tempo de armazenamento,  $p < 0,0001$ ; interação entre inoculante e tempo de armazenamento,  $p = 1639$ .



A concentração de  $\text{NH}_3$  aumentou ao longo do período de armazenamento, atingindo os valores mais altos aos 90 dias (figura 2). Esse aumento é esperado devido à atividade de microrganismos proteolíticos e à degradação de proteínas durante a fermentação.

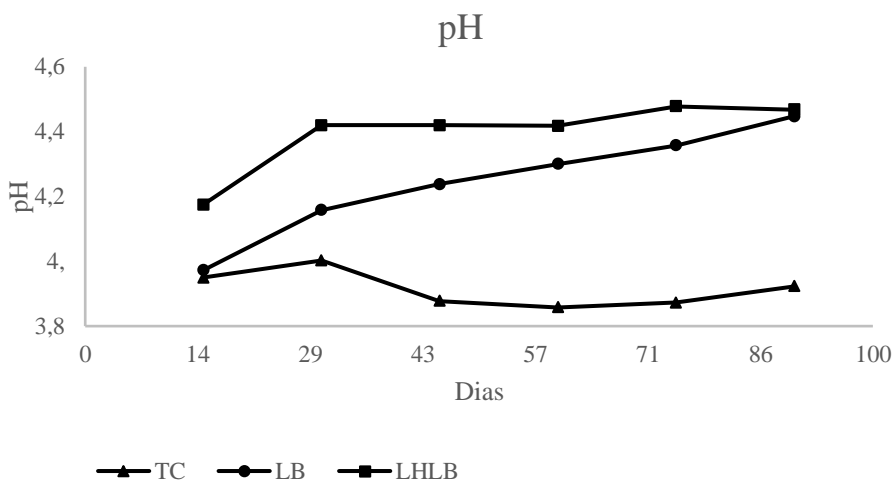
Os tratamentos com *L. buchneri* (LB) e *L. buchneri* + *L. hilgardii* (LHLB) apresentaram maiores concentrações de  $\text{NH}_3$  em relação ao controle (TC), demonstrando uma maior degradação proteica nas silagens inoculadas ( $p < 0,0001$ ).

Figura 2. Concentração de nitrogênio amoniacal ( $\text{NH}_3$ ) nas silagens de milho reidratado ao longo do período de armazenamento, sem inoculante (Controle - TC) e tratadas com *Lentilactobacillus buchneri* (LB) e a combinação de *L. buchneri* com *L. hilgardii* (LHLB). EPM = 0,0057. Efeito do inoculante,  $P < 0,0001$ ; efeito do tempo de armazenamento,  $P < 0,0001$ ; interação entre efeito do inoculante e tempo de armazenamento,  $P < 0,0001$ .



O tratamento LHLB apresentou os valores de pH mais elevados em comparação com os demais tratamentos, estabilizando-se após 30 dias de armazenamento. Esse comportamento pode estar relacionado à ação mais acelerada de *L. hilgardii* na conversão do ácido lático em ácido acético e 1,2-propanodiol, resultando em um aumento mais precoce do pH. Por outro lado, o tratamento LB apresentou um comportamento semelhante ao LHLB, porém com uma conversão mais gradual, sem redução significativa ao longo do tempo, atingindo valores próximos ao LHLB apenas aos 90 dias.

Figura 3. Valores de pH das silagens de milho reidratado ao longo do período de armazenamento, sem inoculante (Controle - TC) e tratadas com *Lactobacillus buchneri* (LB) e a combinação de *L. buchneri* com *L. hilgardii* (LHLB). EPM = 0,0068. Efeito do inoculante,  $P < 0,0001$ ; efeito do tempo de armazenamento,  $P < 0,0001$ ; interação entre efeito do inoculante e tempo de armazenamento,  $P < 0,0001$ .



A estabilidade aeróbia apresentou diferenças entre os tratamentos e ao longo do período de fermentação (Tabela 3). O tratamento LHLB alcançou o valor máximo de 288 horas aos 15 dias de fermentação, enquanto o tratamento LB atingiu este mesmo patamar aos 30 dias. Já a silagem controle (TC) alcançou o mesmo nível somente aos 45 dias. Em relação ao pH, a maior variação foi registrada aos 15 dias de abertura, a partir de quatro dias após a exposição aeróbia para o tratamento TC e a partir de oito dias para o tratamento LB ( $p < 0,0001$ ). Nos demais períodos de ensilagem, todos os tratamentos mantiveram o pH estável ao longo da exposição aeróbia.

Tabela 3. Estabilidade aeróbia e perfil de pH pós abertura de silagem de milho reidratado contendo diferentes inoculantes e tempos de armazenamento.

Tempo de ensilagem	Inoculante	Estabilidade aeróbia (horas)	pH			
			Abertura	4 Dias	8 Dias	12 Dias
15d	TC	48	3,95	7,18	6,12	5,99
	LB	107	3,97	4,27	6,54	5,56
	LHLB	288	4,18	4,10	4,02	3,97
30d	TC	206	4,00	3,96	4,02	4,42
	LB	288	4,16	4,12	4,14	4,09
	LHLB	288	4,42	4,22	4,18	4,10
45d	TC	246	3,88	3,88	3,91	4,72
	LB	288	4,24	4,17	4,14	4,20
	LHLB	288	4,42	4,26	4,14	4,20
60d	TC	288	3,86	3,88	3,87	4,52
	LB	288	4,30	4,32	4,26	4,23
	LHLB	288	4,42	4,45	4,34	4,30
75d	TC	288	3,87	3,94	3,93	3,83
	LB	288	4,36	4,37	4,36	4,26
	LHLB	288	4,48	4,49	4,44	4,30
90d	TC	288	3,93	3,95	3,76	3,82
	LB	288	4,45	4,43	4,10	4,33
	LHLB	288	4,47	4,47	4,09	4,26
	EPM	5,9377	0,0068	0,0289	0,0838	0,1173
	I	<0,0001	<0,0001	0,0001	0,0036	0,0894
<i>P – valor</i>	T	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0003
	I x T	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0047

TC = tratamento controle; LB = *L. buchneri*; LHLB = *L. hilgardii* e *L. buchneri*; I = efeito do inoculante; T = efeito do tempo de armazenamento; I x T = interação entre o inoculante e tempo de armazenamento.

### 3.2 Degradabilidade ruminal *in vitro*

Observa-se um aumento linear da produção de gás em 24 h de incubação com o avanço do tempo de ensilagem ( $p < 0,01$ ) ( $R^2 = 0,41$ ) (Tabela 4; Figura 2), independente do tipo de inoculante utilizado.

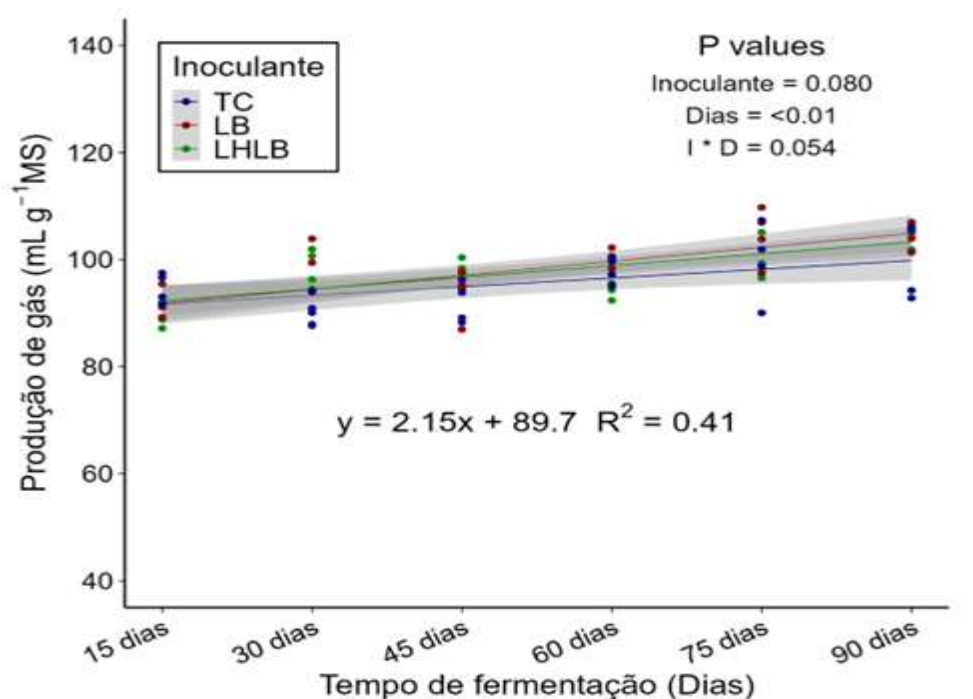
Verifica-se efeito quadrático ( $p < 0,01$ ) ( $R^2 = 0,65$ ) para tempo de meia-vida ( $T_{0,5}$ ), taxa fracionária de produção de gás ( $K$ ) e taxa fracionária de produção de gás na meia-vida ( $\mu_{0,5}$ ). Houve interação entre inoculante x tempo de ensilagem para degradabilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO), *lag time*,  $T_{0,5}$ ,  $K$  e  $\mu_{0,5}$  (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de variância das variáveis da técnica de produção de gás *in vitro* e dos parâmetros do modelo Gompertz para os fatores inoculantes e tempo de ensilagem de silagens de milho reidratado

Variável	P - valor					
	Inoculante	Dias				I x T
		L	R <sup>2</sup>	Q	R <sup>2</sup>	
GP (ml g <sup>-1</sup> MS)	0,080	<0,01	0,41	0,345	-	0,054
DIVMO (g kg <sup>-1</sup> )	0,301	<0,01	0,83	0,727	-	<0,01
Vf (ml)	0,635	<0,01	0,30	<0,01	0,60	0,092
<i>Lag time</i> (min)	0,604	0,224	-	0,705	-	0,016
$T_{0,5}$ (h)	0,526	<0,01	0,50	<0,01	0,65	<0,01
$K$ (%/h)	0,039	<0,01	0,47	<0,01	0,65	<0,01
$\mu_{0,5}$ (%/h)	0,039	<0,01	0,47	<0,01	0,65	<0,01

GP, Produção de gás; IVDOM, Degradabilidade *in vitro* da matéria orgânica; Vf, Volume final assintótico de gás;  $t_{0,5}$ , Meia-vida;  $k$ , Taxa fracionária de produção de gás;  $\mu_{0,5}$ , Taxa fracionária de produção de gás na meia-vida; L, Regressão linear; Q, Regressão quadrática; R<sup>2</sup>, Coeficiente de determinação. I x T, Interação entre Inoculante e Tempo de ensilagem.

Figura 4 – Efeito do tempo de ensilagem na produção acumulada de gás em 24 horas de incubação de silagem de milho reidratado contendo diferentes inoculantes



O desdobramento das interações constatadas na tabela 4 encontram-se na tabela 5. A DIVMO aumentou com o avanço do tempo de ensilagem, em todos os inoculantes avaliados. Dentro do período avaliado, a silagem controle e a silagem inoculada com LHLB apresentaram valores máximos aos 60 dias de fermentação, enquanto na silagem tratada com LB isso ocorreu aos 75 dias. Aos 15 dias, a silagem controle apresentou maior DIVMO em relação às inoculadas, entretanto, aos 30 dias, os valores tornam-se semelhantes. Aos 45 dias, a silagem com LHLB apresentou maior DIVMO do que a controle. A partir de 60 dias, todos os tratamentos apresentaram o mesmo resultado. O *lag time* apresentou diferença ao longo do tempo de fermentação somente para a silagem inoculada com LHLB, aos 30 dias. Nesse momento, as silagens inoculadas apresentaram menor *lag time* em relação à silagem controle.

O tempo de meia vida diminuiu ao longo do tempo de fermentação. Aos 30 dias, as silagens inoculadas apresentaram menor tempo de meia vida em relação à controle. Os valores de K e  $\mu_{0,5}$  aumentam a partir de 45 dias de ensilagem, em todos os tratamentos. A silagem inoculada com LHLB mostra valores superiores em relação ao tratamento controle aos 30 dias.

Tabela 5. Desdobramento do efeito da interação entre inoculante e tempo de ensilagem nas variáveis da técnica de produção de gás *in vitro* e dos parâmetros do modelo Gompertz de silagem de milho reidratado

Inoculante	Tempo de ensilagem					
	15	30	45	60	75	90
Degradabilidade <i>in vitro</i> da matéria orgânica (g kg <sup>-1</sup> )						
TC	885,38Ab	871,56Ab	883,25Bb	918,60Aa	931,14Aa	941,60Aa
LB	865,03Be	888,07Ade	900,35Abcd	916,12Abc	939,07Aab	947,74Aa
LHLB	854,62Bc	883,36Ab	905,74Ab	929,79Aa	934,95Aa	951,03Aa
CV	1,24%					
<i>Lag time</i> (minutos)						
TC	5,69Aa	5,91Aa	5,56Aa	5,41Aa	5,02Aa	5,17Aa
LB	6,10Aa	4,86Ba	5,44Aa	6,08Aa	4,84Aa	5,21Aa
LHLB	5,77Aa	4,35Bb	6,06Aa	6,16Aa	5,69Aa	5,51Aab
CV	11,07%					
Tempo de meia-vida (T <sub>0,5</sub> ; horas)						
TC	18,65Aa	19,82Aa	14,47Ab	13,82Ab	13,50Ab	14,81Ab
LB	20,00Aa	17,43Ba	14,23Ab	14,01Ab	14,20Ab	13,16Ab
LHLB	20,35Aa	15,40Bb	13,67Ab	14,00Ab	15,52Ab	13,65Ab
CV	8,51%					
Taxa fracionária de produção de gás (K; %/h)						
TC	10,57Ab	9,82Bb	15,40Ba	16,27Aa	16,33Aa	14,23Ba
LB	9,92Ab	11,16ABb	15,67Ba	17,25Aa	14,90ABa	17,31Aa
LHLB	9,38Ac	12,40Ab	17,98Aa	17,46Aa	14,04Bb	16,81Aa
CV	8,54%					
Taxa fracionária de produção de gás na meia-vida ( $\mu_{0,5}$ ; %/h)						
TC	7,33Ab	6,81Bb	10,66Ba	11,28Aa	11,32Aa	9,87Ba
LB	6,87Ab	7,74Abb	10,86Ba	11,96Aa	10,33ABa	12,00Aa
LHLB	6,50Ac	8,59Ab	12,50Aa	12,10Aa	9,73Bb	11,65Aa
CV	8,54%					

As letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas indicam diferenças significativas entre os inoculantes e os dias de fermentação, de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 4 Discussão

### 4.1. Características químicas e perfil fermentativo

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam a influência do tempo de ensilagem e do uso de inoculantes no perfil fermentativo e nas características químicas da silagem de milho reidratado. Apesar de os teores de matéria seca permanecerem constantes ao longo do período de armazenamento, a menor concentração observada no tratamento com *Lentilactobacillus buchneri* (LB) pode indicar maior atividade metabólica associada a este microrganismo heterofermentativo. Esse tipo de fermentação resulta na conversão de ácido láctico em ácido acético e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Borreani et al., 2018; Driehuis et al., 2001), promovendo maiores perdas de MS em relação às silagens não inoculadas (Kleinschmit e Kung Jr., 2006). O tratamento LHLB também continha *L. buchneri*, entretanto a dose inoculada era maior do que no tratamento LB. Silva et al. (2018) observaram aumento dos teores de MS na silagem de milho reidratado com o aumento da dose de *L. buchneri* inoculada.

Observou-se maior perda por gases nos tratamentos inoculados em relação ao tratamento controle, possivelmente relacionada a predominância da fermentação heterolática que aumenta a conversão de ácidos orgânicos em compostos voláteis, como o ácido acético e o CO<sub>2</sub> (Arriola et al., 2021; Silva et al., 2018).

Uma grande preocupação quando um material é ensilado é a sua capacidade fermentativa. Bactérias produtoras de ácido láctico utilizam açúcares como substrato para a fermentação (Pahlow et al., 2003). Tavares et al. (2024) observaram, em silagens de milho, que com o avanço da maturidade, há redução dos teores de carboidratos solúveis na planta e aumento do amido. Embora os grãos tenham sido colhidos em estágio avançado de maturidade, os valores de pH observados ao longo do período de ensilagem indicam que o processo fermentativo ocorreu de forma satisfatória, uma vez que todos os tratamentos apresentaram pH dentro do intervalo considerado ideal para silagens de grãos reidratados, entre 3,8 e 4,5 (Mombach et al., 2019). Essa faixa de pH é fundamental para a

estabilização da massa ensilada, inibição do crescimento de microrganismos indesejáveis, como fungos e clostrídios, e preservação dos nutrientes.

Os valores de pH mais elevados observados nos tratamentos LB e LHLB podem ser atribuídos, possivelmente, à conversão do ácido láctico em ácido acético e 1,2-propanodiol. O ácido acético é um ácido mais fraco ( $pK_a = 4,76$ ) do que o ácido láctico ( $pK_a = 3,86$ ). Esse mecanismo bioquímico é característico de bactérias heteroláticas obrigatórias (Droin et al., 2019), que provavelmente o fazem como proteção contra a redução do pH que prejudica sua sobrevivência (Olde Elferink et al., 2001). O aumento progressivo do pH no tratamento LB sugere uma adaptação do perfil fermentativo promovida por esse inoculante. A fermentação do ácido láctico pelo *L. buchneri* é um processo lento, estimulado pela redução do pH (Olde Elferink et al., 2001). Dessa forma, o pH estabiliza em tempos mais avançados da fermentação. O aumento e a estabilidade dos valores de pH no tratamento LHLB a partir dos 30 dias reforça a eficiência da combinação entre dois inoculantes. Em silagem de milho inoculada com *L. hilgardii*, Reis et al. (2018) verificaram pH superior à silagem controle já aos 19 dias de ensilagem (3,99 x 3,88) e teores de ácido acético mais elevados (9,0 x 4,2 g kg<sup>-1</sup> de MS). Nesse estudo também foi observado que o 1,2 propanodiol foi produzido pelo *L. hilgardii* também aos 19 dias de ensilagem (0,01 g kg<sup>-1</sup> de MS), produto da fermentação não detectado na silagem controle, reforçando o efeito deste microrganismo nos estágios iniciais de fermentação.

O aumento da concentração de nitrogênio amoniacal ao longo do tempo de ensilagem ocorre devido a proteólise da matriz proteica do milho, que resulta na solubilização das proteínas em compostos nitrogenados simples, como amônia. Durante a ensilagem, esse processo é amplamente mediado por bactérias proteolíticas que atuam em condições anaeróbias, respondendo por aproximadamente 60% da atividade proteolítica, enquanto os 30% restantes resultam de atividades fermentativas intrínsecas ao próprio grão (Jungles et al., 2017). Esse cenário é característico em silagens de grãos reidratados, onde a disponibilidade de substratos fermentáveis favorece a ação microbiana e processos enzimáticos associados.

A redução do teor de zeínas observada a partir dos 45 dias de armazenamento pode ser explicada pela intensificação da fermentação durante o processo de ensilagem, que resulta na degradação das proteínas que compõem a matriz proteica dos grãos de milho. As zeínas são proteínas predominantemente insolúveis, que envolvem os grânulos de amido, limitando a sua acessibilidade às enzimas amilolíticas durante a degradação ruminal (Correa et al., 2002). A degradação dessas proteínas durante o armazenamento potencializa a exposição do amido, contribuindo para a melhora na digestibilidade. O efeito dos inoculantes foi particularmente notável, com os tratamentos inoculados (*L. buchneri* e *L. hilgardii* + *L. buchneri*) apresentando maior degradação de zeínas em relação ao controle. Isso ocorre porque os inoculantes, especialmente os heterofermentativos, promovem a produção de ácidos orgânicos como ácido acético e lático, que podem contribuir para a quebra da estrutura proteica (Silva et al., 2021). A maior queda observada aos 90 dias reflete o prolongamento das atividades enzimáticas e microbianas associadas ao armazenamento prolongado. Isso está em consonância com estudos que indicam que períodos mais longos de ensilagem favorecem alterações significativas na estrutura dos grãos, com aumento da solubilidade das proteínas e consequente melhora na digestibilidade (Jungles et al., 2017). Essa necessidade de tempo para a degradação eficiente da matriz proteica também justifica a recomendação de ensilar o milho reidratado por pelo menos 60 dias (Fernandes et al., 2021).

O maior efeito observado nos tratamentos inoculados, especialmente a partir dos 45 e 60 dias, pode ser atribuído ao fator tempo (Hoffman et al., 2011) e à presença de bactérias ácido-láticas heterofermentativas. Essas bactérias, além de contribuírem para a estabilidade do perfil fermentativo, também aumentam a taxa de degradação proteica devido ao seu papel na modulação das condições fermentativas da silagem (Silva et al., 2018). Em contraste, o tratamento controle apresentou níveis mais baixos de nitrogênio amoniacal, indicando uma menor intensidade de proteólise ao longo do armazenamento.

A estabilidade aeróbia é um parâmetro crucial para a qualidade da silagem, especialmente em sistemas de produção que demandam períodos prolongados de exposição ao ar. No presente estudo,

foi observado que os tratamentos com inoculantes apresentaram maior estabilidade aeróbia em comparação à silagem controle (TC), destacando-se o tratamento LHLB, que atingiu o valor máximo de 288 horas já aos 15 dias de fermentação. Esse comportamento provavelmente ocorreu devido ao aumento na produção de compostos antifúngicos, como o ácido acético e o 1,2-propanodiol, nos tratamentos com inoculantes, o que dificulta o desenvolvimento de fungos e leveduras quando expostos ao ar (Nair et al., 2020; Silva et al., 2021).

No tratamento LB, o mesmo nível de estabilidade foi alcançado aos 30 dias, enquanto a silagem controle demonstrou maior vulnerabilidade à deterioração aeróbia, atingindo o patamar de 288 horas somente aos 45 dias. Essa diferença pode estar associada à ausência de microrganismos específicos que promovem a conversão de metabólitos, como ocorre nos tratamentos inoculados (Kleinschmit e Kung, 2006). Estudos anteriores corroboram esses resultados, apontando que o uso de *Lentilactobacillus buchneri* e *L. hilgardii* melhora a resistência da silagem à deterioração aeróbia devido à produção de metabólitos secundários que inibem a ação de leveduras e fungos (Oude Oferink et al., 2001; Ferrero et al., 2019; Silva et al., 2020).

Adicionalmente, a maior variação no pH durante a exposição aeróbica, registrada nos tratamentos TC e LB aos 15 dias, reflete a maior atividade microbiana inicial em silagens menos protegidas, evidenciando a instabilidade aeróbia característica de materiais fermentados sem adição de inoculantes ou com menor desenvolvimento de compostos estáveis (Ranjit e Kung, 2000). Essas variações no pH estão diretamente associadas ao crescimento de leveduras e outros microrganismos aeróbios, que consomem ácidos orgânicos e carboidratos solúveis, contribuindo para a perda de matéria seca e redução da qualidade da silagem (Borreani et al., 2018).

Os teores de extrato etéreo apresentaram efeito do tempo de armazenamento, indicando uma variação na preservação de lipídios ao longo da fermentação. Embora menos estudada, a interação entre os tratamentos e o tempo de ensilagem sobre a fração de extrato etéreo pode estar relacionada à ação das bactérias heterofermentativas no perfil fermentativo, já que essas podem modificar

indiretamente a produção de ácidos orgânicos que também compõem uma fração do EE. (Bergamaschine et al., 2006).

#### 4.2 Degradabilidade ruminal *in vitro*

A produção de gás está diretamente relacionada a DIVMO (Ovani et al., 2023). A degradação de substratos fermentáveis pelos microrganismos ruminais produz ácidos graxos de cadeia curta, dióxido de carbono, H<sub>2</sub> e metano e a mensuração do gás produzido permite a predição da fermentação ruminal dos alimentos (Blümmel et al., 1997).

Durante a ensilagem de grãos de milho, ocorre a degradação da matriz proteica que envolve os grânulos de amido presentes no endosperma (Hoffman et al., 2011) e liberação de nitrogênio solúvel, que aumenta ao longo do tempo de fermentação (Baron et al., 1986; Arcari et al., 2016; Saylor et al., 2021). Com isso, observa-se o aumento gradativo da degradação da MS (Silva et al., 2019; Fernandes et al., 2021) e do amido (Arcari et al., 2016; Fernandes et al., 2021) ao longo do tempo de ensilagem, principalmente durante os primeiros 60 dias de fermentação, independente do uso de inoculantes. Diferenças observadas na DIVMO aos 15 dias e aos 45 dias entre os inoculantes utilizados podem ter ocorrido devido à diferenças observadas no pH, já que pH mais elevados são mais favoráveis à atividade proteolítica (Oude Elferink et al., 2001), e/ou à diferenças na sucessão microbiana durante o processo fermentativo que ocorre devido à inoculação com *L. buchneri* e/ou *L. hilgardii* (Silva et al., 2020).

Com a solubilização da matriz proteica observada ao longo do tempo, também foi verificado o aumento de K e  $\mu_{0,5}$  e redução de T<sub>0,5</sub>. Esses efeitos são mais pronunciados entre 30 e 45 dias de fermentação, independente do tipo de inoculante utilizado. Dependendo da taxa de passagem da digesta, um T<sub>0,5</sub> mais precoce poderia significar maior degradação ruminal e menor escape de amido para a digestão intestinal. Isso seria importante para aumentar a energia disponível para a síntese de proteína microbiana. Entretanto, em dietas com elevados níveis de amido, poderia aumentar os riscos de acidose ruminal.

## 5 Conclusão

Os resultados deste estudo demonstram que a inoculação com *Lentilactobacillus buchneri* (LB) e sua combinação com *Lentilactobacillus hilgardii* (LHLB) influencia significativamente o perfil fermentativo, a estabilidade aeróbia da silagem de grãos de milho reidratado ao longo do tempo de armazenamento.

Em relação à estabilidade aeróbia, as silagens inoculadas apresentaram maior resistência à deterioração, com destaque para LHLB, que demonstrou maior estabilidade desde os estágios iniciais da fermentação. A degradabilidade ruminal *in vitro* (DIVMO) aumentou ao longo do armazenamento, evidenciando a influência do tempo sobre a digestibilidade do material ensilado.

Com base nesses achados, o inoculante LHLB é recomendado para melhorar a fermentação e a estabilidade aeróbia da silagem de grãos de milho reidratado. Além disso, um período de armazenamento de pelo menos 60 dias mostrou-se ideal, proporcionando maior eficiência na utilização do alimento.

## Referências

- Arcari, M. A., Martins, C. M. D. M. R., Tomazi, T., & dos Santos, M. V. (2016). Effect of the ensiling time of hydrated ground corn on silage composition and in situ starch degradability. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 53(1), 60-71. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v53i1p60-71>
- Arriola, K. G., Vyas, D., Kim, D., Agarussi, M. C., Silva, V. P., Flores, M., ... & Adesogan, A. T. (2021). Effect of *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus buchneri*, or their combination on the fermentation and nutritive value of sorghum silage and corn silage. *Journal of Dairy Science*, 104(9), 9664-9675. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19512>
- Bergamaschine, A. F., Passipiéri, M., Veriano Filho, W. V., Isepon, O. J., & Correa, L. D. A. (2006). Qualidade e valor nutritivo de silagens de capim-marandu (*B. brizantha* cv. Marandu) produzidas com aditivos ou forragem emurchecida. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35, 1454-1462. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000500027>
- Borreani, G., Tabacco, E., Schmidt, R. J., Holmes, B. J., & Muck, R. A. (2018). Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3952-3979. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13837>
- Blümmel, M., Steingäß, H., & Becker, K. (1997). The relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *British Journal of Nutrition*, v. 77, n. 6, p. 911-921. <https://doi.org/10.1079/BJN19970089>
- Correa, C. E. S., Shaver, R. D., Pereira, M. N., Lauer, J. G., & Kohn, K. (2002). Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. *Journal of Dairy Science*, 85(11), 3008-3012. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74386-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74386-5)
- Driehuis, F., Oude Elferink, S. J. W. H., & Van Wikselaar, P. G. (2001). Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without

homofermentative lactic acid bacteria. *Grass and Forage Science*, 56(4), 330-343.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2494.2001.00282.x>

Drouin, P., Tremblay, J., & Chaucheyras-Durand, F. (2019). Dynamic succession of microbiota during ensiling of whole plant corn following inoculation with *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus hilgardii* alone or in combination. *Microorganisms*, 7(12), 595.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms7120595>

Drouin, P., da Silva, É. B., Tremblay, J., Chevaux, E., Apper, E., & Castex, M. (2023). Inoculation with *Lentilactobacillus buchneri* alone or in combination with *Lentilactobacillus hilgardii* modifies gene expression, fermentation profile, and starch digestibility in high-moisture corn. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1253588.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1253588>

Fernandes, J., Silva, E.B., Carvalho-Estrada, P.A., Daniel, J.L.P., Nussio, L.G., 2021. Influence of hybrid, moisture, and length of storage on the fermentation profile and starch digestibility of corn grain silages. *Animal Feed Science. Technology*. 271, 114707.

<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114707>

Kleinschmit, D. H., & Kung Jr, L. (2006). A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. *Journal of Dairy Science*, 89(10), 4005-4013.

[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72444-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72444-4)

Hoffman, P. C., Esser, N. M., Shaver, R. D., Coblenz, W. K., Scott, M. P., Bodnar, A. L., ... & Charley, R. C. (2011). Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. *Journal of Dairy Science*, 94(5), 2465-2474.

<https://doi.org/10.3168/jds.2010-3562>

Mombach, M. A., Pereira, D. H., Pina, D. S., Bolson, D. C., & Pedreira, B. C. (2019). Silage of rehydrated corn grain. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71, 959-966.

<https://doi.org/10.1590/1678-4162-9676>

Nair, J., Huaxin, N., Andrada, E., Yang, H. E., Chevaux, E., Drouin, P., ... & Wang, Y. (2020). Effects of inoculation of corn silage with *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus buchneri* on silage

quality, aerobic stability, nutrient digestibility, and growth performance of growing beef cattle.

*Journal of Animal Science*, 98(10), skaa267. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa267>

Nellis, S. E., Hoffman, P. C., & Shaver, R. D. (2013). A modified method to quantify prolamin proteins in dry and high-moisture corn. *Journal of Dairy Science*, 96(7), 4647-4652.

<https://doi.org/10.3168/jds.2013-6575>

Oude Elferink, S. J., Krooneman, J., Gottschal, J. C., Spoelstra, S. F., Faber, F., & Driehuis, F. (2001).

Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*.

*Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 125-132. [https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.125-](https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.125-132.2001)

[132.2001](https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.125-132.2001)

Pahlow, G., R. E., Muck, F., Driehuis, S. J. W. H., Oude Elferink, & Spoelstra, S. F. (2003).

Microbiology of ensiling. Pages 31–93 in *Silage Science and Technology* (Agronomy Series No.

42). Buxton, D.R., Muck, R. E & Harrison, H.J. ed. *American Society of Agronomy*, Madison, WI.

<https://doi.org/10.2134/agronmonogr42.c2>

Ranjit, N. K., & Kung Jr, L. I. M. I. N. (2000). The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage.

*Journal of Dairy Science*, 83(3), 526-535. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74912-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74912-5)

Silva, C. M., Amaral, P. N. C. D., Baggio, R. A., Tubin, J. S. B., Conte, R. A., Pivo, J. C. D., ... &

Paiano, D. (2016). Estabilidade de silagens de grãos úmidos de milho e milho reidratado. *Revista*

*Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 17, 331-343. [https://doi.org/10.1590/S1519-](https://doi.org/10.1590/S1519-99402016000300001)

[99402016000300001](https://doi.org/10.1590/S1519-99402016000300001)

Silva, E. B., Smith, M. L., Savage, R. M., Polukis, S. A., Drouin, P., & Kung Jr, L. (2021). Effects of

*Lactobacillus hilgardii* 4785 and *Lactobacillus buchneri* 40788 on the bacterial community,

fermentation and aerobic stability of high-moisture corn silage. *Journal of Applied Microbiology*,

130(5), 1481-1493. <https://doi.org/10.1111/jam.14892>

Silva, N. C., Nascimento, C. F., Nascimento, F. A., De Resende, F. D., Daniel, J. L. P., & Siqueira,

G. R. (2018). Fermentation and aerobic stability of rehydrated corn grain silage treated with

different doses of *Lactobacillus buchneri* or a combination of *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Dairy Science*, *101*(5), 4158-4167.

<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13797>

Silvestre, A. M., & Millen, D. D. (2021). The 2019 Brazilian survey on nutritional practices provided by feedlot cattle consulting nutritionists. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *50*, e20200189. <https://doi.org/10.37496/rbz5020200189>

Tavares, Q. G., Volpi, D., Melo, N. N. D., Pereira, L. D. M., Vigne, G. L. D., Zopollatto, M., & Schmidt, P. (2024). Maturity stage at harvest on the chemical composition, fermentation losses, and starch and NDF digestibility of whole-plant corn silages. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *53*, e20230123. <https://doi.org/10.37496/rbz5320230123>