MARCOS ANDRÉ ARCARI

**Efeito da vitreosidade, granulometria e inoculante bacteriano sobre a composição e
qualidade de silagens de milho e sorgo reidratados**

**Pirassununga
2017**

MARCOS ANDRÉ ARCARI

Efeito da vitreosidade, granulometria e inoculante bacteriano sobre a composição e qualidade de silagens de milho e sorgo reidratados

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos

Co-orientador:

Prof. Dr. Francisco Palma Rennó

De acordo: _____

Orientador

Pirassununga
2017

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3561	Arcari, Marcos André
FMVZ	Efeito da vitreosidade, granulometria e inoculante bacteriano sobre a composição e qualidade de silagens de milho e sorgo reidratados/ Marcos André Arcari. -- 2017.
	166 p. : il.
	Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2017.
	Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal. Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.
	Orientador: Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos.
	Coorientador: Prof. Dr. Francisco Palma Rennó
	1. Amido. 2. Ensilagem. 3. Proteína. 4. Granulometria. 5. Vitreosidade. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Disponibilidade ruminal de amido, teor e degradabilidade da proteína bruta em dietas a base de silagem cana-de-açúcar para vacas leiteiras", protocolado sob o nº 2671/2012, utilizando 12 (doze) vacas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/8/2012.

We certify that the Research "Ruminal starch availability, level and degradability of crude protein in diets based on sugarcane silage for dairy cows", protocol number 2671/2012, utilizing 12 (twelve) cows, under the responsibility Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/15/2012.

São Paulo, 16 de agosto de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ARCARI, Marcos André

Título: Efeito da vitreosidade, granulometria e inoculante bacteriano sobre a composição e qualidade de silagens de milho e sorgo reidratados

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico aos meus pais Gildo e Isolda que me deram estrutura para trilhar o difícil caminho da superação. A minha esposa Alessandra que me apoiou durante toda essa estrada. E aos meus filhos Miguel e Heitor que mantem vivo o ímpetuo de percorrer os caminhos da vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Marcos Veiga dos Santos, o meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que transpira sabedoria; meu respeito e admiração pela sua serenidade, capacidade de análise do perfil de seus alunos, e pelo seu Dom no ensino da Ciência, inibindo sempre a vaidade em prol da simplicidade e eficiência.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus por me presentear com a vida de meus dois filhos, Miguel e Heitor crianças que transbordam alegria e vivem intensamente as curiosas descobertas da infância, nos reensinando as verdadeiras alegrias da vida.

À minha família, em especial à minha esposa Alessandra, meu pai Gildo minha mãe Isolda e aos meus irmãos Mauro, Ivania e a Paula (in memoriam) pela hospitalidade, estímulo e paciência.

A equipe de trabalho (Tiago, Bruna, Dani, Juliano, Zeca, Camila, Larissa, Alessandra, Dannylo e em especial ao Cristian) e tantos outros membros ou não do Departamento de Nutrição e Produção Animal VNP, que nessa longa estrada emprestaram sua amizade, seu conhecimento, seus braços, seu tempo, seu sono, seus fins de semana e seu bom humor para me auxiliar a tornar alguns grãos de milho molhados em ciência.

A todos os professores que contribuíram, repartindo seus conhecimentos ou recursos para me mostrar o caminho do conhecimento.

Ao apoio financeiro fornecido na forma de bolsa de estudos pela FAPESP (Processo nº 2014/20877-7) e pela CAPES que possibilitaram a realização do presente trabalho.

A 140 vacas leiteiras, em especial a Judith, que estiveram em meu caminho durante todos os experimentos, para que eu pudesse errar com elas, para aprender a acertar com outras.

Resumo

ARCARI, M. A. **Efeito da vitreosidade, granulometria e inoculante bacteriano sobre a composição e qualidade de silagens de milho e sorgo reidratados. [Effect of vitreousness, granulometry and bacterial inoculant on the composition and quality of rehydrated corn and sorghum silages]**. 2017. 166 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

Estudos prévios indicaram que a reidratação e ensilagem de milho moído aumentam a digestibilidade do amido de acordo com o avanço do tempo de ensilagem. Deste modo, a substituição do milho seco moído por silagem de milho reidratado (SMR) na dieta de vacas leiteiras pode aumentar a digestibilidade do amido e da proteína dos grãos, e consequentemente o desempenho de vacas leiteiras. Entretanto, ainda não foram realizados estudos que avaliaram a influência da granulometria, uso de inoculante bacteriano e vitreosidade de grãos de milho e sorgo sobre a composição, qualidade e digestibilidade da SMR ao longo do tempo de ensilagem. Além disso, são escassos os estudos sobre a inclusão de silagem de milho reidratado em dietas de vacas leiteiras com variação do teor de PB e de proteína degradável no rúmen (PDR). Para investigar a influência do uso de inoculante, da granulometria, do teor de vitreosidade e do tempo de ensilagem sobre as características de composição da silagem de milho e sorgo reidratado e da variação do teor e degradabilidade da proteína em dietas de vacas leiteiras que utilizam SMR foram desenvolvidos um conjunto de 5 experimentos. As variáveis resposta avaliadas foram o desempenho produtivo e balanço de nitrogênio de vacas leiteiras alimentadas com SMR (Exp 1 e 2) e a composição química, o perfil fermentativo e a digestibilidade do amido e da proteína da silagem ao longo do período de ensilagem (Exp 3, 4 e 5). Desta forma, este estudo foi organizado em 5 experimentos sequenciais, sendo dois (Exp. 1 e 2) com uso de vacas em lactação e os demais (Exp. 3, 4 e 5) com o uso de mini-silos experimentais. Os objetivos específicos dos Exp. 1 e 2 foram avaliar o efeito de: 1) teor de proteína bruta (130, 160 e 180 g PB/kg MS) em dietas de vacas leiteiras com substituição total do milho seco moído por SMR, 2) teor de proteína degradável no rúmen (PDR) por meio da variação do teor de ureia da dieta de vacas leiteiras (80, 100 e 120 g PDR/kg PB) com substituição total do milho seco moído por SMR. Para os Exp. 1 e 2, foram utilizadas 15 vacas Holandesas em estágio intermediário de lactação ($> 100 < 200$ dias), com peso vivo de aproximadamente 550 kg, distribuídas em delineamento quadrado latino com 5 quadrados

contemporâneos 3 × 3 com 3 períodos de 21 dias e 3 tratamentos. As vacas foram alojadas em estábulo tipo “free-stall”, alimentadas duas vezes ao dia com controle individual de consumo de alimentos e regime de duas ordenhas/dia. Nos Exp. 1 e 2, as variáveis resposta avaliadas foram: consumo de nutrientes, digestibilidade aparente total, produção e composição do leite, parâmetros fermentativos do rúmen e balanço de nitrogênio. Os Exp. 3, 4 e 5 foram realizados em mini silos experimentais (500g) com silagem de milho e sorgo reidratados, cujos objetivos foram avaliar sobre as variáveis resposta, respectivamente, o efeito de: 3) do teor de vitreosidade (baixo, médio e alta) de 3 cultivares de milho, da inclusão de inoculante (*Lactobacillus buchneri*) ou não e do tempo de ensilagem (0, 15, 30, 60, 120, 240 e 400 dias); 4) granulometria (inteiro, 8, 2 e 1mm) de milho alta vitreosidade, do uso de inoculante (controle ou *Lactobacillus buchneri*) e do tempo de ensilagem (0, 15, 30, 60, 120, 240 e 400 dias); 5) granulometria (8, 2 e 1mm) de 1 cultivar de sorgo, do uso de inoculante (Controle; *Lactobacillus buchneri*; *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici* e *Lactobacillus buchneri* (50%) + *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici* (50%)) e do efeito do tempo de ensilagem (0, 15, 30, 120 e 360 dias). As variáveis resposta analisadas nos experimentos 3, 4 e 5 foram a composição química da silagem (MS, PB, proteína solúvel, amido, N-NH₃, pH) e digestibilidade *in situ* em 7 horas do amido e da proteína da silagem. Para o experimento 5 foram ainda avaliados a produção e composição dos gases de fermentação. A silagem de grãos de milho e sorgo reidratados apresentaram características peculiares de fermentação e aumento de digestibilidade de acordo com o tamanho de partícula, vitreosidade, uso de inoculante ao longo do tempo de ensilagem. Os resultados observados no presente conjunto de experimentos sugerem que particularidades inerentes ao processamento prévio a ensilagem, inoculação ou aos híbridos utilizados para confecção da silagem podem influenciar na melhoria da conservação e digestibilidade da silagem. Além disso, o uso de silagem de milho reidratado, mesmo apresentando alta digestibilidade aparente total do amido, não possibilitou o uso de menor teor de PB ou maior teor de PDR que aqueles preditos pelo NRC 2001.

Palavra-chave: Amido. Ensilagem. Proteína. Granulometria. Vitreosidade

Abstract

ARCARI, M. A. Effect of vitreousness, granulometry and bacterial inoculant on the composition and quality of rehydrated corn and sorghum silages. [Efeito da vitreosidade, granulometria e inoculante bacteriano sobre a composição e qualidade de silagens de milho e sorgo reidratados]. 2017. 166 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

Previous studies have indicated that the inclusion of ground rehydrated corn silage (RCS) in dairy cows diet can increase the starch digestibility and the grain protein, increasing the dairy cows performance. However, no studies were carried out to evaluate the influence of grain particle size, bacterial inoculant use and grain vitreousness of corn and sorghum on the composition, quality and digestibility of RCS throughout the ensiling time. In addition, there are few studies about inclusion of RCS in dairy cows diet with some variation of CP content and rumen degradable protein (RDP). To investigate the influence of inoculant use, granulometry, vitreousness content and ensilage time on the chemical composition of ground rehydrated corn and sorghum silage, and the protein content variation and degradability in dairy cow diets, there were developed a set of 5 experiments. The variables evaluated were the productive performance and nitrogen balance of dairy cows fed RCS (Exp 1 and 2) and the chemical composition, fermentative profile and digestibility of the silage and starch during the ensiling time (Exp 3, 4 and 5). Thus, this study was organized in 5 sequential experiments, in which two of them (Exp. 1 and 2) used lactating cows and the others (Exp 3, 4 and 5) used experimental mini silos. The specific objectives of Exp. 1 and 2 were to evaluate the effect in dairy cows diet of: 1) CP content (130, 160 and 180 g CP/kg DM) with total substitution by RCS, 2) RDP content by urea content variation (80, 100 and 120 g RDP / kg PB) with total substitution of ground dry corn by RCS. For Exp. 1 and 2, there were used 15 Holstein cows in third lactation (> 100 <200 days), approximately 550 kg BW, distributed in a 3 × 3 latin square design with 5 contemporary squares, with 3 periods of 21 days and 3 treatments. The cows were allocated in a free-stall, fed twice a day with a feed intake individual control and twice milking per day. In Exp. 1 and 2, the variables evaluated were: nutrient intake, total apparent digestibility, milk yield and composition, rumen fermentative parameters and nitrogen balance. The experiments 3, 4 and 5 were carried out in experimental mini silos (500g) with rehydrated corn and sorghum silages, that aimed to evaluate the effect of: 3) the vitreousness content (low, medium and high) of corn cultivars,

the inclusion of inoculant (*Lactobacillus buchneri*) or not and the ensilage time (0, 15, 30, 60, 120, 240 and 400 days); 4) granulometry (whole, 8, 2 and 1mm) of high vitreousness corn, the inclusion or not of inoculant (*Lactobacillus buchneri*) and the ensilage time (0, 15, 30, 60, 120, 240 and 400 days); 5) granulometry (8, 2 and 1 mm), bacterial inoculant (*Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus buchneri* (50%) + *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici* (50%)) and the ensiling time (0, 15, 30, 120 and 360 days) of rehydrated sorghum grain. The variables analyzed in experiments 3, 4 and 5 were the chemical composition of silage (DM, CP, soluble protein, starch, N-NH₃ and pH) and 7-hour *in situ* digestibility of the starch and silage protein. For the experiment 5, the production and composition of the rumen fermentation gases were also evaluated. The rehydrated corn and sorghum silages has particular characteristics of fermentation and increase the digestibility according to the particle size, vitreousness and use of inoculant throughout the ensiling time. The results observed in the present set of experiments suggest that the particularities associated with the previous ensiling process, inoculation or the hybrids used to make the silage may influence the conservation and the digestibility. In addition, the use of rehydrated corn silage, even with high starch apparent total digestibility, did not allow the use of lower CP content or higher RDP content than those predicted by NRC 2001.

Keyword: Starch. Silage. Protein. Granulometry. Vitreousness

Lista de Tabelas

Tabela 1- Composição química média do grão de milho seco indicado nas estruturas físicas específicas do grão.	28
Tabela 2- Composição química, teor médio de vitreosidade, tamanho médio de partícula e uso de inoculante (<i>Lactobacillus buchneri</i>) do milho moído utilizado para a confecção da silagem de milho reidratado.....	69
Tabela 3- Análise estatística do efeito da vitreosidade, tempo de ensilagem e inoculação bacteriana sobre a composição química, produtos de fermentação e digestibilidade <i>in situ</i> de grãos de milho reidratados e ensilados.	71
Tabela 4- Composição química e tamanho médio de partícula (μm) e uso de inoculante (<i>Lactobacillus buchneri</i> - i) do milho moído utilizado para confecção da silagem de milho reidratado.	Erro! Indicador não definido.
Tabela 5- Análise estatística do efeito do tamanho de partícula, tempo e inoculação bacteriana sobre a composição química, produtos da fermentação e digestibilidade <i>in situ</i> do amido e da proteína da silagem de milho reidratado ao longo do tempo de ensilagem.	93
Tabela 6- Composição química, tamanho médio de partícula do sorgo moído utilizado para a confecção da silagem.	115
Tabela 7- Efeito do tamanho de partícula, inoculante e tempo de fermentação sobre o pH, composição química, conservação, digestibilidade e gases da silagem de sorgo reidratado	119
Tabela 8- Ingredientes e composição química das dietas experimentais.....	146
Tabela 9- Composição química do milho seco, silagem de milho reidratado, silagem de cana de açúcar e farelo de soja.	149
Tabela 10- Consumo de nutrientes em relação ao teor e degradabilidade da proteína da dieta.....	153
Tabela 11- Efeito do teor e degradabilidade da proteína da dieta sobre a produção e composição do leite.	155
Tabela 12- Médias ajustadas para o efeito do teor e degradabilidade da proteína sobre a fermentação ruminal.	156
Tabela 13- Médias ajustadas para balanço de nitrogênio em relação ao teor e degradabilidade da proteína da dieta.	157

Lista de Figuras

Figura 1- Teor de MS, amido e valor de pH da silagem de milho reidratado de baixa vitreosidade controle (BVc) □ ; milho de baixa vitreosidade inoculado (BVi) ■ ; média vitreosidade controle (MVc) △ ; média vitreosidade inoculado (MVi) ▲ ; alta vitreosidade controle (AVc) ○ ; alta vitreosidade inoculado (AVi) ● 73

Figura 2- Teor de PB, PS%PB total e N-NH₃%PB da silagem de milho reidratado de baixa vitreosidade controle (BVc) □ ; milho de baixa vitreosidade inoculado (BVi) ■ ; média vitreosidade controle (MVc) △ ; média vitreosidade inoculado (MVi) ▲ ; alta vitreosidade controle (AVc) ○ ; alta vitreosidade inoculado (AVi) ● 75

Figura 3- Teor de ácido láctico (%MS) e concentração ácido acético (mmol/L) da silagem de milho reidratado de baixa vitreosidade controle (BVc) □ ; milho de baixa vitreosidade inoculado (BVi) ■ ; média vitreosidade controle (MVc) △ ; média vitreosidade inoculado (MVi) ▲ ; alta vitreosidade controle (AVc) ○ ; alta vitreosidade inoculado (AVi) ● 77

Figura 4- Digestibilidade *in situ* em 7 h do amido e da PB da silagem de milho reidratado de baixa vitreosidade controle (BVc) □ ; milho de baixa vitreosidade inoculado (BVi) ■ , média vitreosidade controle (MVc) △ ; média vitreosidade inoculado (MVi) ▲ ; alta vitreosidade controle (AVc) ○ ; alta vitreosidade inoculado (AVi) ● 79

Figura 5 - pH, teor de amido e teor MS da silagem de milho reidratado moído fino controle (MFc) □ ; milho moído fino inoculado (MFi) ■ , moagem média controle (MMc) △ ; moagem média inoculado (MMi) ▲ ; moagem grossa controle (MGc) ○ ; moagem grossa inoculado (MGi) ● ; ensilado sem moagem controle (SMc) ◇ ; ensilado sem moagem inoculado (SMi) ◆ 95

Figura 6- Teor de PB, teor de proteína solúvel em percentual da PB (PS%PB) e N-NH₃ % nitrogênio total da silagem de milho reidratado moído fino controle (MFc) □ ; milho moído fino inoculado (MFi) ■ ; moagem média controle (MMc) △ ; moagem média inoculado (MMi) ▲ ; moagem grossa controle (MGc) ○ ; moagem grossa inoculado (MGi) ● ; ensilado sem moagem controle (SMc) ◇ ; ensilado sem moagem inoculado (SMi) ◆ 97

Figura 7- Teor de ácido láctico (%MS) e ácido acético (mmol/l) da silagem de milho reidratado moído fino controle (MFc) □ ; milho moído fino inoculado (MFi) ■ ; moagem média controle (MMc) △ ; moagem média inoculado (MMi) ▲ ; moagem grossa controle (MGc) ○ ; moagem grossa inoculado (MGi) ● ; ensilado sem moagem controle (SMc) ◇ ; ensilado sem moagem inoculado (SMi) ◆ 99

Figura 8- Digestibilidade <i>in situ</i> em 7 horas do amido e da PB da silagem de milho reidratado moído fino controle (MFc) □ ; milho moído fino inoculado (MFi) ■; moagem média controle (MMc) △ ; moagem média inoculado (MMi) ▲ ; moagem grossa controle (MGc) ○ ; moagem grossa inoculado (MGi) ● ; ensilado sem moagem controle (SMc) ◇ ; ensilado sem moagem inoculado (SMi) ◆ .	101
Figura 9- Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre o teor de MS da silagem de sorgo reidratado.	120
Figura 10- Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre o pH da silagem de sorgo reidratado.	121
Figura 11- Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre o teor de amido da silagem de sorgo reidratado.	121
Figura 12- Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre o teor de PB da silagem de sorgo reidratado.	122
Figura 13- Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre o teor de proteína solúvel da silagem de sorgo reidratado.	123
Figura 14- Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre o teor de nitrogênio amoniacal em relação a proteína bruta da silagem de sorgo reidratado.	123
Figura 15- Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre o teor de ácido láctico (%MS) da silagem de sorgo reidratado.	124
Figura 16- Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre o teor de ácido acético (mmol/L) da silagem de sorgo reidratado.	125
Figura 17- Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre o tempo necessário para a perda da estabilidade aeróbica da silagem (2°C acima da temperatura ambiente).	126
Figura 18- Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre a perda de peso em % da matéria natural da silagem de sorgo reidratado.	127
Figura 19- Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre a digestibilidade da MS da silagem de sorgo reidratado.	128
Figura 20- Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre a digestibilidade do amido da silagem de sorgo reidratado.	128

Lista de Abreviações

AGCC – ácidos graxos de cadeia curta
AV – alta vitreosidade
AVc – alta vitreosidade controle
AVi – alta vitreosidade inoculado
BV – baixa vitreosidade
BVc – baixa vitreosidade controle
BVi – baixa vitreosidade controle
C- controle
CNF – carboidrato não fibroso
ECC – escorre de condição corporal
FDN – fibra em detergente neutro
I – inoculante
LB – *Lactobacillus buchneri*
LBpp - *Lactobacillus buchneri* + *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici*
LEL – low explosive limit
MF – moagem fina
MFc – moagem fina controle
MFi – moagem fina inoculado
MG – moagem grosseira
MGc – moagem grosseira controle
MGi – moagem grosseira inoculada
MM – moagem média
MMc – moagem média controle
MMi – moagem média inoculado
MS – matéria seca
MV – média vitreosidade
MVc – média vitreosidade controle
MVi – média vitreosidade controle
PB – proteína bruta
PDR – proteína degradável no rumen
PL – produção de leite
PLCG – produção de leite corrigido para gordura
PNDR – proteína degradável no rumen
PP – *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici*
SM – sem moagem
Ic – ensilado inteiro sem inoculante
Ii – ensilado inteiro inoculado
SMR – silagem de milho reidratado
SSR – silagem de sorgo reidratado
T – tempo
TMR – total mixed ration
TP – tamanho de partícula

SUMÁRIO

Capítulo 1	20
1.1 Introdução.....	21
1.2 Objetivos Geral e Específicos.....	23
1.2.1 Geral.....	23
1.2.2 Específicos:.....	23
2 Capítulo 2.....	25
2.1 Revisão de literatura.....	26
2.1.1 Milho	26
2.1.2 Características do grão de milho	27
2.1.3 Prolaminas	28
2.1.4 Sorgo	30
2.1.5 Kafirina.....	32
2.1.6 Amido.....	34
2.1.7 Amido na nutrição de ruminantes	35
2.1.8 Degradabilidade ruminal do amido	37
2.1.9 Processamento do grão de milho sobre e a degradabilidade ruminal	38
2.1.10 Milho e sorgo na alimentação de ruminantes	39
2.1.11 Milho e sorgo reidratados e ensilados	41
2.1.12 Efeito da ensilagem sobre a digestibilidade do amido	42
2.1.13 Grãos ensilados	44
2.1.14 Inoculantes na ensilagem de grãos.....	45
2.1.15 Balanceamento de amido na dieta de vacas leiteiras	46
2.1.16 Referências Bibliográficas.....	51
3 Capítulo 3.....	65
3.1 Efeito do tempo de ensilagem, vitreosidade e uso de inoculante bacteriano sobre composição e digestibilidade <i>in situ</i> da silagem de milho reidratado.	66
3.1.1 Resumo	66
3.1.2 Introdução.....	67
3.1.3 Material e Métodos	68
3.1.4 Análise Estatística	70
3.2 Resultados.....	71
3.2.1 Discussão	79

3.2.2	Conclusão	83
3.2.3	Referências bibliográficas	84
4	Capítulo 4.....	87
4.1	Efeito do tempo de ensilagem, tamanho de partícula e uso de inoculante bacteriano sobre a composição e digestibilidade <i>in situ</i> da silagem de grãos de milho reidratados.	88
4.1.1	Resumo	88
4.1.2	Introdução.....	89
4.1.3	Material e Métodos	90
4.1.4	Análise Estatística	92
4.1.5	Resultados.....	92
4.1.6	Discussão.....	101
4.1.7	Conclusão	106
4.1.8	Referências bibliográficas	106
5	Capítulo 5.....	110
5.1	Efeito do tempo de ensilagem, tamanho de partícula e uso de inoculante sobre a composição química, produção de gases e digestibilidade <i>in situ</i> da silagem de sorgo reidratado.	111
5.1.1	Resumo	111
5.2	Introdução.....	113
5.2.1	Materiais e métodos	114
5.2.2	Delineamento experimental e arranjos de tratamentos	114
5.2.3	Análise Estatística	118
5.2.4	Resultados.....	118
5.2.5	Discussão.....	131
5.2.6	Conclusão	136
5.2.7	Referências bibliográficas	137
6	Capítulo 6.....	141
6.1	Efeito do teor e degradabilidade da proteína bruta da dieta sobre o desempenho de vacas leiteiras utilizando silagem de milho reidratado.	142
6.1.1	Resumo	142
6.1.2	Introdução.....	143
6.1.3	Material e Métodos	144
6.1.4	Dietas e Manejo alimentar.....	144
6.1.5	Coleta de amostras e análises	147

6.1.6 Coleta de amostras e análises químicas do leite	149
6.1.7 Digestibilidade aparente do trato total, coleta e análise de urina e líquido ruminal.....	149
6.1.8 Análises de fluido ruminal e urina	150
6.1.9 Análise estatística.....	151
6.1.10 Resultados.....	151
6.1.11 Consumo de nutrientes e digestibilidade aparente total	151
6.1.12 Produção e composição do leite.....	153
6.1.13 Produção de Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC), N-NH ₃ e pH ruminal	155
6.1.14 Determinação do Balanço de nitrogênio e eficiência do uso de nitrogênio para o leite.....	156
6.1.15 Discussão	157
6.1.16 Conclusão	161
6.1.17 Referências Bibliográficas.....	163

Capitulo 1

1.1 Introdução

A importância econômica e nutricional dos cereais amiláceos, como o milho e o sorgo, na pecuária leiteira está relacionada com as características de composição química, eficiência de aproveitamento e estruturação de mercado. O milho, principal cereal utilizado na pecuária, tem 70% de sua produção destinada à alimentação animal, podendo este percentual ser maior em países desenvolvidos. O restante da produção destina-se ao consumo humano, de forma direta ou indireta (PAES, 2008). O consumo de milho no Brasil está principalmente distribuído em três principais setores: a avicultura (57,9%), a suinocultura (26,5%) e os destinados à alimentação de ruminantes 8,4%, sendo o restante destinado a outras espécies (ABIMILHO, 2014). Já o sorgo, que é usado principalmente como substituto do milho em razão da semelhança de composição, possui menor disponibilidade de mercado e limitações nutricionais, como a menor digestibilidade do amido, tornando-o menos atraente que o milho para nutrição animal.

O amido é o principal carboidrato dos grãos de milho e sorgo e constitui a principal fonte de energia em dietas de vacas em lactação de média e alta produção. Este carboidrato representa em torno de 70 a 80% da matéria seca (MS) da maioria dos grãos de cereais e na forma isolada pode ser 100% digestível (FIRKINS et al., 2001). Entretanto, a maioria dos híbridos de milho e de sorgo, cultivados no Brasil, produz grãos com alta vitreosidade, característica definida pela elevada quantidade de matriz proteica presente no endosperma revestindo os grânulos de amido, o que reduz a digestibilidade do amido (PEREIRA et al., 2004). O uso de variedades de milho com maiores percentuais de endosperma vítreo resulta em menor digestibilidade ruminal do amido *in vitro* ou *in situ* (CORREA et al., 2002; NGONYAMO-MAJEE et al., 2008) e digestibilidade total do amido *in vivo* (ALLEN et al., 2008), o que resulta em decréscimo da produção de leite (TAYLOR & ALLEN, 2005). Portanto, otimizar a digestibilidade do amido do milho e sorgo, em dietas de vacas leiteiras, é fundamental para maximizar/otimizar a produção de leite (PIRES et al., 2008).

Além das características de endosperma do milho e sorgo, o tipo de processamento dos grãos exerce influência sobre a digestibilidade do amido (OWENS et al., 1986, THEURER, 1986). A maioria dos processamentos dos grãos aumenta a exposição dos grânulos de amido e facilita os processos enzimáticos de degradação e digestão do amido pela microbiota ruminal (BEAUCHIMIN et al., 1994). A formação de fissuras, quebra em variados tamanhos de

partícula ou expansão do grânulo de amido, tornam mais fácil o acesso e ação das enzimas bacterianas e digestivas do animal ao grânulo de amido (KOTARSKI et al., 1992). Entretanto, a maioria dos processamentos do milho e do sorgo que não utilizam calor, umidade e pressão ou a combinação destes, atuam menor efetividade sobre a barreira imposta pela matriz proteica dos grãos.

O uso de silagem de grãos úmidos, que é produzida pela colheita do grão em estágio de imaturidade incompleta (35 – 38% MS), seguida por moagem grosseira e posterior ensilagem, oferece uma alternativa para melhorar a digestibilidade do amido. Esta técnica demonstrou ser capaz de aumentar a digestibilidade ruminal do amido do milho em comparação com o uso de grãos secos (OBA & ALLEN, 2003; BRADFORD & ALLEN, 2007). O processo de ensilagem de grão úmido aumenta a digestibilidade do amido através do processo de proteólise da matriz proteica que envolve os grânulos de amido, principalmente pela ação das proteases produzidas por microrganismos fermentadores (BARON et al., 1986; HOFFMAN et al., 2011). Embora o processo de ensilagem seja considerado um método clássico de conservação, esta técnica tem o potencial de aumentar a digestibilidade do amido. O aumento da digestibilidade do amido de acordo com o tempo de ensilagem pode ser explicado pela ação das proteases bacterianas e do próprio grão sobre a matriz proteica do endosperma de silagem de grão úmido, durante a ensilagem (HOFFMAN et al., 2011). A ensilagem do grão de milho em estágio de maturidade conhecido como linha negra é uma alternativa de aumento de degradação a matriz proteica que envolve o grânulo de amido. Entretanto, a confecção da silagem de grão úmido apresenta limitações operacionais e climáticas. Alternativamente à confecção da silagem de grão úmido, a ensilagem do milho colhido com elevado teor de MS, processado por moagem, reidratado e ensilado, permite flexibilizar e viabilizar as eventuais limitações ligadas à falta de equipamentos eficazes para colher milho com umidade alta, necessidade de processamentos mais intensos, atrasos na colheita, adversidades climáticas ou a impossibilidade de produção do grão na propriedade.

Estudos prévios que avaliaram a digestibilidade de fontes de amido utilizaram com sucesso silagem de grão úmido ou milho floculado como meios de aumento na digestibilidade do amido (KNOWLTON et al., 1998; OBA & ALLEN, 2003; BRADFORD & ALLEN, 2007). Entretanto, devido a importância da técnica de reidratação e ensilagem de grãos de milho e sorgo apresentam como opção a confecção de silagem de grãos úmidos e ao uso de grãos secos, é necessário que sejam desenvolvidos estudos sobre a avaliação da composição digestibilidade da silagem, assim como a interação deste tipo de silagem com dietas com diferentes teores e degradabilidades de PB para vacas leiteiras.

1.2 Objetivos Geral e Específicos

1.2.1 Geral

Para testar as hipóteses propostas, o objetivo geral do presente estudo foi avaliar em nível de silo experimentais, o efeito do teor de vitreosidade, do uso de inoculante, da granulometria e tempo de ensilagem de grãos de milho e sorgo sobre composição e a digestibilidade *in situ* do amido e da proteína em relação de silagens de milho e sorgo reidratados. Além disso, foi objetivo avaliar o efeito da substituição milho moído por silagem de milho reidratado em dietas de vacas leiteiras com diferentes teores PB e de degradabilidade da PB.

1.2.2 Específicos:

Os objetivos específicos deste estudo foram os de avaliar o efeito de (descritos, respectivamente, de acordo com os Exp. 1 a 5):

- 1 –três teores de PB na dieta e da substituição de milho moído por SMR na dieta de vacas leiteiras sobre a produção e composição do leite, e excreção de nitrogênio;
- 2- três níveis de degradabilidade da PB e da substituição de milho moído por SMR na dieta de vacas leiteiras sobre a produção e composição do leite, e excreção de nitrogênio.
- 3- teor de vitreosidade (baixa, média e alta), da inclusão inoculante bacteriano (*Lactobacillus buchneri*) e do tempo de ensilagem (0, 15, 30, 60, 120, 240 e 400 dias) sobre a fermentação e composição química, digestibilidade *in situ* em 7 horas do amido e da proteína da SMR;
- 4- granulometria (inteiro, 8, 2 e 1mm), da inclusão inoculante bacteriano (*Lactobacillus buchneri*) e do tempo de ensilagem (0, 15, 30, 60, 120, 240 e 400 dias) sobre a fermentação e composição química da silagem de milho reidratado e digestibilidade em *in situ* em 7 horas do amido e da proteína da SMR de alta vitreosidade;
- 5- granulometria (8, 2 e 1mm), da inclusão inoculante bacteriano (*Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum* + *Pediococcus acidilactici* e mistura de *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici*), do tempo de ensilagem (0, 15, 30 120 e 360 dias) sobre a fermentação, composição química, produção de gás e estabilidade aeróbica

da silagem e digestibilidade *in situ* em 7 horas do amido e da proteína da silagem de sorgo reidratado.

2 *Capítulo 2*

2.1 Revisão de literatura

2.1.1 Milho

A caracterização das estruturas que compõem o grão do milho assim como a caracterização das potencialidades e limitações do uso do milho na nutrição animal são importantes, pois este é o principal cereal utilizado em dietas para vacas leiteiras no Brasil e no mundo. Em uma revisão de 41 estudos, que avaliaram a digestibilidade ruminal e total do amido dietético foi observado que mais de 50% das 161 dietas avaliadas utilizaram o grão de milho como fonte principal de amido. O volume de uso deste grão no âmbito das pesquisas reflete a predominância e importância deste grão como fonte de energia na nutrição de vacas leiteiras. Além de ser a fonte de amido predominante nos estudos, o grão de milho também foi a fonte de amido que apresentou maior variabilidade na digestibilidade ruminal entre os estudos, o que sugere a necessidade de estudos sobre fatores que levam a variabilidade de resultados (PATTON et al., 2012).

A composição média em base seca do grão de milho gira em torno de 72% de amido, 9,5% proteínas, 9% fibra (a maioria resíduo detergente neutro) e 4% de óleo (PAES, 2008). As quatro principais estruturas físicas do grão de milho são: endosperma, gérmen, pericarpo (casca) e pedicelo ou ponta. O endosperma é responsável por cerca de 83% da MS do grão. O principal componente do endosperma é o amido (88%), o qual está organizado na forma de grânulos. No endosperma estão também presentes as proteínas de reserva (8%) do tipo prolaminas. Essas proteínas formam os corpos proteicos que compõem a matriz que envolve os grânulos de amido dentro das células no endosperma. No endosperma, especificamente, na camada de aleurona e no endosperma vítreo, estão presentes os carotenoides, substâncias lipídicas que conferem a cor ao grão de milho, entre os quais a zeaxantina, luteína, beta-criptoxantina, alfa e beta carotenos são os principais carotenoides nos grãos de milho (PAES, 2008).

O gérmen representa 11% do grão de milho e concentra quase a totalidade dos lipídeos e dos minerais do grão, além de conter elevados teores de proteínas (26%) e açúcares (70%). O gérmen é considerado o embrião do grão e deste modo é a fração viva do grão e onde estão presentes as proteínas do tipo albuminas, globulinas e glutelinas, que diferem em composição e organização molecular em relação àqueles presentes no endosperma (PAES, 2008). As

proteínas de reserva, encontradas em maior abundância no grão de milho, são ricas em aminoácidos metionina e cisteína, mas são pobres em lisina e triptofano. Por esse motivo, a qualidade da proteína, em variedades de milho não manipulados geneticamente para alterar as características proteicas do grão, é baixa, e correspondente a 65% daqueles presentes no leite, considerada um padrão para a nutrição humana. Por outro lado, as proteínas de reserva possuem quantidades elevadas dos aminoácidos glutamina, leucina, alanina e prolina, que conferem alta hidrofobicidade ao resíduo proteico extraído do endosperma no processo de produção do amido de milho (SHOTWELL & LARKINS, 1989).

O pericarpo representa, em média, 5% do grão, cuja função é proteger as outras estruturas do grão da umidade elevada do ambiente, de insetos e de microrganismos. As camadas de células que compõem essa fração são constituídas de polissacarídeos do tipo hemicelulose (67%) e celulose (23%), embora também contenha lignina (0,1%). A estrutura de menor importância em relação às características nutritivas e também ao peso do grão é a ponta. Representa aproximadamente 2% do grão, e é responsável pela conexão do grão ao sabugo, sendo a única área do grão não coberta pelo pericarpo. Sua composição é essencialmente de material lignocelulósico (PAES, 2008).

A principal estrutura de importância no uso deste cereal como concentrado energético é o endosperma. Esta estrutura representa a maior parte do peso seco do grão, consistindo principalmente de amido (88%), organizado na forma de grânulos (NATIONAL CORN GROWERS ASSOCIATION - NCGA, 2007). Entretanto, os grânulos de amido são envolvidos pelas proteínas de reserva (SHEWRY & HALFORD 2002). O conteúdo de proteína no grão de milho varia de 8-11% e as proteínas de reserva correspondem a 70-80% da proteína total do grão de milho. Estas proteínas estão associadas ao amido nos grãos de todos os cereais e têm nomes específicos, como a gliadina do trigo, a kafirina do sorgo e a zeína do milho a qual representa de 30 a 60% de toda a proteína presente no grão (HAMAKER et al., 1995).

2.1.2 Características do grão de milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta monoica que pertence à família Gramineae/Poaceae. O resultado geral da seleção natural e da domesticação foi a produção de uma planta anual, com um a quatro metros de altura, desenvolvida para a produção de grãos. Portanto, o interesse nessa cultura está na produção de grãos, para alimentação humana e animal, e também para a produção de forragem, (MAGALHÃES & DURÃES, 2006).

A planta de milho uma das mais eficientes armazenadoras de energia existentes na natureza. De uma semente que pesa pouco mais de 0,3 g essa planta poderá produzir até 1.000 grãos (ALDRICH et al., 1982). Os grãos de milho além de ricos em energia são conhecidos botanicamente por uma cariopse, e são formados por quatro principais estruturas (Tabela 1). Essas composições químicas sofrem variação dependendo do material genético, tipo de solo, nível de adubação, condições climáticas e estágio de maturação da planta (GOMES et al., 2004).

Tabela 1- Composição química média do grão de milho seco indicado nas estruturas físicas específicas do grão.

Componentes do grão	Endosperma (%)	Germe (%)	Pericarpo (%)	Pedicelo (%)	Grão Inteiro (%)
Amido	86,40	8,20	7,30	5,30	71,50
Proteína	9,40	18,80	3,70	9,30	10,30
Óleo	0,80	34,50	1,00	3,80	4,80
Açúcar	0,64	10,80	0,34	1,54	1,97
Cinza	0,31	10,10	0,84	1,56	1,44
Inteiro	81,90	11,90	5,30	0,80	99,9

Carvalho e Nakagawa, 2000.

2.1.3 Prolaminas

As zeínas são conhecidas como proteínas de reserva do milho e constituem cerca de 60 a 80% das proteínas do milho. As zeínas estão localizadas no endosperma do grão, na forma de corpos proteicos. Essas proteínas são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso. O início da síntese das zeínas ocorre entre 8 a 12 dias após a polinização, sendo máxima entre 16 e 35 dias e continua até 40 a 45 dias após a polinização (GIBBON & LARKINS, 2005). Elas têm sido estudadas tanto pelo interesse sob aspecto tecnológico quanto pelo nutricional. O interesse tecnológico das zeínas do milho reside da possibilidade de estas substituírem derivados de petróleo, principalmente por serem biodegradáveis e renováveis, diminuindo o impacto ambiental. As zeínas possuem propriedades hidrofóbicas e permite a confecção de filmes comestíveis para cobertura de medicamentos e alimentos, protegendo-os da umidade e do oxigênio (FORATO, 2006). Sob aspecto nutricional, tem sido demonstrado que o conteúdo de proteína, em especial de zeínas, está associado com diferenças na dureza dos grãos de

cereais, (PRATT et al., 1995). A dureza é uma característica física que influencia na qualidade e no processamento dos grãos de milhos (FOX & MANLEY, 2009). Uma forma indireta de medir essa dureza do grão é através da determinação da vitreosidade. Obtida através da dissecação dos grãos e calculada pela proporção de endosperma vítreo em relação ao endosperma total (CORREA et al., 2002). Conforme Choct et al. (2001), a configuração química do grão e a estrutura da matriz proteica ao redor dos grânulos de amido também afetam a acessibilidade de enzimas amilolíticas. Estas características podem influenciar a digestibilidade dos nutrientes dos grãos, uma vez que está associada à vitreosidade. Corona et al. (2006) avaliaram o efeito da vitreosidade e processamento (floculados e laminados a seco) dos grãos de milho na digestão novilhos holandeses. A floculação, ao contrário da laminação a seco, eliminou o efeito adverso do aumento da vitreosidade do endosperma sobre a digestão do amido no trato digestivo dos novilhos. De modo similar, Arcari et al. (2016b) ao compararem uma variedade de milho fornecido moída seca ou ensilada a vacas leiteiras observaram que a ensilagem dos moídos grãos aumentou a digestibilidade aparente total do amido, reduzindo o impacto da vitreosidade dos grãos sobre a digestibilidade do amido dos grãos. Mais estudos sugerem que os benefícios da floculação e ensilagem dos grãos sobre a digestão do milho não estão relacionados apenas à gelatinização do amido, mas também ao aumento da destruição da matriz proteica (HOFFMAN et al., 2011). Philippeau et al. (2000) quantificaram a relação entre vitreosidade e concentração de prolaminas no milho e concluíram que milhos mais vítreos contêm mais prolaminas do que milhos menos vítreo. Estes dados definem as diferenças na composição química entre o endosperma vítreo e endosperma farináceos. Hoffman et al. (2011) e McAllister et al. (1993) utilizaram novilhos holandeses fistulados para avaliar a influência da matriz proteica dos grãos de milho e cevada sobre a digestão microbiana do amido. Os grãos foram processados e separados em partículas pequenas ($<0,89\text{mm}$) e partículas grandes ($2\text{mm} < x < 3\text{mm}$) e independente do tamanho de partículas a digestão do amido dos grãos de cevada foi estatisticamente maior do que o amido dos grãos de milho. Possivelmente influenciados pela maior resistência da matriz proteica do milho em relação à cevada. As prolaminas se localizam exteriormente aos grânulos de amido no endosperma. Em milho de endosperma farináceo os grânulos de amido são esferas dispersas no endosperma, enquanto que em endosperma vítreo os grânulos de amido são helicoidais e adensados. Como a ligação entre os grânulos de amido e as prolaminas é muito forte no endosperma vítreo, nem água penetra entre os grânulos, e nem as amilases e maltases necessárias para que ocorra a quebra enzimática do amido a glicose no rúmen ou nos intestinos (McALLISTER et al., 2001). As proteínas do milho compreendem quatro grupos

estruturalmente distintos α , β , γ , e Δ que podem ser separados com base na sua estrutura primária e na sua solubilidade. São constituídas de aproximadamente 6% de globulinas e albuminas (proteínas solúveis em água ou solução salina), 34% de glutelinas (proteínas insolúveis em água e álcool) e 60% prolaminas (proteínas insolúveis em água e solúveis em álcool 70%) (PATERNIANI & VIÉGAS, 1987). As proteínas desses dois últimos grupos são também conhecidas como proteínas de reserva. As prolaminas são associadas ao amido nos grãos de todos os cereais e no milho, as prolaminas são denominadas zeínas. A maioria das glutelinas tornam-se solúveis em álcool após redução das ligações de dissulfeto, e também têm sido classificadas como prolaminas (zeínas) por várias semelhanças de sequência e composição de aminoácidos. Assim, as zeínas totais representam cerca de 80 % das proteínas do milho (FORATO, 2000).

2.1.4 Sorgo

O grão de sorgo é o quinto cereal mais produzido no mundo com uma produção aproximada de 64 milhões de toneladas no ano 2016. A produção brasileira representou 3,4% deste montante (USDA, 2016). A produção nacional de sorgo está concentrada na região centro-oeste, principalmente no estado de Goiás, responsável por 45% da produção nacional referente ao ano de 2016. A estimativa para os anos seguintes é de que a produção apresente um crescimento de aproximadamente 10% ao ano (CONAB, 2016). Cerca de dois terços da produção mundial de sorgo são utilizados para o consumo humano em países africanos e na Índia. O restante é produzido em países da América do Sul, Austrália e Estados Unidos, e é basicamente utilizado na alimentação animal (BRYDEN et al., 2009). Por ser tolerante a solos secos e de baixa fertilidade e por ter sistema radicular mais profundo que o milho e o soja o retorno econômico da produção do grão de sorgo é, na maioria das vezes, maior em relação a outros grãos de cereais utilizados na alimentação animal, quando produzidos em regiões de clima seco e quente ou durante os períodos entre safras de culturas principais, período conhecido como safrinha (BRYDEN et al., 2009).

Devido às características físico-químicas do grão do sorgo existem enormes janelas de oportunidade para o uso do grão na alimentação de ruminantes no Brasil. Entretanto, devido às características de baixa digestibilidade e competitividade por espaço de armazenamento com outras commodities como o milho e a soja, o crescimento do uso do sorgo na alimentação de ruminantes está aquém em relação ao seu real potencial agrônomo e nutricional. Deste

modo, desenvolver e compreender o comportamento da ensilagem do grão de sorgo reidratado em relação ao grau de processamento, tipo de inoculante e tempo de ensilagem, tem importância de base para estimular sistemas eficientes de armazenagem e inclusão deste cereal amiláceo na dieta de ruminantes.

As razões para a limitação da utilização do grão de sorgo na alimentação animal ainda são pouco exploradas. Algumas características inerentes ao grão são os principais fatores que prejudicam sua qualidade e aproveitamento. Sabe-se que o grão de sorgo, diferentemente da maioria dos outros grãos, não apresenta película protetora resistente em seu revestimento, como a palha do milho, por exemplo. Desta maneira, para que a semente de sorgo possa sobreviver ao ataque de insetos, fungos e outros microrganismos, alguns macros nutrientes, como amido e proteína, estão altamente compactados dentro das células, revestidas principalmente por celulose e arabinoxilanas (GIDLEY et al., 2011).

Uma das principais limitações do uso do grão de sorgo nas dietas para ruminantes é a baixa qualidade proteica do grão. A principal proteína do grão, conhecida como kafirina, apresenta deficiência em aminoácidos essenciais, elevada hidrofobicidade e interações com o tanino, que tornam reduzida a sua digestibilidade (SASTRY et al., 1986). A baixa digestibilidade da proteína do sorgo ainda se deve a fatores exógenos, como estrutura e tamanho do grão, presença de polifenóis, fitato e componentes da parede celular, e a fatores endógenos, como ligações dissulfeto, interações hidrofóbicas da proteína do grão (DUODU et al., 2003).

Os grãos de sorgo apresentam teores muito próximos de amido aos do milho, por volta de 72%, conforme citado por Huntington (1997). Entretanto, apresentam diferenças com relação a sua digestibilidade e taxa de degradação, o que confere ao sorgo um menor valor alimentar. A identificação de híbridos com mais rápida ou mais extensa taxa de fermentação de amido tem sido uma área importante na pesquisa e desenvolvimento de novos cultivares de sorgo. Segundo Stock (1999), os híbridos de grão de sorgo apresentam maior variação em digestibilidade, *in vivo* e *in vitro*, e na taxa de fermentação de amido, do que híbridos de milho. A digestibilidade do amido é afetada por sua composição e interações entre amido e proteína, integridade celular do grânulo de amido, fatores antinutricionais como o tanino e forma física do alimento fornecido (ROONEY & PFLUGFELDER, 1986). Além das diferenças de tamanho e forma do grão, as principais diferenças entre sorgo e milho se referem ao tipo e distribuição de proteínas que circundam o amido no endosperma. Segundo Rooney & Pflugfelder (1986) o sorgo apresenta, de maneira geral, maior proporção do chamado endosperma periférico, região densa e resistente a penetração de água. As células dessa região

apresentam maior porcentagem de proteína e resistem a degradação enzimática ou física, deste modo os grãos de sorgo são os que mais respondem aos métodos de processamento, principalmente aos métodos químico-físicos como a floculação (THEURER, 1986).

Inúmeros trabalhos têm demonstrado a importância do processamento de sorgo como ferramenta para aumentar sua digestibilidade e desempenho animal, como sumarizado por Owens et al. (1997) para gado de corte e por Theurer et al. (1999) para gado de leite. Os trabalhos realizados no Brasil sobre desempenho de vacas leiteiras recebendo grãos de sorgo na dieta são escassos e parecem ser uma boa oportunidade de pesquisa acerca do fornecimento e diferentes formas de processamento de sorgo. Em um dos poucos trabalhos de cinética de digestão realizados no Brasil com sorgo para vacas leiteiras, Moron et al. (1999) observaram menor potencial de degradação da matéria seca do sorgo quando comparado ao milho. Todos os métodos de processamento do sorgo aumentaram a degradabilidade ruminal da matéria seca dos grãos, sendo a extrusão o melhor método de processamento quando comparado a quebra, moagem ou autoclavagem. Theurer et al. (1999) sumarizaram dados de pesquisa com grão de sorgo e milho processados em dietas para vacas de alta produção. A comparação entre sorgo laminado e floculado em 24 experimentos, demonstrou que a floculação do sorgo não afetou o consumo de matéria seca (CMS) mas aumentou a produção de leite e a eficiência alimentar em 5%, a porcentagem de proteína (2%) e produção de proteína (7,5%), e reduziu a porcentagem de gordura em 5,6%, sem alterar a produção deste componente, através do aumento de 16% na digestão ruminal de amido. Os bovinos consumiram milho e aveia quebrados mais lentamente que milho e aveia inteiros, contudo permaneceram mais tempo consumindo os grãos quebrados de maneira que o consumo total foi semelhante. No caso do sorgo, consumo total de grãos quebrados foi inferior ao inteiro, mesmo com um tempo maior de consumo. Quando ocorreu aumento de processamento para moagem fina, peletização e peletizado e moído, o consumo total voluntário foi reduzido para milho e aveia na ordem citada, sendo que sorgo peletizado foi a forma preferida dos bovinos. O processamento de grãos altera as características de misturas de concentrados e de dietas, podendo ter efeito positivo ou negativo sobre o desempenho dos animais alimentados em grupos, uma vez que animais dominantes podem apresentar efeito seletivo.

2.1.5 Kafirina

Apesar do nível proteico do sorgo ser superior ao do milho, a maior parte de sua proteína é composta por kafirina, uma proteína de reserva pertencente ao grupo das prolaminas (BELTON et al., 2006). Esta proteína apresenta baixa digestibilidade devido às características como elevada hidrofobicidade, que se deve a sua configuração estrutural dominada por aminoácidos apolares em suas extremidades, adicionalmente apresenta desbalanceamento de aminoácidos, principalmente pelo baixo conteúdo de lisina (MOSSE et al., 1988). A concentração de kafirina na proteína do sorgo apresenta grande variabilidade de acordo com o método de análise adotado e principalmente devido ao conteúdo de proteína do grão, podendo variar entre 37,5% a 72,9%, em um total de 88 amostras analisadas por Selle et al. (2010). Entretanto, supõe-se que em média a concentração é de 54,7% de kafirina, 30,8% de glutelina, 7,5% de albumina e 7,0% de globulina na proteína do sorgo (ALI et al., 2009). A variação é explicada pela correlação positiva entre a concentração de proteína e de kafirina no sorgo, demonstrando que elevações do teor de proteína do sorgo elevam a concentração de kafirina no grão, reduzindo o conteúdo de glutelina (TAYLOR et al., 1984).

A kafirina é classificada ainda em α -kafirina (82% da kafirina), β -kafirina (7,5% da kafirina) e γ -kafirina (10,5% da kafirina), de acordo com sua solubilidade e seu peso molecular (MESA-STONESTREET et al., 2010). O perfil aminoacídico das kafirinas não é favorável à exigência de vacas leiteiras de elevada produção, principalmente por apresentar baixos teores de lisina e metionina, com exceção a β -kafirina, que apresenta dez vezes mais metionina do que a α -kafirina (SHULL et al., 1992). Desta forma, o sorgo apresenta perfil de aminoácidos um tanto distante do perfil ideal para atender às exigências de aminoácidos de ruminantes de elevado desempenho zootécnicas como o de vacas leiteiras de alta produção.

As moléculas de kafirina estão presentes no endosperma, sendo armazenadas como proteína de reserva do grão, e associadas aos grânulos de amido. Este complexo formado por proteína-amido está interligado à matriz proteica da glutelina. A forte ligação formada por estes três componentes prejudica a degradação do amido devido a interações físicas e químicas (DUODU et al., 2003). Além disso, as moléculas de β -kafirina e γ -kafirina, que possuem inúmeras ligações dissulfeto, formam camadas que envolvem o núcleo central das moléculas de α -kafirina, prejudicando sua digestão devido à formação de uma proteína insolúvel (BELTON et al., 2006). A molécula de γ kafirina, por exemplo, pode ser resistente à degradação pela pepsina por mais de três horas em avaliações *in vitro* (WONG et al., 2010). Estudos demonstraram que o tanino se liga rapidamente à molécula de γ -kafirina, devido ao alto conteúdo de prolina em sua cadeia, formando complexos proteína-tanino, dificultando ainda mais a digestão proteica da kafirina (TAYLOR et al., 2007). Desta forma, as kafirinas

têm grande influência sobre a digestibilidade do amido, apresentando correlação negativa com a energia metabolizável aparente, com impacto negativo considerado maior que o do tanino, considerando-se a digestibilidade do amido (ELKIN et al., 1996).

2.1.6 Amido

Os carboidratos recebem este nome por somente se apresentarem na forma de hidratos de carbono, sempre na fórmula $C_x(H_2O)_y$. Carboidratos simples são conhecidos como açúcares ou sacarídeos (Latim – saccharum, açúcar) e normalmente terminados em ose. (SOLOMONS, 1992). Os principais carboidratos constituintes dos grãos são o amido, a celulose, os açúcares simples e as pentosanas. O amido é a principal fração dos carboidratos e pode representar de 75 a 80% do peso seco do grão (ZEOULA & CALDAS NETO, 2001). O amido é um polissacarídeo não estrutural de elevado peso molecular, sintetizado pelas plantas superiores com função de reserva energética nos períodos de dormência, germinação de grãos, crescimento e rebrota (WANG et al., 1998). O amido é o mais importante polissacarídeo de reserva vegetal. A molécula completa contém em média cerca de 2.000.000 unidades de glicose, sendo uma das maiores moléculas encontradas na natureza. O amido quimicamente é formado por dois polímeros de glicose, a amilose e a amilopectina (FRENCH, 1973). Esses dois polímeros diferenciam-se entre si quanto ao tipo de estrutura química, ao tamanho da molécula e pelas propriedades químicas. A amilose é o polímero longo e relativamente linear, disposto em dupla hélice e que apresenta a capacidade de ligar-se ao iodo, formando composto azul ou violeta. Aproximadamente 99% dos resíduos de glicose estão unidos por ligações α -(1 $\rightarrow$ 4), e o restante por ligações α -(1 $\rightarrow$ 6). A molécula é composta de 324 a 4.920 resíduos de glicose e pode ter de 9 a 20 pontos de ramificação ligações α -(1 $\rightarrow$ 6) e de 3 a 11 cadeias retilíneas. Essas cadeias são relativamente longas e podem conter de 200 a 700 resíduos de glicose (TESTER et al., 2004).

A amilopectina é uma molécula maior que a da amilose (TESTER et al., 2004) e tem estrutura bastante ramificada. As cadeias lineares de glicose, unidas por ligações α -(1 $\rightarrow$ 4), têm pontos de ramificação α -(1 $\rightarrow$ 6) a cada 20 a 25 resíduos de glicose (CHESSON & FORSBERG, 1997). Estima-se que 95% dos resíduos de glicose estejam unidos por ligações α -(1 $\rightarrow$ 4) e que os outros 5% por ligações α -(1 $\rightarrow$ 6) (FRENCH, 1973). Este tipo de molécula pode conter mais de 15 mil resíduos de glicose, sendo considerada uma das maiores moléculas conhecidas. Segundo Bal et al. (1998), a complexa organização das ramificações α -(1 $\rightarrow$ 6) é

responsável pelo empacotamento denso e semicristalino dos resíduos de glicose nos grânulos de amido.

A porcentagem de amilose e de amilopectina é variável segundo a origem do amido, entretanto, na maioria das espécies, o amido é composto por 30% de amilose e 70% de amilopectina (WANG et al., 1998). A amilose e a amilopectina encontram-se empacotadas nas plantas na forma de pequenos grânulos, com diâmetros variando de 1 a 200 μm e nos formatos redondo, lenticular, oval e/ou poligonal (ROONEY & PFLUGFELDER, 1986).

O estudo da composição do amido dos grãos baseia-se na maior susceptibilidade da amilose à digestão enzimática (ZEOULA & CALDAS NETO, 2001). Segundo Philippeau et al. (1998), o amido dos grãos de milho ricos em amilose foi degradado mais rápida e extensamente no rúmen que o amido dos grãos cerosos e de composição regular do amido em estudo *in situ*, em bovinos. Porém, a maior degradabilidade ruminal de grãos ricos em amilose foi, em grande parte dos estudos, explicada pela textura mais macia (características da proteína do endosperma), do endosperma dos grãos de milho ricos em amilose.

2.1.7 Amido na nutrição de ruminantes

O amido corresponde a uma fração substancial nas dietas dos bovinos, que poder representar 40% da dieta. A maior parte do amido alimentar é fornecida por grãos de cereais, principalmente pelo milho. O teor de amido dos grãos de cereais varia de 45% para a aveia e 72% para o milho (GRANT, 2005). A fermentação ruminal do amido pode variar de menos de 50% a mais de 90%, e é uma função da taxa de fermentação (kd) e tempo de retenção (kp) das partículas do alimento no rúmen (GRANT, 2005). Algumas pesquisas têm tentado determinar ótimas concentrações dietéticas de amido. No entanto, uma quantidade ótima de amido dietético será função de vários fatores, incluindo a degradabilidade da fonte de amido, o método de processamento, a quantidade de proteína solúvel, FDN, método de alimentação, nível de produção a ser alcançado, e meio ambiente. A proporção entre amilose e amilopectina, que variam entre espécies e variedades de grãos, é um dos fatores determinantes para influenciar a taxa de degradação e a digestibilidade do amido. A digestibilidade do amido é diretamente proporcional ao teor de amilose. Desta forma fontes de amido com maiores teores de amilopectina, podem apresentar maior digestibilidade (GONÇALVES et al., 2009). As moléculas de amilose e amilopectina são mantidas unidas pelas pontes de hidrogênio,

resultando em grânulos de amido com estruturas altamente organizada (NOCEK & TAMMINGA, 1991). Diversos tipos de processamento são aplicados aos grãos de cereais com a finalidade de romper as pontes de hidrogênio dentro dos grânulos de amido, melhorando a sua capacidade de hidratação. Dessa forma, o amido torna-se mais susceptível à digestão enzimática. Quando processados os grânulos de amido estão sujeitos a gelatinização, que é a perda irreversível de sua estrutura original em função de alguma energia aplicada, que será responsável pela quebra das pontes de hidrogênio, (NOCEK & TAMMINGA, 1991). A gelatinização provoca maior capacidade de absorção de água e perda da estrutura cristalina que expõem uma maior parte do amido à degradação, (MELLO JR, 1991). A digestibilidade do amido do grão de milho é limitada também pela matriz proteica que é uma estrutura amorfa com função estrutural no grão que encapsula os grânulos de amido. Essa matriz está presente principalmente no endosperma vítreo dos grãos e a quebra da matriz proteica pode melhorar a velocidade e a extensão da digestão do amido (McALLISTER et al., 1993). A parte mais importante na matriz proteica são as prolaminas, que são proteínas do endosperma que desenvolvem estruturas terciárias que são altamente hidrofóbicas, portanto insolúveis em solventes normais para o ambiente ruminal (MOMANY, 2006).

No milho, as prolaminas compreendem de 50 a 60% do total da proteína e aumentam com o avanço da maturidade do grão de milho encapsulando o amido (HAMAKER et al., 1995). Potencialmente, a digestão do amido requer bactérias do rúmen para degradar primeiro as prolaminas, via proteólise antes da atividade amilolítica (COTTA, 1988). A proteólise das prolaminas é, portanto, um passo limitante na taxa de digestão do amido. McAllister et al. (1993) estudando a influência da matriz proteica sobre a digestão do amido observaram que, o milho tratado com protease *in vitro* teve a digestão de amido dobrada e concluíram que a matriz proteica do milho foi um fator importante na digestão ruminal do amido. Jurjanz & Monteils, (2005) observaram menor degradabilidade ruminal efetiva do amido em grãos de milho antes (70,2%) do que depois (92,3%) da ensilagem. Em estudo recente, Hoffman et al. (2011) acompanharam o destino da matriz proteica em silagens de grão úmido de milho armazenadas por 240 dias e observaram que a ensilagem reduziu as concentrações de prolaminas. Portanto, o amido, está entre as principais fontes de energia para os ruminantes, apresenta algumas características que dificultam a sua digestibilidade e por isso torna-se importante o processamento dos grãos para quebrar essas barreiras e aumentar a disponibilidade dos grânulos de amido para os microrganismos e os animais.

2.1.8 Degradabilidade ruminal do amido

A maior parte dos carboidratos da dieta dos ruminantes é fermentada no rúmen, originando ácidos graxos voláteis (AGV). Os carboidratos que passam para o intestino delgado são passíveis de hidrólise pelas enzimas pancreáticas e intestinais, liberando glicose, que será então absorvida. Parte dos carboidratos residuais que chegam ao intestino grosso podem ser fermentadas da mesma maneira como no rúmen, mas a maior parte, contudo, é excretada nas fezes (VAN SOEST, 1994). A fermentação ruminal, que precede a digestão gástrica nos ruminantes, torna a maior parte dos componentes nutritivos dos alimentos disponíveis para ser utilizada diretamente pelos tecidos dos animais. Dessa forma, os carboidratos estruturais e não estruturais, proteínas e outros substratos fermentáveis são convertidos em ácidos graxos voláteis (AGV), gás carbônico, metano, amônia e células microbianas como produtos finais da fermentação (VAN SOEST, 1994). A taxa e a extensão da digestão do amido no rúmen dependem da fonte ou tipo de amido e do método e intensidade no processamento (THEURER et al., 1999). Em ordem decrescente, a taxa de degradação ruminal do amido é: mandioca > trigo > cevada > aveia > milho > sorgo. Quanto ao processamento físico dos grãos geralmente aumenta a taxa e a extensão de fermentação do amido no rúmen com redução da quantidade de amido disponível para a digestão no intestino delgado (KOZLOSKI, 2011). O pericarpo representa uma barreira física para a colonização microbiana e dificulta a digestão dos componentes nutricionais da maioria dos grãos. Após o seu rompimento através da mastigação ou processamento, a taxa de fermentação dos grânulos de amido é determinada pela concentração e rigidez da matriz proteica (zeína, no milho) e pela presença da parede celular das células do endosperma. Para que essas barreiras sejam superadas pelas bactérias amilolíticas é necessário a ação conjunta das bactérias celulolíticas (quebram a parede celular) e das bactérias proteolíticas (quebram as proteínas) para que assim os grânulos de amido fiquem acessíveis aos microrganismos amilolíticos (McALLISTER et al., 2001). A matriz proteica do milho é extremamente resistente a degradação e por isso explica o porquê mais de 40% do amido do milho pode escapar da fermentação ruminal e chegar ao intestino delgado (ORSKOV 1986). Essa quantidade de amido que escapa da fermentação ruminal são digeridas no intestino delgado por enzimas pancreáticas, como a α -amilase, e por enzimas produzidas pela própria mucosa intestinal, como a maltase e isomaltase, semelhante ao que ocorre com os monogástricos (KOZLOSKI, 2011). A produção e a secreção da amilase pancreática são dependentes da quantidade de amido que chega ao intestino delgado, podendo aumentar 2,5 vezes quando a quantidade de concentrado da dieta

de novilhos aumentar de 20% para 80% (VAN HELLEN et al., 1978). O rúmen é o principal sítio de digestão do amido, sendo mais de 75% do amido é digerido neste compartimento, segundo Owens et al. (1986), verificaram a degradabilidade ruminal variou de 58,9% para o grão inteiro até 86% para o grão ensilado.

2.1.9 Processamento do grão de milho sobre e a degradabilidade ruminal

O processamento do grão de milho, seja por aumento da superfície de contato, da umidade, temperatura e/ou pressão, apresenta efeitos positivos sobre a digestibilidade ruminal, pós-ruminal e total do amido (THEURER et al., 1999; ZINN et al., 2002; FERRARETTO et al., 2013). As melhorias estão relacionadas a maior área de contato, distúrbios na matriz proteica que circunda os grânulos de amido e à desorganização dos mesmos o que aumenta o acesso das bactérias do rúmen ao amido (THEURER et al., 1999). Os grãos que mais respondem ao processamento são sorgo e milho e entre os grãos de milho o tipo flint em comparação aos dentados (SANTOS et al., 2011). Métodos mais intensos de processamento, como ensilagem de grão com alta umidade e floculação, apresentaram aumento na proporção do amido total que era digerido no rúmen e no intestino delgado e baixa digestibilidade do amido no intestino grosso, em virtude de quase todo o amido digestível ter sido digerido no rumen e intestino delgado, quando comparado aos tratamentos menos intensos.

De maneira geral, os fundamentos do processamento dos grãos são a melhoria da digestibilidade dos alimentos por meio da quebra das barreiras que impedem o acesso enzimático aos componentes nutricionais, conservação, o isolamento das partes específicas, a melhoria da palatabilidade dos alimentos (POND et al., 1995). O aumento da degradação ruminal do amido proporcionada pelo processamento aumenta a disponibilidade de energia rapidamente fermentável no rúmen, podendo aumentar a produção de proteína microbiana e de ácidos graxos voláteis totais (NOCEK & TAMMINGA, 1991). Todavia, efeitos adversos decorrentes da maior disponibilidade do amido podem ocorrer como, redução na digestibilidade de carboidratos fibrosos, consumo de forragem e matéria seca e acidose ruminal (Mc CARTHY et al., 1989). O processamento a ser utilizado deve ser selecionado com base no potencial de aumento de digestibilidade, aceitabilidade pelo animal, custo, e risco de causar acidose ruminal (OWENS & ZINN, 2005).

Beauchemin et al. (1994) ao utilizarem bovinos fistulados (rúmen e esôfago) para avaliar grãos de cereais em vários tamanhos de partícula, sobre a degradabilidade ruminal da matéria seca. Os autores verificaram que os grãos de milho partidos em quatro partes e os grãos mastigados possuem o comportamento semelhante na curva de degradação ruminal. Factori et al. (2008) utilizaram dois híbridos de textura dura e dentada para avaliar a influência da textura do grão de milho sobre o consumo de energia elétrica e amperagem em dois graus de moagens (865 μm – grossa; 570 μm – fina). Não foi observada diferença ($P>0,05$) entre os híbridos para as duas granulometrias avaliadas, no entanto, foi observada a interação do híbrido de textura dura com as granulometrias fina e grossa, sendo observado maior consumo de energia elétrica e amperagem com a granulometria fina. Desta forma devido à diferenciação do tamanho de partículas e da existência de interação dos híbridos do tipo duro com granulometrias diferentes, ambos podem influenciar na comparação da degradabilidade ruminal de híbridos de milho com texturas dura e dentada.

2.1.10 Milho e sorgo na alimentação de ruminantes

O milho é o principal grão usado como concentrado energético e fonte de amido na pecuária leiteira e de corte, sendo o sorgo ainda pouco utilizado. Vacas leiteiras consomem grandes quantidades de amido, na maior parte das vezes advindo do milho, que podem alcançar até 40% da MS da dieta (STERM & HOOVER, 1979). O alto grau de inclusão do amido nas dietas de vacas leiteiras tornam a sua digestibilidade fundamental para o sucesso do seu uso (GRANT et al., 2005). O amido é responsável por 75% do valor energético do grão de milho (NRC 2001), deste modo o melhor o aproveitamento do amido pode representar aumento de produtividade e eficiência. Segundo Firkins et al. (2001), a digestibilidade do amido para vacas leiteiras é variável e oscila entre 70 a 100%. Uma série de fatores são apontados como pontos de interferência na porção aproveitável do amido do milho, entre os quais: o método de processamento (CALLISON et al., 2001), o tamanho de partícula, a maturidade e umidade à colheita (FIRKINS et al., 2001), o método de conservação e tipo de endosperma (PEREIRA et al., 2004).

O método de processamento aplicado ao cereal pode determinar o sítio e a extensão de digestão do amido (NECEK & TAMMINGA, 1991). De acordo com Harmon et al. (2001), a digestibilidade do amido no intestino delgado é dependente da quantidade de amido que chegar nele. Este fato é corroborado, com uma diminuição de 30% de digestibilidade do amido

descrita quando o fluxo intestinal do amido foi aumentado de 250 para 1800 g/d (MATTHÉ et al. 2001). Cálculos descritos por Owens & Goetsch (1986), no entanto, sugerem eficiência energética superior quando o amido é digerido no intestino delgado em comparação com a fermentação ruminal. Entretanto estudos realizados nas últimas décadas indicam que o desempenho de novilhos de corte (ALIO et al., 2000; LOZANO et al., 2000) e de vacas leiteiras (THEURER et al., 1999) foi superior quando as fontes de amido foram degradadas no rúmen em comparação com a digestão de amido no intestino. Deste modo, segundo Theurer et al, (1999), elevar a quantidade de amido a ser digerido no rúmen por meio de processamentos mais intensos dos grãos pode aumentar a eficiência de aproveitamento do mesmo.

A quantidade de ingestão de amido e energia parece não influenciar a concentração de enzimas presentes na borda em escova do epitélio do intestino de ovinos e bovinos, sugerindo que a quantidade de amido que chega ao intestino não exerce influência sobre a digestibilidade neste sítio (HARAMON, 2009). Segundo Oba e Allen (2003a), em dietas com menor disponibilidade ruminal de amido, há menor fluxo de N microbiano para o intestino, o que sugere que uma menor quantidade de amido fermentando no rúmen seja limitante para o crescimento bacteriano. Aumento do fluxo de proteína para o intestino tem o potencial de aumentar a síntese de amilase pancreática o que por consequência acarreta aumento da digestibilidade do amido no sistema digestório. Estes resultados sugere a necessidade de que quantidades adequadas de amido sejam degradadas no rúmen gerando maior produção de proteína microbiana e por consequência aumentando a passagem de proteína para o intestino (HUNTINGTON, 1994; HUNTINGTON, 1997).

O grau de vitreosidade do milho é o principal responsável pela diminuição da digestibilidade do grão milho, principalmente das variedades cultivadas no Brasil, cujo ponto máximo é obtido quando o grão está maduro, é um dos principais (PEREIRA et al., 2004). Após o ponto de maturação fisiológica, o grão de milho apresenta diminuição significativa da quantidade de amido fermentável no rúmen (JOHNSON et al., 1999). O endosperma vítreo é duro, cristalino e possui uma matriz proteica contínua e abundante. Esta matriz que forma numerosos invólucros que revestem os grânulos de amido, dificulta ou até impossibilita movimentação de água, líquido ruminal e enzimas por entre eles (PRATT et al., 1995). A presença de invólucros proteicos hidrofóbicos e sua quantidade são apontadas com um dos principais fatores responsáveis pela diminuição da digestibilidade de grãos (KOTARSKI et al., 1992).

A presença de matriz proteica incompleta revestindo o grânulo de amido pode facilitar a ação enzimática bacteriana ao amido, melhorando deste modo digestibilidade. Grãos com maturidade incompleta contêm menos prolamina que grãos maduros (DAVIDE, 2009). O amido da silagem de grão úmido (grãos colhidos em estágio incompletos de maturação) é mais bem degradado do que o amido do grão seco (FIRKINS et al., 2001). Além do grão de milho colhido imaturo ser mais degradável pelo estágio incompleto de maturidade outro fator que é sugerido como melhorador da digestibilidade ruminal do amido é o efeito da ensilagem e do tempo que este grão permanece armazenado (BENTON et al., 2005; NEWBOLD et al., 2006; DER BREDOSIAN et al., 2012).

Alguns estudos sugerem a hipótese de que a zeína pode ser degradada no processo de ensilagem (PHILIPPEAU & MICHALET-DOREAU, 1998; JURJAN & MONTEILS, 2005; DER BREDOSIAN et al., 2012), permitindo assim maior acesso das bactérias ruminais aos grânulos de amido. As zeínas podem potencialmente ser degradadas e/ou solubilizadas no processo de ensilagem por atividade proteolítica bacteriana ou solubilização por compostos orgânicos gerados no processo fermentativo. Embora este tipo de proteína seja hidrofóbico e insolúvel em água ou líquido ruminal, é solúvel em ácido láctico e ácido acético (LAWTON, 2002). Entretanto, estudos específicos acerca da ação dos produtos finais da fermentação e como estes que influenciam na degradação da matriz proteica do endosperma do milho são limitados, deixando ainda lacunas referentes ao entendimento deste assunto.

2.1.11 Milho e sorgo reidratados e ensilados

Os sistemas tradicionais de armazenagem de milho e sorgo com baixa umidade é suscetível ao ataque de vários insetos e roedores, o que gera prejuízos em relação a qualidade e quantidade dos grãos com a evolução do tempo de estocagem. De acordo com Lazzari & Lazzari (2001) os insetos mais comuns que atacam o milho seco armazenado são os carunchos (*Sitophilus zeamais*, *Sitophilus oryzae*), besouros (*Rhyzopert hadominica*, *Tribolium castaneum*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Cryptolestes ferrugineous*) e as traças-de-cereais (*Sitotroga cerealella*, *Plodiainterpunctella*). Estes insetos não são encontrados na silagem de grãos úmidos por razões de ausência de oxigênio e acidez do meio.

A armazenagem do milho ensilado é um modo de agregar valor e qualidade do produto, além de eliminar as perdas decorrentes dos encargos da armazenagem terceirizada. De acordo com os dados apresentados por Back & Lazzari (2001), o custo que o produtor tem para

comercialização do milho em grãos limpo e seco ao entregar o produto sujo e úmido para uma unidade armazenadora é elevado. Segundo estes autores, os descontos podem chegar a 25-30%, isto é, a cada 100 sacas do produto úmido entregue, 25 a 30 sacas são descontados do produtor, para cobrir custos de secagem, grãos danificados por fungos e insetos, impurezas, impostos e lucros do sistema de armazenagem. Costa et al. (1998) constataram que com a eliminação das etapas de limpeza e secagem, a silagem de grãos úmidos de milho foi 5% mais barata em relação aos grãos secos. Na alimentação de suínos estes custos chegar a 20 – 25% no custo final da ração. A diferença entre o custo operacional da produção do milho grão seco e da silagem de grãos úmidos foi de cerca de 24%. No entanto, mesmo considerando-se os investimentos em benfeitorias e máquinas para triturar e armazenagem, a vantagem do milho úmido ensilado, em relação ao grão seco, fica em torno de 6,7% (BACK & LAZZARI, 2001).

Entretanto, a confecção da silagem de grão úmido apresenta limitações de ordem climática, de logística, de eficiência de equipamentos e de processamento. A grande extensão territorial do Brasil submete as áreas de cultura do milho a diversas condições pluviométricas. Em algumas regiões a estação do ano em que a cultura do milho atinge o ponto ideal de colheita para realização de silagem de grão úmido pode ser coincidente com o período de chuvas regulares, o que dificulta os processos de colheita, moagem e ensilagem. Outro gargalo refere-se a pouca disponibilidade de máquinas que consigam processar com velocidade e eficiência a silagem de grão úmido. A moagem fina dos grãos com alta umidade em geral também é problemática devido a entupimento de peneiras dos trituradores, o que impede moagens finas do material. Adicionalmente, os híbridos modernos têm janela de maturação bastante rápida o que diminui o tempo da janela de corte, aumentando as chances de que o intervalo ideal de colheita (teor de umidade do grão entre 30-40%) seja perdido. Uma alternativa as limitações da confecção da silagem de grão úmido em algumas situações, é a técnica conhecida como milho reidratado. A reidratação se baseia em devolver aos grãos maduros, secos e moídos umidade entre 30 e 40% da MS, suficiente para que essa massa seja apta a fermentar e conservar-se pelo processo da ensilagem (DEFOOR et al, 2006).

2.1.12 Efeito da ensilagem sobre a digestibilidade do amido

A silagem de grão com alta umidade, também conhecida como silagem de grão úmido, consiste na ensilagem do grão de milho em estágio avançado de maturação em torno da linha negra, quando a planta apresenta teor de umidade ainda elevado, em torno de 30 a 40%. Dentre

os métodos de processamento de grãos, a ensilagem apresenta vantagens operacionais quando comparada a outras técnicas, como moagem e floculação. A ensilagem de milho grão úmido possibilita a antecipação da retirada da cultura da área plantada, uma vez que o grão de milho é colhido com MS reduzida (60 a 70%), enquanto para a estocagem de grão seco a colheita é feita com MS acima de 80%. Com relação aos processos mais intensos como a floculação, a ensilagem apresenta a vantagem de ter o custo reduzido por dispensar a aquisição de maquinário de elevado custo. A proteína zeína, que está presente na matriz proteica, pode ser potencialmente degradada durante o processo de ensilagem por solubilização ou atividade proteolítica. Apesar de ser insolúvel em água e no fluido ruminal, a zeína pode ser solúvel em ácido lático e ácido acético (LAWTON, 2002), que são encontrados nas silagens como produtos da fermentação. A proteólise, devido à ação de enzimas das plantas ou pela ação das proteases das bactérias, é outro mecanismo intrínseco à fermentação de silagens de milho com alta umidade, que pode induzir a degradação de proteínas (VIERSTRA, 1996). Segundo Hoffman et al. (2011), a degradação da proteína zeína pode estar mais relacionada à atividade de proteólise, uma vez que, aos 240 dias de ensilagem houve redução da proteína zeína e aumento do N-NH₃. Portanto a ensilagem do grão com alta umidade pode melhorar o acesso das bactérias do rúmen aos grânulos de amido, melhorando assim sua degradação ruminal. Fernandes et al. (2015) observaram que o aumento do tempo de estocagem reduz os teores de prolaminas em silagens de grão de milho com alta e baixa vitreosidade, ensilados em diferentes estágios de maturação, o que aumentou a degradabilidade ruminal *in situ* do amido. Kung Jr et al, (2014) observaram ao longo do tempo de estocagem (0 a 140 dias) houve redução nos teores de prolaminas e aumento nos teores de nitrogênio amoniacal e proteína solúvel e aumento da digestibilidade *in vitro* do amido. Kung Jr. (2013) sugere que tempos de armazenamento mínimo de 3 meses são necessários para o aumento da digestibilidade do amido das silagens da planta inteira de milho. Daniel et al, (2014) compilaram uma série de dados e observaram que, nos primeiros 28 dias de estocagem, ocorrem os maiores ganhos em digestibilidade do amido (0,31 unidades percentuais por dia), sendo que após esse período o incremento caiu para cerca de 0,03 unidades percentuais por dia. Portanto, experimentos com tempos prolongados de estocagem são necessários para determinar qual o ponto onde obtemos os ganhos máximos em digestibilidade do amido para silagens de milho grão úmido e reidratado, tanto para milho quanto para outros tipos de grãos.

2.1.13 Grãos ensilados

O processo de ensilagem do grão de milho, após passar por processo de reidratação, é uma alternativa à ensilagem do grão úmido de milho. Por apresentar um curto intervalo de colheita, aumentam-se as chances de insucesso na ensilagem de milho com alta umidade, em virtude da maturação excessiva e consequente perda de umidade (PEREIRA, 2013). A ensilagem do grão reidratado apresenta as vantagens da ensilagem, minimizando o risco de erro do ponto de colheita avançado, quando a umidade do grão cai abaixo de 28% o que fica abaixo da umidade abaixo do ideal para o crescimento microbiano durante a fermentação. Os grãos de milho, ao alcançarem a maturidade fisiológica com uma concentração de umidade em torno de 34% no milho dentado e 37% no milho duro, não sofrem mais alteração nos seus teores de amido (PHILIPPEAU & MICHALETDOREAU, 1997). Isso demonstra que o milho colhido com alta umidade e o reidratado, provavelmente terão concentrações de amido semelhantes. Correa et al. (2002) não observaram influência na concentração de amido do grão de milho com o avanço da maturidade, entretanto ocorre aumento da vitreosidade. O estresse sofrido pelos grãos de milho durante a secagem no campo e por aquecimento em secador comercial, modifica a população bacteriana do milho seco em comparação com o milho colhido na linha negra para a confecção de silagem de grão úmido. Carvalho (2014) observou no primeiro dia de ensilagem, grande quantidade de bactérias do gênero *Clostridium* e menor população do gênero *Lactobacillus* no material ensilado de grãos de milho reidratados, diferente do milho colhido para grão úmido, onde pode ser observado uma alta quantidade de *Lactobacillus* e a ausência de *Clostridium*. A menor digestibilidade do grão de milho seco em relação ao milho com alta umidade, devido ao aumento da vitreosidade, pode ser compensada pela moagem fina para reidratação, uma vez que o tamanho de partícula também é determinante da digestibilidade do grão (FERRARETTO et al., 2013; PEREIRA et al., 2013). Devido às modificações no perfil microbiológico das silagens de milho reidratado, é necessário que estudos sejam realizados para determinar qual é o impacto na fermentação, bem como os efeitos do uso de aditivos que melhorem o perfil fermentativo e a estabilidade aeróbia dessas silagens.

2.1.14 Inoculantes na ensilagem de grãos

Por apresentar altos teores de ácido lático e carboidratos solúveis remanescentes do processo de fermentação, que são utilizados como substrato para o crescimento de leveduras e fungos filamentosos, após a abertura do silo, a silagem de grãos está sujeita ao processo de deterioração (SEBASTIAN et al., 1996). Contudo a poucas informações sobre o perfil fermentativo e a estabilidade aeróbia das silagens de milho reidratado (REZENDE et al., 2014), o que estimula novas pesquisas nessa área. Os inoculantes bacterianos, como as bactérias ácido lácticas heterofermentativas facultativas (homofermentativas), como *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus* e *Enterococcus faecium*, tem a capacidade de acelerar a acidificação da silagem, o que reduz as fermentações secundárias e proporciona menor perda de energia. Entretanto, Kleinschmit et al., (2005) ao estudarem o uso de *L. plantarum* como inoculante em silagem de milho planta inteira e observaram redução na estabilidade aeróbia, devido à menor produção de substâncias inibidoras de fungos, como o ácido acético e ácido propionico. Kung et al. (2004) não observaram diferença entre o controle e as silagens de milho grão úmido usando *Lactobacillus plantarum*, sobre a estabilidade aeróbia das silagens. Após a abertura do silo a silagem entra em contato com O₂, levando as leveduras iniciam a assimilação de ácido lático, outros produtos da fermentação e carboidratos solúveis residuais, com isso há aumento da temperatura e pH (PAHLOW et al., 2003), com consequente consumo das substâncias inibidoras do crescimento desses microrganismos. As bactérias aeróbias também consomem o O₂, retomando a anaerobiose de parte do ambiente. Esse novo ambiente anaeróbio, com reduzidas substâncias inibidoras, favorece o crescimento de microrganismos anaeróbios como clostridium (JONSSON, 1991). O uso de *Lactobacillus buchneri* vem sendo um dos mais estudados nos últimos anos (KUNG et al., 2003). O *Lactobacillus buchneri* é uma bactéria ácido láctica heterofermentativa obrigatória, capaz de produzir, pela fermentação de glicose e frutose, ácido lático, ácido acético, manitol e etanol. O ácido acético, proporciona melhorias na estabilidade aeróbia das silagens, por suas características antifúngicas. Isso porque o pH do meio é inferior ao seu pKa o que faz com que ele esteja na forma não dissociada. Nessa forma, ele entra na célula microbiana através da sua membrana via transporte passivo. Uma vez dentro da célula, o ácido é dissociado, em razão do pH interno ser próximo a 7,0 e ocorrer a liberação dos íons H⁺, acidificando o meio intracelular (LAMBERT & STRATFORD, 1999). Para manter a neutralidade da célula, os microrganismos eliminam os íons por transporte ativo, levando a um gasto de energia que prejudica seu crescimento e multiplicação, podendo levá-lo à morte. Kleinschmit & Kung

(2006), reunindo os resultados de mais de vários experimentos que utilizaram *L. buchneri* em silagem de milho planta inteira, observaram aumento na concentração de ácido acético, decréscimo no número de leveduras e aumento da estabilidade aeróbia das silagens tratadas. O uso do *L. buchneri* na concentração de 1×10^6 ufc g^{-1} de forragem também promoveu uma maior estabilidade aeróbia (>900 h) em relação aos demais tratamentos (RANJIT & KUNG, 2000). O efeito positivo de aumento da estabilidade aeróbia, nas silagens de grão úmido de milho inoculadas com *L. buchneri* foi relatado no trabalho de Taylor & Kung (2002) com aumento de estabilidade de cerca de 80 horas para mais de 200 horas nas silagens controle em relação às silagens inoculadas com a dose mais baixa de *L. buchneri* (1×10^5 ufc por g) e enzimas aos 166 dias de estocagem. Resultados semelhantes foram observados nos trabalhos de Kung Jr. et al. (2007) e Basso et al. (2012) com aumento da estabilidade aeróbia de 50 horas no controle para mais de 200 horas nas silagens inoculadas com *L. buchneri* ($6,6 \times 10^5$ ufc por g) e *L. buchneri* + enzima. Com base nos trabalhos de Taylor e Kung (2002), Kung Jr. et al. (2007) e Basso et al. (2012), em média, o incremento na estabilidade aeróbia com a inoculação de *L. buchneri* nas silagens de milho grão úmido é de mais de 200% em relação ao controle. Contudo, há escassez de estudos sobre o efeito de inoculantes e doses para a ensilagem de milho reidratado. Outro ponto a ser levantado é a influência do uso de inoculantes no aumento da degradação do amido. Segundo Junges et al. (2015), a atividade proteolítica das bactérias é responsável por 60,4% da degradação de proteína em silagens de grãos de milho reidratado. Portanto, o efeito dos inoculantes sobre o perfil microbiano das silagens possivelmente pode influenciar a degradação de amido nas silagens de milho reidratado e silagem de milho grão úmido.

2.1.15 Balanceamento de amido na dieta de vacas leiteiras

O principal representante do grupo dos carboidratos não fibroso (CNF) é o amido. De forma geral, não se tem uma exigência nutricional estabelecida para uso do amido em dietas de vacas leiteiras, porém, indicações de limite máximo de inclusão é importante para evitar distúrbios digestivos e metabólicos, como a acidose ruminal, devido à alta digestão ruminal do amido. O limite de inclusão de amido em dietas de vacas leiteiras, geralmente depende da inclusão de FDN da dieta, principalmente oriunda de forragem ou então com um limite mínimo de tamanho de partícula (FDN fisicamente efetiva - FDNfe). O NRC (2001), baseado em dietas completas (TMR), muitas vezes utilizando silagem de milho e/ou alfafa (feno ou

silagem) como volumoso da TMR, estabelece recomendações para limites mínimos e máximos para inclusão de FDN em dietas de vacas leiteiras mas não para o amido.

Recomendações do limite mínimo de inclusão de FDN na dieta de vacas leiteiras está em torno de 30% da MS (ALLEN 1997). Desta forma, variações nas recomendações para limites mínimos e máximos de inclusão de FND (FDNfe ou oriunda de forragem) e amido, respectivamente, podem ocorrer dependendo do tipo de volumoso e principalmente da fonte do amido. Especialmente em dietas que utilizam fontes de volumosos com potencial limitado de FDN fisicamente efetivo como a silagem de milho, quando usada como volumoso único da TMR ou em outro extremo dietas com cana de açúcar que possuem elevada efetividade do FDN. Em dietas com volumoso de efetividade da fibra limitada, as recomendações são de que pelo menos de 10 a 15% das partículas da silagem tenham mais que 19 mm, especialmente em dietas em que o amido de rápida degradação ruminal.

A falta de uma exigência nutricional definida para uso de amido em dietas de vacas leiteiras, se deve em grande parte pela variabilidade da taxa de degradação do amido. Parte da variação da taxa de degradação ruminal do amido pode ser explicada pelo tipo de endosperma, ou seja, pela variabilidade do teor de matriz proteica envolta aos grânulos destes carboidratos. As matrizes proteicas dos grãos de milho e de sorgo são extremamente resistentes à degradação, enquanto aquelas da cevada, aveia e trigo são facilmente digeridas no rúmen. Até mesmo entre híbridos de milho há uma considerável variação no teor de prolaminas (zeínas) envoltas dos grânulos de amido, sendo responsável por dificultar o acesso microbiano para a digestão ruminal do amido. A susceptibilidade das matrizes proteicas à digestão microbiana ajuda a explicar por que mais de 40,0% do amido do milho e do sorgo podem escapar da fermentação ruminal, enquanto menos de 10,0% do amido do trigo e da cevada chegam ao intestino delgado (ORSKOV, 1986).

Estudos indicaram que o desempenho de novilhos de corte (LOZANO et al., 2000) e de vacas leiteiras (THEURER et al., 1999) foram superiores quando as fontes de amido foram degradadas no rúmen em comparação com a digestão de amido no intestino. Deste modo, elevar a quantidade de amido a ser digerido no rúmen pode aumentar a eficiência de balanceamento do mesmo (THEURER et al., 1999). Embora a produção de energia a partir da digestão intestinal do amido teoricamente seja superior a produção de energia a partir da degradação ruminal de acordo com Kreikemeier et al. (1991), o uso da glicose oriunda da digestão intestinal do amido é pouco eficiente, o que sugeriu que boa parte desta glicose é retida e utilizada pelo próprio epitélio do intestino, resultando em baixa eficiência de uso da glicose do amido para os processos produtivos de ruminantes.

A inclusão de amido em dietas de vacas leiteiras, especialmente com produção maior que 25 kg/d, é altamente recomendável. De acordo com trabalho conduzido por Carmo et al. (2015), o aumento do teor de amido dietético, de 15 para 30%, aumentou o CMS de forma linear 2,9 kg/d; enquanto que o teor de gordura do leite, a produção de leite e produção de leite corrigida para 3,5% de gordura aumentaram de forma quadrática, sendo a melhor resposta observada com 25% de amido na dieta. Entretanto, o teor e a produção diária de proteína bruta aumentaram linearmente com a inclusão de amido na dieta, o que pode sugerir maior síntese de proteína microbiana pela maior disponibilidade de carboidratos fermentescíveis no rúmen. Porém, a resposta quadrática de produção de leite, bem como de teor de gordura do leite, pode indicar acidose ruminal subclínica com inclusão de amido acima de 25% da dieta, em dietas com silagem de milho como volumoso exclusivo, pela limitada efetividade da fibra deste volumoso.

Diversos métodos podem ser utilizados para aumentar a digestão ruminal do amido, e estimular a produção de proteína microbiana. Os métodos mais usuais são a moagem fina, a ensilagem, e até mesmo a floculação dos grãos. Segundo Oba e Allen (2003a), em dietas com menor disponibilidade ruminal de amido, há menor fluxo de N microbiano para o intestino, o que sugere que menor quantidade de amido fermentando no rúmen seja um limitante para o crescimento bacteriano.

A ensilagem de grãos de milho úmido também foi descrita como método para melhorar a digestão ruminal do amido. Knowlton et al. (1998) compararam a silagem de grão úmido com milho moído fino em dietas de vacas leiteiras com 40% de amido na matéria seca. Neste estudo, a digestibilidade ruminal do amido da dieta foi de 84% para a silagem de grão úmido e 65% para o milho moído fino; enquanto que a digestibilidade aparente total foi de 97 e 83%, respectivamente. Também substituindo milho moído fino por silagem de grão úmido em dietas com dois níveis de amido (21 ou 32%), Oba e Allen (2003b) verificaram maior digestibilidade ruminal do amido para a silagem de grão úmido. Entretanto, a digestibilidade total não diferiu entre os tratamentos sugerindo efeito intestinal compensatório para o tratamento com menor digestibilidade ruminal. Em estudo com vacas produzindo 44 kg/dia e alimentadas com dietas contendo 32% de amido, Bradford e Allen (2007) constataram que a silagem de grão úmido em comparação com milho moído fino aumentou a digestibilidade da matéria orgânica, de 75,9 para 78%, e do amido de 94 para 98%.

Recktenwald et al. (2014) conduziram um estudo com o objetivo de determinar os efeitos de dois níveis de proteína bruta (16,6 vs 15,1% da MS) e dois níveis de amido (21-23 vs 27,5-29,9% da MS), em dietas com ou sem o uso de ionóforo sobre o desempenho

produtivo e metabolismo de nitrogênio de vacas leiteiras. Neste estudo, os autores observaram aumento de CMS em resposta ao maior teor proteico da dieta, e maior produção de leite para vacas alimentadas com dietas de maior teor de amido e de proteína. O teor e a secreção diária de proteína foram maiores para vacas alimentadas com dietas com maior teor de amido, em comparação ao menor nível de inclusão, indicando, novamente, a associação positiva existente entre a disponibilidade ruminal de amido e secreção de proteínas lácteas, possivelmente oriunda da maior produção de proteína microbiana.

Ipharraguerre & Clark (2005) conduziram estudo com objetivo de avaliar os efeitos de porcentagem (14,8, 16,8 e 18,7% de PB na MS) e fonte (farelo de soja extraído por solventes-FSS; e FSS associada com proteína animal de origem marinha mais metionina protegida) de proteína bruta em dietas de vacas leiteiras sobre o desempenho produtivo e utilização de N dietético. Para aumentar o teor proteico das dietas experimentais, os suplementos proteicos substituíram gradualmente uma proporção de milho da dieta. O estudo indicou que o desempenho produtivo das vacas (média = 40 L/d) depende da fonte e do teor de PB da dieta. Quando as vacas foram alimentadas com 18,7% de PB na dieta, a dieta com farelo de soja extraído por solventes como fonte proteica apresentou maior CMS, produção de leite, gordura, proteína, e produção de leite corrigida para gordura, mas apresentaram menor eficiência de uso dos alimentos e escore de condição corporal (ECC), do que vacas alimentadas com fontes de PNDR na dieta (proteína animal de origem marinha mais metionina protegida). Este resultado sugeriu que a PM (proteína metabolizável) não limitou a produção de leite, porém, a energia metabolizável da dieta pode ter limitado o desempenho produtivo das vacas. Em dietas com 16,8% de PB na MS, as vacas que receberam a dieta com as fontes de PNDR apresentaram maior produção de leite corrigida para gordura, e teores de gordura e proteína do que as vacas alimentadas com dietas sem inclusão de fontes de PNDR, o que sugeriu que o fornecimento de aminoácidos pela PM pode ter limitado a produção de leite em dietas sem inclusão de PNDR. De outra forma, as vacas alimentadas com 14,8% de PB na MS da dieta apresentaram a menor média de produção de leite em comparação as demais dietas, o que sugeriu que o teor proteico de 14,8% de PB na MS foi insuficiente para atender quantitativamente a exigência de PM. Por fim, a melhoria da eficiência bruta de uso do N para a produção de leite foi conseguida através de reduções na ingestão de N, de forma independente da fonte de PB.

Desta forma, diversas interações podem ocorrer no rúmen e determinar a disponibilidade de precursores para a síntese láctea, tais como fonte e disponibilidade ruminal de CNF, FDNfe, PDR e PNDR. O aumento do suprimento de carboidratos fermentescíveis no

rúmen pode otimizar a síntese de proteína microbiana e de proteínas lácteas (OBA & ALLEN, 2003; VAZ PIRES et al., 2008), bem como, o fornecimento de fontes de PNDR (BRODERICK et al., 2009), quando a síntese de proteína microbiana é limitada.

2.1.16 Referências Bibliográficas

ABIMILHO_ Associação Brasileira do Milho. 2014. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br/estatistica..> Acessado em 27/01/2017 4.

ALDRICH SR, SCOTT WO, Leng ER. Modern corn production. 2.ed. Champaign: **A & L Publication**. p.371. 1982.

ALI, N.M.M. Effect of alkaline pretreatment and cooking on protein fractions of a high-tannin sorghum cultivar. **Food Chemistry**, v.114, p.646-648. 2009.

ALIO, A., THEURER, C. B., LOZANO, O., HUBER, J.T., SWINGLE, R.S., DELGADO-ELORDUY, A., CUNEO, P., DeYOUNG, D., WEBB. KE, JR. Splanchnic nitrogen metabolism by growing beef steers fed diets containing sorghum grain flaked at different densities. **Journal Animal Science**, v. 78, p. 1355-1365. 2000.

ALLEN, M. S., LONGUSKI, R. A., YING. Y. Endosperm type of dry ground corn grain affects ruminal and total tract digestion of starch in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science** v. 91(E-Suppl. 1), p. 529. 2008.

ALLEN, M.S. 1997. Relationship between fermentation acid production in the rumen and requirement for physically effective fiber. **Journal of Dairy Science**. v. 80 p.1447-1462. 1997.

ANDRADE FILHO, R., REIS, R. B., PEREIRA, M. N., SOUZA, R C. Reconstituição, inoculação e ensilagem de grãos de milho maduros. In: **Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia**, 47 Salvador. Resumos... Salvador: UFBA, SBZ, 2010b. 1 CD. 2010.

ARCARI, M. A., MARTINS, C.M.M.R., TOMAZI, T., GONÇALVES, J.L., SANTOS M.V. Effect of substituting dry corn with rehydrated ensiled corn on dairy cow milk yield and nutrient digestibility. **Animal Feed Science and Technology**, v. 221, Part A, p.167-173. 2016a.

ARCARI, M. A., MARTINS, C. M. M. R; TOMAZI, T., SANTOS, M.V. Effect of the ensiling time of hydrated ground corn on silage composition and *in situ* starch degradability. **Brazilian. Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 53, p 60-71. 2016b.

ARMENTANO, L. E., BERTICS, S. J., DUCHARME, G. A. Response of lactating cows to methionine or methionine plus lysine added to high protein diets based on alfalfa and heated soybeans. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.1194–1199. 1997.

ASHBELL, G., WEINBERG, Z. G., HEN, Y; FILYA, I. The effects of temperature on the aerobic stability of wheat and corn silages. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** v. 28, p. 261-263. 2002.

BACK, S.P., LAZZARI, F.A. Produção, comercialização e consumo de milho em grãos no Brasil. In: LAZZARI & LAZZARI, Silagem de grãos úmido de milho, Curitiba: Ed. Leal Ltda, p.1-6. 2001.

BALL, S. G., VAN DE WAL, M. H. B. J., VISSER, G. F. Progress in understanding the biosynthesis of amylose. **Trends Plants Science**, v. 3, p. 462-467. 1998.

BARON, V. S., STEVENSON, K. R., BUCHANAN-SMITH, J. G. Proteolysis and fermentation of corn grain ensiled at several levels and under several simulated storage methods. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 66, p. 451-461. 1986.

BASSO, F. C., BERNARDES, T. F., ROTH, A. P. T. P., RABELO, C. H. S., RUGGIERI, A. C., REIS, R. A. Fermentation and aerobic stability of high-moisture corn silages inoculated with different levels of *Lactobacillus buchneri*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, p. 2369-2373. 2012.

BEAUCHEMIN, K. A., McALLISTER, T. A., DONG, Y., FARR, B. I., CHENG, K.-J. Effects of mastication on digestion of whole cereal grains by cattle. **Journal Animal Science**, v. 72, p. 236–246. 1994.

BELTON, P.S. Kafirin structure and functionality. **Journal of Cereal Science**, v.44, p.272-286. 2006.

BENTON, J. R., G. E. ERICKSON, T. J., KLOPFENSTEIN, C. N., MACKEN, AND K. J. VANDER POL. Effects of corn moisture and degradable intake protein concentration on finishing cattle performance. **Nebraska Beef Cattle Reports**, pp. 28–30. 2005a.

BENTON, J. R., T. KLOPFENSTEIN, AND G. E. ERICKSON. 2005b. Effects of corn moisture and length of ensiling on dry matter digestibility and rumen degradable protein. **Nebraska Beef Cattle Reports**, pp. 31–33. 2005b.

BERTHIAUME, R., THIVIERGE, M. C., PATTON, R. A., DUBREUIL, P., STEVENSON, M., McBRIDE, B. W., LAPIERRE, H. Effect of ruminally protected methionine on splanchnic metabolism of amino acids in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.1621–1634. 2006.

BITENCOURT, 2012. Luciene Lignani. Substituição de milho moído por milho reconstituído e ensilado ou melaço de soja em vacas leiteiras. 130 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras. 2012.

BOLSEN, K. K., WHITLOCK, L. A., URIARTE-ARCHUNDIA, M. E. Effect of surface spoilage on the nutritive value of maize silage diets. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 13. Auchincruive. Proceedings... Auchincruive, Scotland: [Cornell University] p. 76-77. 2002.

BORSTING, C.F., KRISTENSEN, T., MISCIATTELLI, L., HVELPLUND, T., WEISBJERG, M.R. Reducing nitrogen surplus from dairy farms. Effects of feeding and management. **Livestock Production Science**. v. 83, p.165–178. 2003.

- BRADFORD, B. J., ALLEN, M. S. Philorizin administration does not attenuate hypophagia induced by intraruminal propionate infusion in lactating dairy cattle. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 326-330. 2007.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 60 de 22 de dez. de 2011. Estabelecer o Regulamento Técnico do Milho na forma do presente. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília (23 de dez. 2011); Sec. 1: 3-5. 2011.
- BRODERICK, G. A. Use of milk urea as an indicator of nitrogen utilization in lactating dairy cow. Washington, D.C.: USDA Agricultural Research Service; **US Dairy Forage Research Center**, p.122. 1995.
- BRODERICK, G. A., REYNAL, S. M. Effect of source of rumen-degraded protein on production and ruminal metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.2822-2834. 2009.
- BRODERICK, G. A., STEVENSON, M. J., PATTON, R. A., LOBOS, N. E., OLMOS COLMENERO, J. J. Effect of supplementing rumen-protected methionine on production and nitrogen excretion in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.1092–1102. 2008.
- BRODERICK, G.A. Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.86, p. 1370–1381. 2003.
- BRYDEN, W.L. A review of the nutritive value of sorghum for broilers. RIRDC Publication 09/077. **Rural Industries Research and Development Corporation**, Barton, ACT. 2009.
- CALLISON, S. L., FIRKINS, J. L., EASTRIDGE, M. L., HULL, B. L. Site of nutrient digestion by dairy cows fed corn of different particle sizes or steam-rolled. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1458–1467. 2001.
- CARMO, C. A., BATISTEL, F., SOUZA, J., MARTINEZ, J. C., CORREA, P., PEDROSO, A. M., SANTOS, F. A. P. Starch levels on performance, milk composition and energy balance of lactating dairy cows. **Tropical and Animal Health Production**, v.47, p.179-184. 2015.
- CARVALHO, N.M., NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4ed. Jaboticabal: FUNEP, p. 588. 2000.
- CARVALHO, P. A. Influência do genótipo e maturidade na diversidade microbiana em milho grão para silagem. **Dissertação de mestrado**. Esalq/Usp, Piracicaba. 2014.
- CHAMBA, E.B. Molecular cloning of β -kafirin, a methionine-rich protein of sorghum grain. **Journal of Cereal Science**, v.41, p.381-383. 2005.
- CHESSON, A., FORSBERG, C. W. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Ed.). The rumen microbial ecosystem. 2. ed. London: **Blackie Academic and Professional**, p. 329-381. 1997.

CHOCT, M., BIRD SH, LITTLEFIELD R, BALOGUN R, ROWE JB. Microstructure of grains as an indicator of nutritive value. **Animal Nutrition in Australian** v. 13, p 223-228. 2001.

CONAB –Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_11_08_09_29_24_boletim_graos_novembro_2016.pdf. Acesso em: 10/01/2016. 2016.

CORONA L, OWENS FN, ZINN RA. Impact of corn vitreousness and processing on site and extent of digestion by feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 3020-3031. 2006.

CORONA, L., OWENS, F. N.; ZINN, R. A. Impact of corn vitreousness and processing on site and extent of digestion by feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, Campaign, v. 84, p. 3020-3031. 2006.

CORREA C. E. S., SHAVER, R. D., PEREIRA, M. N., LAUER, J. G., KOHN, K. Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 3008–3012. 2002.

COTTA, M. Amylolytic of Selected Species of Ruminal Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v.54, p.772-776. 1988.

CRUZ J. C., PEREIRA FILHO, I. A., QUEIROZ LR. Quatrocentos e sessenta e sete cultivares de milho estão disponíveis no mercado de sementes no Brasil para a safra 2013/2014. Disponível em: http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_8_ed/cultivares.htm. Acesso em: 21 Agosto de 2015.

GIBBON, B.C., LARKINS B. Molecular genetic approaches to developing quality protein maize. **Tren in genetic**. v. 29. p. 227-233. 2005.

FORATO LA. Estudo das estruturas das Zeínas por RMN, FTIR e MFA. [Tese]. São Carlos: Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos. 2000.

FOX, G., MANLEY, M. Hardness methods for testing maize kernels. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 57(13):5647-5657. 2009.

CYRIAC, J., RIUS, A.G., MCGILLIARD, M.L., PEARSON, R.E., BEQUETTE, B.J., HANIGAN, M.D. Lactation Performance of Mid-Lactation Dairy Cows Fed Ruminally Degradable Protein at Concentrations Lower Than National Research Council Recommendations. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.4704-4713. 2008.

DANES, M. A. C., CHAGAS, L. J., PEDROSO, A. M., SANTOS, F. A. P. Effect of protein supplementation on milk production and metabolism of dairy cows grazing tropical grass. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.407–419. 2013.

DEFOOR, P. J., BROWN, M. S., OWENS, F. N. Reconstitution of grain sorghum for ruminants. In **CATTLE GRAIN PROCESSING SYMPOSIUM**, 1., Oklahoma: CGP, p 93-98. 2006.

DER BEDROSIAN, M. C., KUNG JR. L., NESTOR JR. K. E. The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**. v. 95, p.5115–5126. 2012.

DUODU, K.G. Factors affecting sorghum protein digestibility. **Journal of Cereal Science**, v.38, p.117-131. 2003.

ELKIN, R.G. Condensed tannins are only partially responsible for variations in nutrient digestibilities of sorghum grain cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.848-853.1996.

EVERS AD, BLAKENEY AB, O'BRIEN LO. Cereal structure and composition. **Australian Journal Agricultural Research**, 50(1):629-650. 1999.

FACTORI, M. A., COSTA, C., BIAGGIONI, M. A. M., SALEH, M. A. D. Avaliação do consumo de energia elétrica em duas granulometrias de moagem de grãos de milho de textura dentada e dura. **Boletim da Indústria Animal**, N. Odessa, v. 65, p. 83-88. 2008.

FERNANDES, J., DANIEL, J. L. P., JUNGES, D., CARVALHO, P. A., BACH, B. C., PAZIANI, S. F., NUSSIO, L. G. Prolonged storage off set the negative effect of vitreousness on the degradability of high moisture corn silages. In Proc. **XVII International Silage Conference**. June 1-3. Piracicaba, SP, Brasil, p. 564 -565. 2015.

FERRARETTO, L. F., FREDIN, S. M., SHAVER, R. D. 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**. v. 98 p. 7318–7327. 2015.

FERRARETTO, L. F., K. TAYSOM, D. TAYSOM, R. D. SHAVER, AND P. C. HOFFMAN. Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia-nitrogen, and ruminal *in vitro* starch digestibility in high-moisture corn samples. **Journal of Dairy Science** v. 97, p. 3221–3227. 2014.

FERRARETTO, L. F., P. M. CRUMP., R. D. SHAVER. 2013. Effect of cereal grain type and corn grain harvesting and processing methods on intake, digestion and milk production by dairy cows through a meta-analysis. **Journal of Dairy Science** v. 96, p. 533–550. 2013.

FIRKINS, J. L., M. L. EASTRIDGE, N. R. ST-PIERRE, AND S. M. NOFTSGER. Effects of grain variability and processing on starch utilization by lactating dairy cattle. **Journal Animal. Science**. v. 79 (E. Suppl.): p. E218– E238. 2001.

FRENCH, D. Chemical and physical properties of starch. **Journal of Animal Science** v. 37, p. 1048-1061. 1973.

GARCIA-BOJALIL, C.M; STAPLES, C.R; RISCO, C.A; SAVIO, J.D; THATCHER, W.W. Protein degradability and calcium salts of long-chain fatty acids in the diets of lactating dairy cow: productive responses. **Journal of Dairy Science**. v.81, p. 1374-1384. 1998.

- GIDLEY, M.J. Sorghum grain starch digestibility: effects of particle size and enzyme treatment. In: Annual Australian Poultry Science Symposium, 22, Sydney, New South Wales. Proceedings... Sydney: **The Poultry Research Foundation and The World's Poultry Science Association**, p.139-146. 2011.
- GOMES, M.S., PINHO, R. G. V., RAMALHO, M. A. P., FERREIRA, D. V., BRITO, A. H. Variabilidade genética em linhagens de milho nas características relacionadas com a produtividade de silagem. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**. v. 39, p. 879-885. 2004.
- GONÇALVES, R.S., SILVEIRA, J.R.P., BATTISTIN, A., FERMINO, M.H., BUSNELLO, C.A. Determinação do Teor de Glicose de Diferentes Acessos de Mandioca a partir da Hidrólise Ácida das Raízes. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**. v. 15. 2009.
- GRANT, R. Optimizing starch concentrations in dairy rations. In: TRI-STATE DAIRY NUTRITION CONFERENCE, 2005, Fort Wayne. Proceedings... Fort Wayne, 85. 2005.
- HALL, M, B., HUNTINGTON, G.B. Nutrient synchrony: sound in theory, elusive in practice. **Journal Animal Science** .doi:10.2527-0516. 2007.
- HAMAKER, B. R., MOHAMED, A. A., HABBEN, J. E., HUANG, C. P., LARKINS, B. A. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. **Cereal Chemistry**, v. 72, p. 583-588. 1995.
- HARMON, D. L., MCLEOD, K, R. Glucose uptake and regulation by intestinal tissues implications and whole-body energetics. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. E59-E72. 2001.
- HOFFMAN, P. C., N. M. ESSER, R. D. SHAVER, W. K. COBLENTZ, M. P. SCOTT, A. L. BODNAR, R. J. SCHMIDT, AND R. C. CHARLEY. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starchprotein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p. 2465–2474. 2011.
- HUNTINGTON, G. B. Ruminant starch utilization progress has been extensive. **Feedstuffs**, v. 66, p. 35. 1997.
- HUNTINGTON, G. B. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 852–867. 1997.
- IPHARRAGUERRE, I. R., CLARK, J. H. Varying Protein and Starch in the Diet of Dairy Cows. II. Effects on Performance and Nitrogen Utilization for Milk Production. **Journal of Dairy Science**. v.88, p.2556–2570. 2005.
- JOHNSON, B. C., YOUNG, B. G., MATTHEWS, J. L. Effect of post emergence application rate and timing of mesotrione on corn (*Zea mays*) response and weed control. **Weed Technology**, Lawrence, v. 16, p. 414-420. 2002.
- JOHNSON, L., HARRISON, J. H., HUNT, C., SHINNERS, K., DOGGETT, C. G., SAPIENZA, D. Nutritive value of corn silage as affected by maturity and mechanical

processing: A contemporary review. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2813-2825. 1999.

JOHNSON, L.M., HARRISON, J.H., DAVIDSON, D. Corn silage management I: Effects of hybrid, maturity, and mechanical processing on chemical and physical characteristics. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.833-853. 2002.

JONKER, J.S., KOHN, R.A., High, J. Dairy herd management practices that impact nitrogen utilization efficiency. **Journal of Dairy Science**. v.85, 1218–1226. 2002.

JONSSON, A. Growth of *Clostridium tyrobutyricum* during fermentation and aerobic deterioration of grass silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 54, n. 4, p. 557-568. 1991.

JUNGES, D., MORAIS, G., DANIEL, J. L. P., SPOTO, M. H. F., NUSSIO, L. G. Contribution of proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. In Proc. **XVII International Silage Conference**. June 1-3. Piracicaba, SP, Brasil, p. 566-567. 2015.

JURJANZ, S., MONTELS, V. Ruminant degradability of corn forages depending on the processing method employed. **Animal Research**, v. 3, p. 15-23. 2005.

KALSCHEUR, K. F., BALDWIN, R. L., GLENN, B. P., KOHN, R. A. Milk Production of Dairy Cows Fed Differing Concentrations of Rumen-Degraded Protein. **Journal of Dairy Science**. v.89, p. 249–259. 2006.

KENT N L. Technology of Cereals. 3 ed., Oxford: Pergamon Press. p. 334. 1983.

KIM, K. H., CHOUNG, J. J., CHAMBERLAIN, D. G. Effects of varying the degree of synchrony of energy and nitrogen release in the rumen on the synthesis of microbial protein in lactating dairy cows consuming a diet of grass silage and a cereal-based concentrate. **Journal Science Food Agriculture** v. 79, p. 1441-144. 1999.

KLEINSCHMIT, D.H. AND L. KUNG, JR. The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage. **Journal of Dairy Science**. v. 89, p. 3999 - 4004. 2006.

KNOWLTON, K. F., GLENN, B. P., ERDMAN, R. A. Performance, ruminal fermentation, and site of starch digestion in early lactation cows fed corn grain harvested and processed differently. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.1972-1984. 1998.

KOTARSKI, S. F., WANISKA, R. D., THURN, K. K. Starch hydrolysis by the ruminal microflora. **Journal of Nutrition**, v. 22, p. 178-190. 1992.

KREIKEMEIER, K. K., HARMON, D. L., BRANDT, R. T., AVERY Jr., T. B., JHONSON, D. B. Small intestinal starch digestion in steers: effect of various levels of abomasal glucose, corn starch and corn dextrin infusion on small intestinal disappearance and net glucose absorption. **Journal of Animal Science**, v.69, p.328-338. 1991.

KUNG, Jr., L., MYERS, C. L., NEYLON, J. M., TAYLOR, C. C., LAZARTIC, J., MILLS, J. A., WHITER, A. G. The Effects of Buffered Propionic Acid-Based Additives Alone or Combined with Microbial Inoculation on the Fermentation of High Moisture Corn and Whole-Crop Barley. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1310–1316. 2004.

KUNG, JR., L., SCHMIDT, R. J., EBLING, T. E., HU, W. The Effect of *Lactobacillus Buchneri* 40788 on the Fermentation and Aerobic Stability of Ground and Whole High-Moisture Corn. **Journal of Dairy Science, Champaign**, v. 90, p. 2309–2314. 2007.

KUNG, L. JR., M. C. WINDLE, AND N. WALKER. 2014. The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of high moisture corn. **Journal of Dairy Science** v. 97, p. 1707–1712. 2014.

KUNG, L. JUNIOR., STOKES, M. R., LIN, C. J. Silage additives. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H (Co-ed.). **Silage science and technology**. Madison: ASA. Cap. 7, p. 305-360. 2003.

LAMBERT, R. J., STRATFORD, M. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, p. 157-164. 1999.

LAWTON, J. W. Zein: A history of processing and use. **Cereal Chemistry**, v. 79, p. 1-5. 2002.

LAZZARI, F. A., LAZZARI, S. M. N. Aspectos sanitários da silagem de grãos úmido de milho. In: Silagem de grãos úmido de milho. Curitiba: Ed. Leal Ltda, p. 39-46. 2001.

LOPES, J. C., SHAVER, R. D., HOFFMAN, P. C., AKINS, M. S., BERTICS, S. J. Type of corn endosperm influences nutrient digestibility in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science** v. 92, p.4541–4548. 2009.

LOZANO, O., THEURER, C. B., ALIO, A., HUBER, J. T., DELGADO-ELORDUY, A.; CUNEO, P., DEYOUNG, D., SADIK, M., SWINGLE, R. S. Net absorption and hepatic metabolism of glucose, L-lactate and volatile fatty acids by steers fed diets containing sorghum grain processed as dry-rolled or steam-flaked at different densities. **Journal of Animal Science**, v.78, p.1364-1375. 2000.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. Fisiologia da produção do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 10p. Circular Técnica n.76. 2006.

MARI, L. J., SCHMIDT, R. J., NUSSIO, L. G., HALLADA, C. M., KUNG JR, L. 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**, v. 92, p. 1174-1176. 2009.

MARTINEZ, G. M., FIGUEROA-CARDENAS, J.D., REYES-VEGAS, M.L., RINCON-SANCHEZ F. Microstructure of Starch Granule Related To Kernel Hardness in corn. **Revist. Fito Mexico**; v. 29, p. 135 – 139. 2006.

MCALLISTER, T. A., HRISTOV, A.N., BEAUCHEMIN, K.A. Enzymes in ruminant diets. In: Bedford MR, Partridge GG. Enzymes in farm animal nutrition. Oxon: Cab International. Cap. 11, p.273-298. 2001.

- McDONALD, P., HENDERSON, A. R., HERON, S. J. E. Microorganisms. In: McDONALD, P. **The biochemistry of silage**. 2. ed. Aberystwyth, UK: Chalcombe Publications, p. 81-152. 1991.
- MELLO Jr., C.A. Processamento de grãos de milho e sorgo visando aumento do valor nutritivo. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 4., Piracicaba. Anais... Piracicaba: FEALQ. p.263-283. 1991
- MESA-STONESTREET, D. Sorghum proteins: the concentration, isolation, modification, and food applications of kafirins. **Journal of Food Science**, v.75, p.90-104. 2010.
- MIGLIANO, M. E. D. A., SILANO, C., MARTINS, C. M. M. R., ARCARI, M. A., SANTOS, M. V. Effect of dietary nitrogen source and crude protein content on nitrogen balance and lactating performance of dairy cows. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. n 53 p 72-81. 2016.
- MOMANY, F.A., SESSA, D.J., LAWTON, J.W., SELLING, G.W., HAMAKER, S.A.H., WILLETT, J.L. Structural characterization of alpha-zein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington, v.54, p.432-439. 2006.
- MORON, I.R., TEIXEIRA, J.C., OLIVEIRA, A.I.G., PEREZ, J.R.O., OLIVEIRA, J.S. Cinética da digestão ruminal da matéria seca dos grãos de milho e sorgo submetidos a diferentes métodos de processamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 23, p. 174-178. 1999.
- MU-FORSTER, C., WASSERMAN, B. P. Surface localization of zein storage proteins in starch granules from maize endosperm: proteolytic removal by thermolysin and in vitro cross-linkage of granule-associated polypeptides. **Plant Physiology**, v. 116, p. 1563-1571. 1998.
- NCGA. NATIONAL CORN GROWERS ASSOCIATION. Disponível em: <http://www.ncga.com>. Acessado em: 20 mar. 2016.
- NEWBOLD, J. R., LEWIS, E. A., LAVRIJSSEN, L., BRAND, H. J., VEDDER, H., BAKKER, J. Effect of storage time on ruminal starch degradability in corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. T94, Supplement, 1. 2006.
- NGONYAMO-MAJEE, D., SHAVER, R. D., COORS, J. G., SAPIENZA, D., LAUER, J. G. Relationship between kernel vitreousness and dry matter degradability for diverse corn germplasm. II. Ruminal and post-ruminal degradabilities. **Animal Feed Science Technology**, v. 142, p. 259-274. 2008.
- NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of dairy cattle. 7. rev. ed. Washington, DC.: Natl.Acad. Sci. 2001.
- O'CONNOR, J. D., C. J. SNIFFEN, D. G. FOX, AND W. CHALUPA. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: IV. Predicting amino acid adequacy. **Journal Animal Science**. v.71, p.1298-1311. 1993.

OBA, M., ALLEN, M. S. Effect of corn grain conservation method on ruminal digestion kinetics for lactating dairy starch concentration. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.184-194. 2003a.

OBA, M., ALLEN, M. S. Effects of corn grain conservation method on feeding behavior and productivity of lactating dairy cows at two dietary starch concentrations. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 174-183. 2003b.

ØRSKOV, E. R. Starch digestion and utilization in ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 63, p.1624–1633. 1986.

OSHIMA, M., MCDONALD, P. A review of the changes in nitrogenous compounds of herbage during ensilage. **Journal Science Food Agriculture**, v.29, p.497-508. 1978.

OWENS, F. N., GOETSCH, A. L. Digest passage and microbial protein synthesis. In: MILLIGAN, L. P. (Ed.). Control on digestion and metabolism in ruminants. **Englewood Cliffs**, Prentice Hall, v. 8, p. 196-223. 1986.

OWENS, F. N., SECRIST, D. S., HILL, W. J., GILL, D. R. The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 868-879. 1997.

PAES, M. C. D. Manipulação da composição química do milho: impacto na indústria e na saúde humana. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/milho/index.htm>. Acesso em: 30 jan. 2017. 2008.

PAHLOW, G., R. E. MUCK, F. DRIEHUIS, S. J. W. H. OUDE ELFERINK, AND S. F. SPOELSTRA. Microbiology of ensiling. Pages 31–93 in Silage Science and Technology. D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H Harrison, ed. **American Society of Agronomy**, Madison, WI. 2003.

PATERNIANI, E., VIÉGAS G P. Melhoramento e produção de milho. Campinas: Fundação Cargill, p.795. 1987.

PATTON, R. A., PATTON, J. R., BOUCHER, S. E. Defining ruminal and total-tract starch degradation for adult dairy cattle using in vivo data. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 765–782. 2012.

PEREIRA, M. L. R. Degradabilidade ruminal *in vitro* de grão reidratado e ensilado de milho e sorgo com diferentes granulometrias. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2012.

PEREIRA, M. N., PEREIRA, R. A. N. Processamento de milho por re-hidratação e ensilagem. In: ENCONTRO DE CONFINAMENTO, 8. Ribeirão Preto. Anais ... Ribeirão Preto: Coan. p.141-162. 2013.

PEREIRA, M. N., PINHO, R. G., VON., B, R, G, da S., CALESTINE, G, A. Ruminal Degradability of Hard or Soft Texture Corn Grain at Three Maturity Stage. **Scientia Agricola**, v. 61, p. 358-363. 2004.

- PHILIPPEAU, C., MICHALET-DOREAU, B. Influence of genotype and stage of maturity of maize on rate of ruminal starch degradation. **Animal Feed Science and Technology**, v.68, p.25-35. 1997.
- PHILIPPEAU, C., MICHALET-DOREAU, B. Influence of genotype and ensiling of corn grain on in situ degradation of starch in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2178-2184. 1998.
- PHILIPPEAU, C., MONREDON, F. L. D., DOREAU, M. Relationship between ruminal starch degradation and the physical characteristics of corn grain. **Journal of Animal Science** v.77, p. 238-243. 1999.
- PHILIPPEAU, C., LANDRY, J., MICHALET-DOREAU, B. Influence of the protein distribution of maize endosperm on ruminal starch degradability. **Journal Science Food Agriculture**, v. 80, p. 404–408. 2000.
- PIRES, A. V., SUSIN, I., SIMAS, J. M. C., SANTOS, F. A. P., MENDES, C. Q., OLIVEIRA JUNIOR, R. C., FERNANDES, J. J. R., ARAUJO, R. C. Substituição de silagem de milho por cana-de-açúcar e caroço de algodão nos parâmetros ruminiais, síntese de proteína microbiana e utilização dos nutrientes em vacas lactantes. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, p. 50-58. 2008.
- PRATT, R. C., PAULIS, J. W., MILLER, K., NELSEN, T., BIETZ, J. A. Association of zein classes with maize kernel hardness. **Cereal Chemistry**, v. 72, p. 162-167. 1995.
- QUEIROZ, O. C. M., RABAGLINO, M. B., ADESOGAN, A. T. Mycotoxins in silage. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2., 2011, São Pedro. Proceedings... Piracicaba: FEALQ, p. 105-126. 2011.
- RANJIT, N. K., KUNG, L. JR. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 526-535. 2000.
- RECKTENWALD, D. A., ROSS, D. A., FESSENDEN, S. W., WALL, C. J., VAN AMBURGH, M. E. Urea-N recycling in lactating dairy cows fed diets with 2 different levels of dietary crude protein and starch with or without monensin. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.1611-1622. 2014.
- REYNAL, S.M., BRODERICK, G.A. Effects of feeding dairy cows protein supplements of varying ruminal degradability. **Journal of Dairy Science** v. 86, p. 835-843. 2003.
- REYNAL, S.M., BRODERICK, G.A. Effect of dietary level of rumen degraded protein on production and nitrogen metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science** v. 88, p. 4045- 4064. 2005.
- REZENDE, A. V., RABELO, C. H. S., VEIGA, R. M., ANDRADE, L. P., HÄRTERB, C. J., RABELO, F. H. S., BASSO, F. C., NOGUEIRAD, D. A., REIS, R. A. Rehydration of corn grain with acid whey improves the silage quality. **Animal Feed Science. Technology**. v. 197, p. 213–221. 2014.

- RICHARDS, C. J., BRANCO, A. F., BOHNERT, D. W., HUNTINGTON, G. B., MACARI, M., HARMON, D. L. Intestinal starch disappearance increased in steers abomasally infused with starch and protein. **Journal Animal Science**, v.80, p. 361-3368. 2002.
- ROONEY, L. W.; PFLUGFELDER, R. L. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. **Journal of Animal Science**, v. 63, p. 1607-1623. 1986.
- SANTOS, F. A. P.; SANTOS, J. E. P.; THEURER, C. B. Effects of Rumen-Undegradable Protein on Dairy Cow Performance: A 12-Year Literature Review. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.3182-3213. 1998.
- SANTOS, F.A.P. Metabolismo de proteínas. In: BERCHIELLI, T.T; PIRES, A.V; OLIVEIRA, S.G. Nutrição de Ruminantes. Jaboticabal: FUNEP, cap. 9, p.259- 261. 2006.
- SASTRY, L.V.S. Genetic variation of storage proteins in sorghum grain: Studies by isoelectric focusing and high-performance liquid chromatography. **Cereal Chemistry**, v.63, p.420-427. 1986.
- SCHMIDT, J.; SIPOCZ, P.; CENKVARI, E.; SIPOCZ, J. Use of protected methionine (Mepron M 85) in cattle. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.47, p.409–418. 1999.
- SCHMIDT, R. J., W. HU, J. A. MILLS, AND L. KUNG JR. The development of lactic acid bacteria and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation of alfalfa silage. **Journal of Dairy Science** v. 92, p. 5005–5010. 2009.
- SEBASTIAN, S., PHILLIP, L. E., FELLNER, V., IDZIAK, E. S. Comparative assessment of bacterial inoculation and propionic acid treatment on aerobic stability and microbial populations of ensiled high-moisture ear corn. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, p. 447-456. 1996.
- SELLE, P. H., CADOGANB, D.J., LI, X., BRYDEN, W. L. Implications of sorghum in broiler chicken nutrition. **Animal Feed Science and Technology**; v. 156, p. 57- 74. 2010.
- SHEWRY, P. R., HALFORD, N. G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. **Journal of Experimental Botany**. v. 53, p. 947-958. 2002.
- SHOTWELL, M. A., LARKINS, B. A. The biochemistry and molecular biology of seed storage proteins. **The Biochemistry of Plants: Comprehensive Treatise**, v. 15, p. 297-345. 1989.
- SOLOMONS, T. W. G. Organic chemistry. [S.l]: University of Florida, v. 1. 1992.
- SOUZA, A. L., GARCIA, R., VALADARES, R. F. D., PEREIRA, M. L. A., CABRAL, L. S., VALADARES FILHO, S. C. Casca de café em dietas para vacas em lactação: balanço de compostos nitrogenados e síntese de proteína microbiana. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 1860-1865. 2006.

STERM, M. D.; HOOVER, W. H. Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: A review. **Journal. Animal. Science**, v. 49, p.1590–1603. 1979.

STOCK, R.A. Nutritional benefits of specialty grain hybrids in beef feedlot diets. **Journal of Animal Science**, v. 77, Suppl. 2, p. 208-212. 1999.

TABACCO, E., PIANO, S., REVELLO-CHION, A., BORREANI, G. Effect of *Lactobacillus buchneri* LN4637 and *Lactobacillus buchneri* LN40177 on the aerobic stability, fermentation products, and microbial populations of corn silage under farm conditions. **Journal of Dairy Science**, v 94, p. 5589-5598. 2011.

TAYLOR, C. C., ALLEN, M. S. Corn grain endosperm type and brown midrib 3 corn silage: Feeding behavior and milk yield of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 1425–1433. 2005.

TAYLOR, C. C., KUNG, L. JR. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation and aerobic stability of high moisture corn in laboratory silos. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1526–1532. 2002.

TAYLOR, J. Preferential binding of sorghum tannins with γ -kafirin and the influence of tannin binding on kafirin digestibility and biodegradation. **Journal of Cereal Science**, v.46, p.22-31. 2007.

TAYLOR, J.R.N., SCHÜSSLER, L., VAN DER WALT, W.H. Fractionation of proteins from low-tannin sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.32, p.149–154. 1984.

TESTER, R. F., KARKALAS, J., QI, X. Starch-composition, fine structure and architecture. **Journal Cereal Science**, v. 39, p. 151-165. 2004.

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

THEURER, C. B., HUBER, J. T. DELGADO-ELORDUY, A., WANDERLEY, R. Invited review: summary of steam-flaking corn or sorghum grain for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 1950–1959. 1999.

TONROY, B. R., PERRY, T. W., BEESON, W. M. Dry, ensiled high-moisture, ensiled reconstituted high-moisture and volatile fatty acid treated high moisture corn for growing-finishing beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 39, p. 931-936. 1974.

USDA – United States Department of Agriculture. Data & Analysis. World Agricultural Production. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/data/world-agriculturalproduction>. Acesso em: 11/02/2017.

VALKENERS, D, A., THÉWIS, F., PIRON, & Y. BECKERS. Effect of imbalance between energy and nitrogen supplies on microbial proteins synthesis and nitrogen metabolism in growing Double-muscled Belgian Blue bills. **Journal Animal Science**. v.82, p. 1818-1825. 2004.

VAN BARNEVELD SL. Chemical and physical characteristics of related to variability in energy and amino acid availability in ruminal: a review. **Australian Journal of Agricultural Research**. v. 50, p. 651-666. 1999.

VAN SOEST, P.J. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press. p.476. 1994.

VAZ PIRES, A., SUSIN, I., SANTOS, F. A. P., MENDES, C. Q., OLIVEIRA JUNIOR, R. C., FERNANDES, J. J. R., SIMAS, J. M. C. Efeito de fontes e formas de processamento do amido sobre o desempenho e o metabolismo do nitrogênio em vacas holandesas em lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.1456-1462. 2008.

VIERSTRA, R. D. Proteolysis in plants: Mechanisms and functions. **Plant Molecular Biology**, v.32, p. 275–302. 1996.

WANG, T. L., BOGRACHEVA, T. Y., HENDLEY, C. L. Starch: as simple as A, B, C? **Journal Experimental Botanical**, v. 49, p. 481-502. 1998.

WATSON SA. Structure and composition. In: Watson SA, Ramstad PE. Corn: chemistry and technology. St.Paul: **American Association. Cereal Chemistry**, p.53-82. 1987.

WONG, J.H. Principal component analysis and biochemical characterization of protein and starch reveal primary targets for improving sorghum grain. **Plant Science**, v.179, p.598-611. 2010.

YOUNG, K. M., J. M. L IM, M. C. DER BEDROSIAN, L. KUNG JR. Effect of exogenous protease enzymes on the fermentation and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**. v. 95, p. 6687-6694. 2012.

ZEOULA, L. M., CALDAS NETO, S. F. Recentes avanços em amido na nutrição de vacas leiteiras. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM BOVINOCULTURA DE LEITE, Lavras. Anais... Lavras: Universidade Federal de Lavras. p. 249-284. 2001.

ZINN, RA, OWENS FN, WARE RA. Flaking corn: processing mechanics, quality standards, and impacts on energy availability and performance of feedlot cattle. **Journal of Animal Science**. v. 80, p. 1145-1156. 2002.

3 *Capítulo 3*

3.1 Efeito do tempo de ensilagem, vitreosidade e uso de inoculante bacteriano sobre composição e digestibilidade *in situ* da silagem de milho reidratado.

3.1.1 Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do teor de vitreosidade, da inoculação bacteriana e do tempo de ensilagem sobre a composição química e digestibilidade ruminal *in situ* do amido e da proteína de silagem de milho reidratado (SMR). A SMR foi produzida a partir de 3 híbridos com diferentes teores de vitreosidade (58% (AG 8580), 70% (Dow 2B710) e 80% (DKB390)), os quais foram moídos, reidratados e ensilados em mini silos ($\pm 500\text{g}$) constituídos de filme de polipropileno (200 micras), com e sem o uso de inoculante bacteriano (*Lactobacillus buchneri* cepa CNM I-4323, na concentração de 600.000 ufc/g de matéria natural). Os silos experimentais foram avaliados aos 0, 15, 30, 60, 120, 240 e 400 dias de ensilagem. Os dados foram avaliados usando um delineamento split-split plot usando o PROC MIXED do SAS com delineamento em arranjo fatorial $3 \times 2 \times 7$ (3 híbridos, uso ou não de inoculante e 7 tempos de ensilagem). O pH da silagem de grãos de milho reidratados decresceu para todos os tratamentos, sendo que aos 15 dias de ensilagem as silagens sem o uso de inoculante apresentaram os menores valores em comparação com os demais tratamentos. O tempo de ensilagem aumentou o teor de proteína solúvel em percentual da proteína bruta (PS%PB) em todos os tratamentos avaliados. Aos 400 dias de ensilagem, as silagens de baixa e média vitreosidade com inoculante bacteriano, apresentaram os dois maiores teores de PS%PB de 68,36 e 67,54% respectivamente em comparação com os demais tratamentos no mesmo tempo de ensilagem. A concentração de nitrogênio amoniacal em percentual da proteína bruta (N-NH₃%PB) foi maior aos 15 dias de ensilagem para todos os tratamentos em comparação com os demais tempos de ensilagem. Aos 15 dias de ensilagem, foi observada maior concentração de N-NH₃%PB para a silagem de baixa vitreosidade inoculado (3,4%/PB) em comparação com os demais tratamentos. A concentração de ácido lático foi maior para tratamento com baixa vitreosidade e sem inoculante, durante todo o período de ensilagem. Foi observada maior concentração de ácido acético na silagem de média vitreosidade com inoculante, quando comparado aos demais tratamentos. Até os 240 dias, a digestibilidade do amido e da PB das silagens feitas a partir de híbridos de baixa e média vitreosidade foi maior

do que para silagens de híbridos de alta vitreosidade, sem ser observado efeito de inoculante neste período. No entanto, aos 400 dias foi observado que o uso de inoculante bacteriano aumentou a digestibilidade do amido e da PB para todos os tratamentos inoculados em comparação às silagens sem inoculante com o mesmo tamanho de partícula. O aumento do teor de vitreosidade dos híbridos aumentou o tempo necessário para o aumento da digestibilidade do amido e da PB em comparação com híbridos de menor vitreosidade. Não foi observada alteração do teor de nitrogênio dos híbridos ao longo do tempo de ensilagem, entretanto quanto maior o teor de vitreosidade mais lento foi o aumento do teor de proteína solúvel ao longo do tempo de ensilagem.

Palavras chave: amido, degradabilidade, inoculante, tempo, vitreosidade

3.1.2 Introdução

O milho seco moído é o principal concentrado energético para dietas de vacas leiteiras de elevada produção (ARCARI et al., 2016a). O amido é o principal e mais importante componente do grão de milho e representa cerca de 70% da matéria seca (MS) (FIRKINS et al., 2001). Entretanto, variedades de milho com elevado teor do endosperma vítreo tem menor degradação ruminal *in situ* (CORREA et al., 2002) e digestibilidade aparente total do amido do milho (ARCARI et al. 2016a) do que variedade com menor vitreosidade.

Vacas leiteiras alimentadas com silagem de grãos úmidos e de grãos reidratados produziram mais leite que vacas alimentadas com milho seco moído (FIRKINS et al., 2001; FERRARETTO et al., 2013; ARCARI et al., 2016a). Esse aumento da produção de leite está relacionado à degradação da matriz proteica que envolve o amido do endosperma, causada pelo processo de ensilagem, o que aumenta a disponibilidade energética do grão (HOFFMAN et al., 2011). A degradação da zeína, principal proteína hidrofóbica da matriz proteica do grão de milho, aumenta a ação bacteriana no rúmen e também de enzimas digestivas no abomaso e intestino sobre o amido (GIUBERTI et al., 2014). O processo de ensilagem aumenta a digestibilidade do amido de acordo com o aumento do tempo de ensilagem dos grãos, seja por fermentação *in vitro* (FERRARETTO et al., 2014 e KUNG et al., 2014) ou *in situ* (BENTON et al., 2005, ARCARI et al., 2016a). Entretanto, além do tempo de ensilagem, outros fatores como tamanho de partícula, umidade do grão e tipo de endosperma podem afetar a digestibilidade do amido do milho como descritos para silagem de grão úmido e milho moído seco (FERRARETTO et al., 2013; FERRARETTO et al. 2014; GIUBERTI et al., 2014).

A reidratação com posterior ensilagem dos grãos de milho é uma prática que pode representar uma opção em relação a confecção de silagem de grãos úmidos. O uso da SMR pode ser uma alternativa em razão da carência de maquinário específico com elevada capacidade de processamento de grãos, ou ainda ao excesso de chuvas no período em que o milho se encontra no ponto correto para a confecção de silagem de grão úmido. Entretanto, existem poucos estudos sobre os fatores que influenciam a composição e a digestibilidade do amido do milho de híbridos com diferentes teores de vitreosidade, durante longos períodos de ensilagem da silagem de milho reidratado.

Nossa hipótese é de que a digestibilidade da SMR varia de acordo com a vitreosidade do híbrido de milho e do tempo de ensilagem, sendo que para atingir a mesma digestibilidade dos híbridos de menor vitreosidade, os híbridos de maior vitreosidade necessitam de maior tempo de ensilagem. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do teor de vitreosidade, da inoculação bacteriana e do tempo de ensilagem sobre a composição química e digestibilidade ruminal *in situ* do amido e da proteína de SMR.

3.1.3 Material e Métodos

3.1.3.1 Delineamento experimental e arranjo de tratamentos

O estudo teve delineamento experimental split-split plot e com arranjo fatorial de tratamentos $3 \times 2 \times 7$ (três teores de vitreosidade, inclusão ou não de inoculante bacteriano e sete tempos de ensilagem), em quadruplicata. O teor de vitreosidade do milho apresentou 3 classes, de acordo com as seguintes variedades, de acordo com o teor médio (%) de endosperma vítreo: baixa vitreosidade (AG 8580: 58%); média vitreosidade (Dow 2B710: 70%); alta vitreosidade (DKB390: 80%). Os lotes de milho receberam ou não a adição de *Lactobacillus buchneri* cepa CNM – I4323 (Katec Lallemand® Goiânia Brasil), na concentração de 600.000 ufc/g de matéria natural, a qual foi misturada juntamente com a água utilizada para a reidratação.

3.1.3.2 Processo de ensilagem

As três variedades de milhos (Dow 2B710; AG 8580 e DKB390) foram provenientes da área agrícola do campus da Universidade de São Paulo – Pirassununga – SP, os quais foram colhidos em fevereiro de 2014. Os grãos de milho apresentavam teor de MS médio de 820 g MS/Kg e foram submetidos a secagem em estufa de ventilação forçada até atingirem uma média de MS de 87%. Os híbridos de milho, posteriormente à secagem, foram moídos em moinho de martelos dotado de peneira de 8mm. O tamanho de partícula e a composição química estão apresentados na Tabela 2. O tamanho de partícula do milho moído foi determinado por um sistema de peneiras de 2,000; 1,000; 840, 500, 250, 149 e 105 µm de porosidade (BAKER & HERRMAN, 2002).

Após a moagem, cada lote de milho foi dividido em duas sub-parcelas (com e sem inoculação bacteriana), e posteriormente foram reidratados para atingir teor de MS de 670 g MS/Kg. Após reidratação, quadruplicatas de cada tratamento foram embalados em mini silos de 500g (bags de polietileno de 250 micras de espessura e compactado por uma prensa hidráulica, totalizando 28 mini silos por tratamento. Os mini silos foram armazenados em uma sala escura com temperatura aproximada de $25 \pm 4^\circ\text{C}$ e avaliados de acordo com os seguintes tempos de ensilagem: 0, 15, 30, 60, 120, 240 e 400 dias.

Tabela 2 - Composição química, teor médio de vitreosidade, tamanho médio de partícula e uso de inoculante (*Lactobacillus buchneri* - i) do milho moído utilizado para a confecção da silagem de milho reidratado.

	Vitreosidade e inoculação							P	
	BVc	BVi	MVc	MVi	AVc	AVi	EPM	Inoculante	Vitreosidade
Composição química dos híbridos (%)									
MS pré-reidratação	87,12	87,25	88,27	87,92	87,54	87,91	0,92	0,45	0,37
MS pós-reidratação	67,43	67,38	67,45	67,41	67,45	67,48	0,54	0,65	0,55
PB (% MS)	7,95	7,95	7,97	7,97	8,48	8,48	-	-	-
Amido (% MS)	69,16	69,16	68,91	68,91	70,02	70,02	-	-	-
Vitreosidade									
% do endosperma	58	58	70	70	80	80	-	-	-
Tamanho de partícula									
Tamanho médio de partícula (µm)	1.619	1.621	1.653	1.605	1.638	1.635	0,12	0,81	0,45

PB: proteína bruta; BVc: baixa vitreosidade sem inoculação; BVi: baixa vitreosidade inoculado; MVc: média vitreosidade sem inoculação; MVi: média vitreosidade inoculado; AVc: alta vitreosidade sem inoculação; AVi: alta vitreosidade inoculado.

3.1.3.3 Análises de composição química

Ao completarem o período de ensilagem, os mini silos foram congelados a -20°C para interrupção da fermentação. Após todas as amostras completarem o período pré-estipulado de armazenagem, as mesmas foram descongeladas em temperatura ambiente para realização de análises laboratoriais. Após o descongelamento dos mini silos, 100 g de amostra foram submetidas à determinação de pH com potenciômetro (AOAC 1990; método 973.49), das concentrações de N-NH₃ (CUNNIFF 1995) e de AGCC (ERWIN et al., 1961). O restante da amostra foi seco em estufa de circulação forçada (60°C / 48 h) moído em moinho tipo Wiley em peneira de 1mm, para determinação das concentrações de MS (método AOAC, 1990; 934.01), amido (EHRMAN 1996), PB (por combustão - método AOAC 1990 992.23 - para evitar a volatilização de parte do N da amostra e proteína solúvel em tampão borato-fosfato (KRISHNAMOORTHY et al., 1982).

Para a determinação da digestibilidade *in situ* em 7 horas, foram utilizados 5g de amostra pré-secada (HEUER et al., 2014). As amostras foram colocadas em bags de nylon (5cm x 10cm) com porosidade de 50 microns (Concentrate Bag – Ankon) e incubadas em 4 vacas da raça Holandesa, portadoras de cânulas ruminais, imediatamente após a alimentação. A dieta das vacas foi composta por silagem de milho (50%), farelo de soja (15%), silagem de milho reidratado (32.5%), ureia (0.5%) e mistura mineral (1.5%). Após 7 horas de incubação, as amostras foram retiradas do rúmen e lavadas em água até que a mesma estivesse límpida. Posteriormente, os bags foram secos em estufa de ar forçado (55°C / 48h) e pesados para obter a digestibilidade da MS. Após a pesagem, os bags foram abertos e o resíduo de incubação também foi analisado quanto ao teor de amido e proteína, para obter-se a digestibilidade de ambos.

3.1.4 Análise Estatística

Os dados foram avaliados como um split-split plot (Littell et al., 1996) usando os procedimentos PROC MIXED do SAS (SAS Institute, 2001). Três híbridos de diferentes vitreosidade (baixa, média e alta) foram definidos como parcelas inteiras com tempo de ensilagem e inoculação como subparcelas. Os principais efeitos no modelo incluíram a vitreosidade, o inoculante, o tempo de ensilagem e suas interações. Os efeitos aleatórios do modelo incluíram replicação e interações de replicação com a vitreosidade e inoculante. Os

principais efeitos e as principais interações foram declarados quando $P < 0,05$. O arranjo de tratamentos foi em esquema fatorial de tratamentos $3 \times 2 \times 7$, com 3 tipos de endosperma, 2 tipos de inoculação e 7 tempos de ensilagem. O efeito do tempo de ensilagem foi avaliado como medidas repetidas no tempo. Diversas estruturas de erros foram investigadas, e a estrutura escolhida para cada variável avaliada foi de acordo com o critério de informação bayesiano (BIC).

3.2 Resultados

O teor médio de matéria seca (MS) (antes e depois da reidratação), amido, PB, vitreosidade e o tamanho médio de partículas dos 3 híbridos de milho utilizados para confecção da silagem estão descritos na tabela 2. Devido a numerosas ocorrências de interações entre vitreosidade dos híbridos, o tempo de ensilagem e o tipo de inoculação que influenciaram o pH, frações nitrogenadas e digestibilidade, os resultados foram apresentados na forma de gráfico para facilitar a interpretação e o entendimento dos resultados. Os efeitos principais e suas interações para parâmetros de composição química e digestibilidade *in situ* da silagem de milho reidratado estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Análise estatística do efeito da vitreosidade, tempo de ensilagem e inoculação bacteriana sobre a composição química, produtos de fermentação e digestibilidade *in situ* de grãos de milho reidratados e ensilados.

	Composição Química								Digestibilidade <i>in situ</i> 7 h	
	MS	pH	Amido	N-NH ₃	PB	PS	Ac. Acético	Ac. Lático	Amido	PB
<i>Valor P - Efeito principal</i>										
Vitreosidade	0,11	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Inoculante	0,19	<0,01	0,21	<0,01	0,22	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Tempo	0,61	<0,01	0,49	<0,01	0,11	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<i>Valor P - Interações</i>										
V×I	0,61	<0,01	0,2	<0,01	0,31	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
V×T	0,68	<0,01	0,54	<0,01	0,91	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
I×T	0,08	<0,01	0,49	<0,01	0,16	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
V×I×T	<0,01	<0,01	0,54	<0,01	0,39	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
EPM	0,35	0,04	0,03	0,03	0,04	0,02	0,03	0,02	0,54	0,16

MS: matéria seca; PB: proteína bruta; PS: proteína solúvel expresso em percentual da PB; N-NH₃: nitrogênio amoniacal expresso em percentual da PB; Ácido acético: expresso em % da MS; Ácido lático: expresso em mmol/L; V×I: vitreosidade × inoculante; V×T: vitreosidade × tempo; I×T: inoculante × tempo; V×I×T: vitreosidade × inoculante × tempo, EPM: erro padrão da média.

O teor de MS da silagem não foi alterado ($P > 0,05$) pelas variáveis avaliadas (Tabela 3). Entretanto foi observado efeito de interação tripla entre teor de vitreosidade, inoculante bacteriano e tempo de ensilagem ($V \times I \times T$) sobre o teor de MS ($P < 0,01$) (Figura 1). O pH da silagem de todos os tratamentos decresceu ao longo do tempo de ensilagem ($P < 0,01$), entretanto as silagens inoculadas apresentaram maiores valores de pH ($P < 0,01$) do que as silagens não inoculadas (figura 1). As silagens sem inoculante alcançaram $\text{pH} < 4,2$ aos 15 dias de ensilagem, o que foi menor ($P < 0,01$) que as silagens inoculadas com *Lactobacillus buchneri*, que necessitaram de até 120 dias para reduzirem os valores de pH a valores sem diferença significativa em relação aos híbridos não inoculados.

O teor de amido da silagem foi afetado pelo teor de vitreosidade do milho ($P < 0,01$) (Figura 1). O híbrido com maior teor de vitreosidade (80%) (AV) apresentou menor ($P < 0,01$) concentração de amido em comparação com os demais tratamentos, independentemente do tempo de ensilagem ou do uso de inoculante. O teor de amido das silagens não foi influenciado ao longo do tempo de ensilagem por nenhuma das variáveis avaliadas.

Figura 1 Teor de MS, amido e valor de pH da silagem de milho reidratado de baixa vitreosidade sem inoculante (BVC) □ ; milho de baixa vitreosidade inoculado (BVi) ■ ; média vitreosidade sem inoculante (MVe) △ ; média vitreosidade inoculado (MVi) ▲ ; alta vitreosidade sem inoculante (AVc) ○ ; alta vitreosidade inoculado (AVI) ● .

Os resultados para concentração de PB, proteína solúvel em percentual da PB (PS%PB) e nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) estão apresentados sob forma de gráficos na figura 2. O teor de PB foi maior para a silagem de milho reidratado (SMR) com maior teor de vitreosidade ($P<0,01$) em comparação com os híbridos de média e baixa vitreosidade. O teor de PB, no entanto, não apresentou alterações em função do tempo de ensilagem ou pelo uso de inoculante. O teor de proteína solúvel em percentual da proteína bruta (PS%PB) foi afetada pelo tempo de ensilagem ($P<0,01$), pelo teor de vitreosidade ($P<0,01$) e pelo uso de inoculante ($P<0,01$). No dia 0 de ensilagem, o teor de PS%PB foi menor na silagem de menor vitreosidade (15,6% PS%PB, seguido pela silagem de média (12,3%), e pelo híbrido de alta vitreosidade (8,6%). Aos 400 dias de ensilagem, todos os tratamentos apresentaram aumento > 20 pontos percentuais do teor de PS%PB em relação ao dia zero de ensilagem. Dos 15 aos 120 dias de ensilagem, as silagens de milho de média vitreosidade inoculadas e não inoculadas não apresentaram diferença entre si, mas apresentaram teor de PS%PB maior ($P<0,01$) que os de silagens com elevada vitreosidade inoculados e sem inoculação. Entre os 240 e 400 dias de ensilagem, foi observado maior teor de PS%PB ($P<0,01$) para as silagens de baixa e média vitreosidade inoculados em relação aos demais tratamentos. Ao final de 400 dias de ensilagem, as silagens sem inoculante de baixa e média vitreosidade, e as de alta vitreosidade inoculadas não apresentaram diferença entre si quanto ao teor de PS%PB. Os maiores teores de PS ($P<0,01$) aos 400 dias de ensilagem foram observado para as silagens de baixa vitreosidade sem inoculante (68,36%) e média vitreosidade controle (67,54%), o que representa aumento de 4,36 e 5,48 vezes, respectivamente, em comparação com o dia 0 de ensilagem. Entretanto, o maior aumento de teor de PS%PB ao longo de 400 dias de ensilagem foi observada para a silagem de alta vitreosidade inoculado a qual teve aumento de 5,8 vezes, quando comparado com o dia 0 de ensilagem.

Para a concentração de $N-NH_3$ houve efeito de interação tripla ($V \times I \times T$) ($P<0,01$). A concentração de $N-NH_3$ foi maior ($P<0,01$) para todos as silagens aos 15 dias de ensilagem, quando comparados o restante do tempo de ensilagem. As silagens inoculadas apresentaram maiores ($P<0,01$) teores de $N-NH_3$ %PB em comparação com as silagens não inoculadas aos 15 dias de ensilagem. A maior concentração de nitrogênio amoniacal foi observada na silagem baixa vitreosidade inoculado entre os 15 (3,4%) e 30 (2,59%) dias de ensilagem ($P<0,01$). Os tratamentos com alta e média vitreosidade inoculados apresentaram as segundas maiores ($P<0,01$) concentrações de nitrogênio amoniacal entre os 15 (2,15 e 2,30%) e 30 dias (1,6 e 1,85%) respectivamente. No intervalo dos 30 aos 120 dias, os tratamentos que utilizaram inoculante bacteriano apresentaram maior concentração de $N-NH_3$ ($P<0,01$) em comparação

com os tratamentos controle. Já no período de observação compreendido entre os 240 e 400 dias de ensilagem todos os tratamentos atingiram teores de N-NH₃ sem diferença entre si.

Figura 2- Teor de PB, PS%PB total e N-NH₃%PB da silagem de milho reidratado de baixa vitreosidade controle (BVc) □ ; milho de baixa vitreosidade inoculado (BVi) ■ ; média vitreosidade controle (MVc) △ ; média vitreosidade inoculado (MVi) ▲ ; alta vitreosidade controle (AVc) ○ ; alta vitreosidade inoculado (AVi) ● .

Os resultados de concentração de ácido acético e ácido láctico das SMR, durante os 400 dias de ensilagem são apresentados na Figura 3. Para ambas as concentrações de ácido láctico e ácido acético, houve efeito de interação tripla (V×I×T) (P<0,01). Também foi

observado efeito de tempo ($P<0,01$), de inoculante ($P<0,01$) e de vitreosidade ($P<0,01$), além de todas as interações ($P<0,01$) (Tabela 2). A concentração de ácido láctico foi maior ($P<0,01$) para todas as silagens aos 15 dias de ensilagem, em comparação com os demais tempos de ensilagem. A silagem de menor teor de vitreosidade e sem inoculante apresentou maior ($P<0,01$) teor de ácido láctico, dos 15 aos 120 dias de ensilagem, chegando a atingir no ponto de maior concentração (2,44% da MS). Dos 240 aos 400 dias de ensilagem, as silagens que não receberam inoculante bacteriano mantiveram maior concentração ($P<0,01$) de ácido láctico em relação às silagens inoculadas.

As concentrações de ácido acético aumentaram durante o tempo de ensilagem para todos os tratamentos ($P<0,01$). Foi observado maior concentração de ácido acético dos 120 aos 400 dias de ensilagem ($P<0,01$), em comparação com os demais tempos de ensilagem, para a silagem de média vitreosidade inoculada. No outro extremo, a menor concentração de ácido acético foi observada para a silagem de baixa vitreosidade e sem inoculante, o qual foi menor ($P<0,01$) do que todos os demais tratamentos dos 30 aos 400 dias de ensilagem. No período dos 60 aos 400 dias de ensilagem, com exceção da silagem alta vitreosidade sem inoculante não diferiu ($P<0,05$) das silagens inoculadas (alta, média e baixa vitreosidade), as silagens inoculadas apresentaram maiores ($P<0,01$) concentrações de ácido acético em comparação com as demais silagens.

Figura 3- Teor de ácido láctico (%MS) e concentração ácido acético (mmol/L) da silagem de milho reidratado de baixa vitreosidade controle (BVC) □; milho de baixa vitreosidade inoculado (BVi) ■; média vitreosidade controle (MVC) △ ; média vitreosidade inoculado (MVi) ▲; alta vitreosidade controle (AVc) ○ ; alta vitreosidade inoculado (AVi) ●

Foram observados efeitos de todas as interações avaliadas ($P < 0,01$) para a digestibilidade *in situ* do amido e da proteína (Tabela 2). A digestibilidade *in situ* do amido foi influenciada pelo teor de vitreosidade ($P < 0,01$), tempo de ensilagem ($P < 0,01$) e uso de inoculante ($P < 0,01$). Nos períodos iniciais de ensilagem, correspondentes aos tempos 0 e 15 dias, a digestibilidade do amido foi influenciada apenas pela vitreosidade do híbrido ($P < 0,01$). No tempo 0 de ensilagem, as silagens com maior teor de vitreosidade apresentaram menor digestibilidade *in situ* do amido ($P < 0,01$) (38,28%) seguidos pela de média vitreosidade (44,99%) e posteriormente, pela de baixa vitreosidade (47,34%). No período dos 30 aos 240 dias de ensilagem, ambas as silagens de baixa e média vitreosidade apresentaram maior ($P < 0,01$) digestibilidade do amido em comparação a de alta vitreosidade. O uso de inoculante não alterou a digestibilidade do amido ($P > 0,05$), no período de 0 a 240 dias de ensilagem. Entretanto aos 400 dias de ensilagem, foi observado de aumento de digestibilidade do amido ($P < 0,01$) para todas as silagens inoculadas em relação às não inoculadas. Ao final de 400 dias de ensilagem, a maior digestibilidade do amido foi observada nas silagens baixa vitreosidade inoculado (95,2%) e média vitreosidade inoculado e (92,01%), em comparação com os demais tratamentos aos 400 dias. As silagens de baixa e média vitreosidade inoculados apresentaram aumento da digestibilidade de 47,86 e 47,02 pontos percentuais, respectivamente, em relação ao dia 0 de ensilagem. Aos 400 dias de ensilagem, foram observados aumentos de digestibilidade do amido para as silagens baixa vitreosidade sem inoculante (87,84%), média vitreosidade sem inoculante (89,08%) e alta vitreosidade inoculado (84,82%) sem que houvesse diferença significativa entre eles ($P > 0,05$). A silagem de alta vitreosidade apresentou menor digestibilidade ($P < 0,01$) em comparação com as silagens de baixa e média vitreosidade inoculadas.

De forma similar à digestibilidade do amido, a digestibilidade *in situ* da PB também apresentou efeito significativo para vitreosidade ($P < 0,01$), tempo de ensilagem ($P < 0,01$) e inoculante ($P < 0,01$). No período de 0 aos 60 dias de ensilagem, a digestibilidade da PB foi influenciada ($P < 0,01$) apenas pelo teor de vitreosidade do milho e pelo tempo de ensilagem, ao passo que quanto maior o teor de vitreosidade dos híbridos, menor foi a digestibilidade observada para a PB. De 120 aos 400 dias de ensilagem, as silagens de baixa e média vitreosidade com e sem inoculante não apresentaram diferença entre si ($P > 0,05$), mas mantiveram maior digestibilidade ($P < 0,01$) da PB em comparação com as silagens de alta vitreosidade inoculado e sem inoculante. Durante os 400 dias de ensilagem, houve aumento de digestibilidade da PB de 48,88% (baixa vitreosidade sem inoculante); 52,02% (baixa

vitreosidade inoculado); 47,99% (média vitreosidade sem inoculante); 52,56% (média vitreosidade inoculado); 44,38% (alta vitreosidade sem inoculante) e 48,78% (alta vitreosidade inoculado) pontos percentuais, quando comparado com o início do tempo de ensilagem.

Figura 4- Digestibilidade *in situ* em 7 h do amido e da PB da silagem de milho reidratado de baixa vitreosidade controle (BVc) □; milho de baixa vitreosidade inoculado (BVi) ■, média vitreosidade controle (MVc) △ ; média vitreosidade inoculado (MVi) ▲ ; alta vitreosidade controle (AVc) ○ ; alta vitreosidade inoculado (AVi) ●.

3.2.1 Discussão

No presente estudo, foi observada maior digestibilidade do amido e da PB da SMR, quando comparado com o amido do milho não fermentado (com zero dias de ensilagem). Resultados semelhantes foram observados em estudos sobre a digestibilidade do amido da silagem de grão úmido (FIRKINS et al., 2001; HOFFMAN et al., 2011) e da silagem de milho reidratado (FERRARETTO et al., 2014; ARCARI et al., 2016b). A digestibilidade do amido é influenciada principalmente pela presença de uma matriz hidrofóbica de amido-proteína que envolve grânulos de amido, o que impede a ação microbiana ruminal ou a digestão hidrolítica e enzimática no abomaso e no intestino delgado (GIUBERTI et al., 2014). A degradação da matriz proteica que envolve os grânulos de amido durante o processo de ensilagem foi descrita por Hoffman et al. (2011), o que permite que o amido da SMR seja digerido mais facilmente que o amido do milho seco moído (KUNG et al., 2014).

Os resultados do presente estudo sugerem que, independentemente do teor de vitreosidade, ocorre aumento da digestibilidade do amido ao longo do tempo de ensilagem. Embora uma das limitações do presente estudo tenha sido ausência de quantificação da zeína, a degradação da matriz proteica do milho provavelmente pode explicar o aumento de mais de 40 unidades percentuais da digestibilidade *in situ* em todas as silagens, depois de 400 dias de ensilagem. Philippeau e Michalet-Doreau (1998) relataram aumento de 6% no desaparecimento ruminal de amido para silagem de milho úmido comparado com o milho não ensilado, em estudo de curta duração. Resultados semelhantes também foram observados por Benton et al. (2005) em estudo realizado com milho reidratado e ensilado. Entretanto, no presente estudo, foi observado que o teor de vitreosidade foi um determinante da digestibilidade inicial do amido (zero dias de ensilagem) e consequentemente no tempo necessário para o aumento da digestibilidade do amido ao longo do tempo de ensilagem. Híbridos de milho com maiores teores de vitreosidade necessitaram mais tempo de ensilagem para apresentar a mesma digestibilidade de híbridos com menores teores de vitreosidade. Estes resultados possivelmente se devem a maior quantidade de proteínas de características hidrofóbicas a serem degradadas durante o processo de ensilagem em grãos mais vítreos, retardando a exposição dos grânulos de amido aos agentes responsáveis pela digestão.

As proteínas com características hidrofóbicas como a zeína, presentes na matriz proteica do milho podem ser degradadas por ação bacteriana (BARON et al., 1986) ou solubilizadas pelo ácido acético e ácido lático (LAWTON, 2002), durante o processo de ensilagem. Segundo Junges et al. (2015), cerca de 60% da degradação da proteína da silagem está associada com ação de proteases bacterianas. Embora o presente estudo não tenha sido delineado para diferenciar os mecanismos responsáveis pela alteração das frações proteicas,

os aumentos de concentração de proteína solúvel e nitrogênio amoniacal observados no presente estudo sugerem que ambos os mecanismos (degradação e solubilização) influenciaram nos resultados observados.

Pode-se especular que o aumento de nitrogênio amoniacal e proteína solúvel ocorreu de forma associada com a redução de concentração de zeína (HOFFMAN et al., 2011, KUNG et al., 2014). Entretanto, no presente estudo, a concentração de N-NH_3 apresentou pico de concentração por volta dos 15 dias de ensilagem para todas as silagens, sendo que a maior concentração foi observada para as silagens não inoculadas. A elevação da concentração de N-NH_3 no início do período de ensilagem, com posterior redução ao longo do tempo de ensilagem, possivelmente pode ter sido causada pelo grau de maturidade do grão. De forma diferente ao presente estudo, para silagens de grão úmido foi relatado aumento linear do teor de N-NH_3 ao longo dos períodos de ensilagem (HOFFMAN et al., 2011 KUNG et al., 2014). Grãos de milho colhidos com grau completo de maturação podem conter maior teor de endosperma vítreo (JOHNSON et al., 2002), o que consequentemente pode disponibilizar menores quantidade de proteína de fácil degradação bacteriana (albuminas e glutelinas). Embora não tenham sido avaliadas no presente estudo, as concentrações dos diferentes tipos de proteínas presente no milho, tais como albuminas e glutelinas, são as mais facilmente degradadas por bactérias nos períodos iniciais de fermentação. A degradação de proteínas por bactérias pode ser uma possível causa do aumento do teor de N-NH_3 no início do período de ensilagem. A maior concentração de proteínas da matriz proteica, associadas com as características de vitreosidade, as quais são de mais difícil degradação pelas bactérias, possivelmente induziu as bactérias que mantiveram atividade no silo por longos períodos a utilizarem o N-NH_3 como fonte de nitrogênio. O uso do nitrogênio amoniacal pelas bactérias durante a ensilagem pode explicar a redução na concentração de nitrogênio amoniacal, já que o teor total de nitrogênio da silagem não foi alterado ao longo do tempo de ensilagem. O aumento da digestibilidade do amido durante o tempo de ensilagem pode ter ocorrido pela contínua atividade microbiana, o que pode ser sugerida pelo aumento da concentração de ácido acético durante o período de ensilagem. A atividade microbiana por longos períodos de ensilagem, bem como o aumento na concentração de ácido acético, pode ser sugerindo como a explicação para as alterações das características da proteína (solubilização) ao longo do tempo de ensilagem, em relação ao milho com zero dias de fermentação. O aumento do teor de proteína solúvel parece estar ligado em menor parcela à proteólise bacteriana da matriz proteica, uma vez que a produção de N-NH_3 é sugerida como produto da degradação da proteína por bactérias (BARON et al., 1986).

A digestibilidade do amido durante o tempo de ensilagem avaliado no presente estudo foi influenciada pelo teor de vitreosidade, cujo resultado é semelhantemente aos descrito por Correa et al. (2002). Embora as características das proteínas do milho tenham sido alteradas durante o período de ensilagem no presente estudo, a quantidade de nitrogênio da silagem não sofreu alterações, o que aconteceu independentemente do teor de vitreosidade e do uso de inoculante. Resultados semelhantes foram descritos por Kung et al. (2014), os quais relataram que as concentrações de PB não foram afetadas pela adição de inoculante bacteriano ou pelo tempo de ensilagem de 240 dias. No presente estudo, todos os híbridos apresentaram aumento de digestibilidade durante período total de ensilagem. Entretanto, a digestibilidade média do amido foi maior para as silagens com menor teor de vitreosidade, o que sugere que a quantidade de matriz proteica do grão de milho é um fator limitante da digestibilidade do amido. O efeito da vitreosidade sobre a digestibilidade do amido, assim como a diferença de efeito de tempo de ensilagem, sugerem que a determinação do teor de vitreosidade antes da ensilagem pode ser uma variável importante para estimativa da digestibilidade do amido. Desta forma, a determinação do teor de vitreosidade do milho pode auxiliar na decisão quanto ao período para início do uso da silagem para alimentação de vacas leiteiras. Silagens feitas a partir de híbridos com maiores teores de vitreosidade podem ser eleitas para permanecerem maior período ensiladas antes do fornecimento aos animais, uma vez que precisarão mais tempo para alcançar a mesma digestibilidade que silagens feitas com híbridos de baixa digestibilidade.

Embora o uso de inoculante bacteriano na SMR tenha resultado em maior concentração de ácido acético e valores mais elevados de pH, o uso de inoculante não apresentou efeito sobre a digestibilidade do amido ou proteína ao longo dos 240 dias iniciais de ensilagem. Entretanto, aos 400 dias de ensilagem, as silagens inoculadas apresentaram maior teor de amido e proteína solúvel em comparação com as silagens não inoculadas. Uma possível explicação para o efeito do uso de inoculante sobre a digestibilidade em longo período de ensilagem pode estar ligado as características da cepa de *L. buchneri*, ativa por longos períodos de tempo mesmo em baixo pH e disponibilidade de nutrientes. A atividade bacteriana do *L. buchneri* por longo período de tempo, sugerida pelo aumento da concentração de ácido acético até os 400 dias de ensilagem, pode ter aumentado a degradação da matriz proteica, incrementando deste modo a digestibilidade do milho. O efeito do inoculante sobre a degradabilidade da proteína e do amido somente aos 400 dias de ensilagem são desconhecidos, sendo necessários mais estudos para elucidar tal fato.

3.2.2 Conclusão

O teor de vitreosidade, o tempo de ensilagem e o uso de inoculante bacteriano na SMR afetam o pH, teor de ácido acético, teor de proteína solúvel, teor de nitrogênio amoniacal e a digestibilidade ruminal do amido. A digestibilidade do amido aumentou, mas em menor proporção para a silagem com maior teor de vitreosidade, em comparação com as silagens de baixa e média vitreosidade. O uso de inoculante bacteriano aumentou a concentração de ácido acético na silagem, mas somente foi capaz de aumentar a digestibilidade do amido aos 400 dias de ensilagem.

3.2.3 Referências bibliográficas

AOAC. Association of Official Analytical Chemistry. **Official methods of analysis**. 11. ed. Washington: AOAC. 1990.

ARCARI, M. A., MARTINS, C.M.M.R., TOMAZI, T; GONÇALVES, J.L., SANTOS M.V. Effect of substituting dry corn with rehydrated ensiled corn on dairy cow milk yield and nutrient digestibility. **Animal Feed Science and Technology**, v. 221, p. 167-173. 2016 a.

ARCARI, M.A., MARTINS, C. M. M. R; TOMAZI, T; SANTOS, M.V. Effect of the ensiling time of hydrated ground corn on silage composition and *in situ* starch degradability. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 53, p 60-71. 2016 b.

BAKER, S., AND T. HERRMAN. Evaluating particle size. MF-2051. Kansas State Univ. Coop Ext. Serv., Manhattan, KS. 2002.

BARON, V. S., STEVENSON, K. R., BUCHANAN-SMITH, J. G. Proteolysis and fermentation of corn grain ensiled at several levels and under several simulated storage methods. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 66, p. 451-461. 1986.

BENTON, J. R., T. KLOPFENSTEIN, AND G. E. ERICKSON. Effects of corn moisture and length of ensiling on dry matter digestibility and rumen degradable protein. **Nebraska Beef Cattle Reports**, p. 31–33. 2005.

CORREA, C. E. S., R. D. SHAVER, M. N. PEREIRA, J. G. LAUER, AND K. KOHN. Relationship between corn vitreousness and ruminal *in situ* starch degradability. **Journal of Dairy Science**. v. 85, p. 3008–3012. 2002.

CUNNIFF, P (Ed). Official methods of analysis of AOAC International. 16ed. Arlington: AOAC International. V. 1. 1995.

DER BEDROSIAN, M. C., KUNG JR. L., NESTOR JR. K. E. The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**. v 95 p.5115–5126. 2012.

DOMBRINK-KURTZMAN, M. A., BIETZ, J. A. Zein composition in hard and soft endosperm of maize. **Cereal Chemistry**. v. 70, p. 105-108. 1993.

EHRMAN. T. Determination of starch in biomass samples by chemical solubilization and enzymatic digestion. LAP-016. U.S. **Department of Energy. National Bioenergy Center**, Washington, D.C. 1996.

ERWIN, E.S., MARCO, G.J.; EMERY, E.M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v.44, p.1768-1771. 1961.

FERRARETTO, L. F. FREDIN, S. M. SHAVER, R. D. 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**. v. 98, p. 7318–7327. 2015.

FERRARETTO, L. F., K. TAYSOM, D. TAYSOM, R. D. SHAVER, AND P. C. HOFFMAN. Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia-nitrogen, and ruminal *in vitro* starch digestibility in high-moisture corn samples. **Journal of Dairy Science**. v. 97, p. 3221–3227. 2014.

FERRARETTO, L. F., P. M. CRUMP., R. D. SHAVER. Effect of cereal grain type and corn grain harvesting and processing methods on intake, digestion and milk production by dairy cows through a meta-analysis. **Journal of Dairy Science** v. 96 p. 533–550. 2013.

FIRKINS, J. L., M. L. EASTRIDGE, N. R. ST-PIERRE, AND S. M. NOFTSGER. Effects of grain variability and processing on starch utilization by lactating dairy cattle. **Journal Animal. Science**. 79 (E. Suppl.): E218– E238. 2001.

GIUBERTI, G., A. GALLO, F. MASOERO, L. F. FERRARETTO, P. C. HOFFMAN, R. D. SHAVER. Factors affecting starch utilization in large animal food production system: A review. **Starke** v.66, p. 72–90. 2014.

HOFFMAN, P.C., ESSER, N.M., SHAVER, R.D., COBLENTZ, W.K., SCOTT, M.P., BODNAR, A.L., SCHMIDT, R.J., CHARLEY, R.C. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**. v.94, p.2465–2474. 2011.

JOHNSON, L.; HARRISON, J. H.; HUNT, C.; SHINNERS, K.; DOGGETT, C. G.; SAPIENZA, D. Nutritive value of corn silage as affected by maturity and mechanical processing: A contemporary review. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2813-2825. 1999.

JOHNSON, L.M., HARRISON, J.H., DAVIDSON, D. Corn silage management I: Effects of hybrid, maturity, and mechanical processing on chemical and physical characteristics. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.833-853. 2002.

JUNGES, D., MORAIS, G., DANIEL, J. L. P., SPOTO, M. H. F., NUSSIO, L. G. Contribution of proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. In Proc. **XVII International Silage Conference**. June 1-3. Piracicaba, SP, Brasil, p. 566-567. 2015.

KRISHNAMOORTHY, U., T. V. MUSCATO, C. J., SNIFFEN, AND P. J. VAN SOEST. Borate phosphate procedure as detailed in nitrogen fractions in selected feedstuffs. **Journal of Dairy Science** v. 65, p.217–225. 1982.

KUNG, L. JR., M. C. WINDLE, AND N. WALKER. The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of highmoisture corn. **Journal of Dairy Science** v. 97, p.1707–1712. 2014.

LAWTON, J. W. Zein: A history of processing and use. **Cereal Chemistry**, v. 79, p. 1-5. 2002.

LITTELL, R.C., MILLIKEN, G.A., STROUP, W.W., WOLFINGER, R.D. **SAS System for Mixed Models** SAS Institute Inc., Cary, NC (1996)

NECEK, J. E.; TAMMINGA, S. Site of digestion starch in the gastrointestinal tract of dairy cow and its effect on milk yield and composition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3598-3629. 1991.

NEWBOLD, J. R., LEWIS, E. A., LAVRIJSSEN, L., BRAND, H. J., VEDDER, H., BAKKER, J. Effect of storage time on ruminal starch degradability in corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. T94, Supplement, 1. 2006.

NGONYAMO-MAJEE, D., SHAVER, R. D., COORS, J. G., SAPIENZA, D., LAUER, J. G. Relationship between kernel vitreousness and dry matter degradability for diverse corn

germplasm. II. Ruminant and post-ruminant degradabilities. **Animal Feed Science Technology**, v. 142, p. 259–274. 2008.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of dairy cattle. 7. rev. ed. Washington, DC. **National Academy Science**. 2001.

OSHIMA, M., MCDONALD, P. A review of the changes in nitrogenous compounds of herbage during ensilage. **Journal Science Food Agriculture**, v.29, p.497-508. 1978.

PHILIPPEAU, C., MICHALET-DOREAU, B. Influence of genotype and ensiling of corn grain on in situ degradation of starch in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2178-2184. 1998.

SPANGHERO, M., KOWALSKI, Z. M. Critical analysis of N balance experiments with lactating cows. **Livestock Production Science**. v. 52, p.113-122. 1997.

Capítulo 4

4.1 Efeito do tempo de ensilagem, tamanho de partícula e uso de inoculante bacteriano sobre a composição e digestibilidade *in situ* da silagem de grãos de milho reidratados.

4.1.1 Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do tamanho de partícula, tempo de ensilagem e uso de inoculante bacteriano sobre a composição química e a digestibilidade do amido e da PB da silagem de milho reidratado (SMR). O estudo foi realizado em silos experimentais, cuja confecção utilizou uma variedade de milho (DKB 390) com elevado teor de vitreosidade (80%) e teor de MS igual a 87%. Um lote de milho DKB 390 (22,4kg) foi dividido em 4 subparcelas, as quais foram moídas para atingir diferentes tamanhos médios de partícula (grãos inteiros, 785 (fina), 1.248 (média) e 1.883 (grossa) μm). A parcela de grãos interior foi ensilada e somente foi moída (tamanho médio de partícula de 1.829 μm) para análises laboratoriais após a abertura dos silos. As subparcelas milho foram reidratadas e ensiladas em mini silos ($\pm 500\text{g}$) constituídos de filme de polipropileno (200 micras), adicionados ou não de inoculante bacteriano (*Lactobacillus buchneri* cepa CNM I-4323 na concentração de 600.000 ufc/g de matéria natural). O estudo foi conduzido sob delineamento experimental split-split plot usando o PROC MIXED, com arranjo fatorial de tratamentos $4 \times 2 \times 7$ (quatro tamanhos de partícula, presença ou ausência de inoculante bacteriano e sete tempos de ensilagem), sendo cada tratamento feito em quadruplicata. Os silos experimentais foram avaliados aos 0, 15, 30, 60, 120, 240 e 400 dias de ensilagem, quanto as seguintes variáveis resposta: composição química, produtos de fermentação e digestibilidade *in situ* do amido e da proteína da silagem. O teor de MS, amido e PB não foram afetados por nenhum dos tratamentos aplicados. O pH da SMR reduziu para todos os tratamentos de acordo com o tempo de ensilagem, sendo que em todos os tratamentos o $\text{pH} < 4,5$ aos 15 dias de ensilagem. A digestibilidade do amido e da PB da SMR aumentou em média 1,8 e 2,1 vezes, respectivamente, ao longo dos 400 dias de ensilagem para todos os tratamentos. A digestibilidade do amido foi maior aos 400 dias de ensilagem na silagem com moagem fina (92,52%) e média (91,73%), ambas com o uso de inoculante em comparação com as demais silagens no mesmo período. O teor de nitrogênio amoniacal em percentual da PB ($\text{N-NH}_3\%\text{PB}$) aumentou em todos os tratamentos nos períodos iniciais de ensilagem (15 a 30 dias), sendo que teor de $\text{N-NH}_3\%\text{PB}$ foi maior aos 15 dias de ensilagem para a silagem de menor tamanho de partícula inoculada (4,93 % da PB) em comparação com as demais silagens aos 15 dias. O teor de proteína solúvel em percentual da

PB (PS%PB) também aumentou em todos os tratamentos ao longo do período de ensilagem. As SRM com moagem média (55,02%) e fina (57,04%) e inoculadas apresentaram o maior teor de PS%PB aos 400 dias em comparação com os demais tratamentos. A concentração de ácido láctico foi maior para a SMR com moagem fina e sem inoculante (2,23% MS aos 15 dias de ensilagem) em comparação com as outras silagens também aos 15 dias de ensilagem. A concentração de ácido acético foi maior nas SMR inoculadas, com a maior concentração observada na SMR com moagem grosseira inoculada em comparação com as outras silagens. Com exceção das silagens de grãos inteiros, a inclusão de inoculante aumentou digestibilidade do amido e da proteína aos 400 dias de ensilagem em comparação com as silagens não inoculadas. A SMR com tamanhos de partícula fino e médio apresentaram digestibilidade inicial e final maiores do que as silagens confeccionadas com grãos ensilados inteiros ou ensilados com partículas grossas. O uso de inoculante bacteriano aumentou a concentração de ácido acético e melhorou a digestibilidade do amido e da PB aos 400 dias de ensilagem.

4.1.2 Introdução

A elevada digestibilidade do amido da dieta de vacas leiteiras é um fator importante para obter altas produções de leite. O processamento de grãos inteiros resulta em aumento da digestão ruminal do amido do milho e da produção de leite (GAYLEAN et al., 1979; TURGERON et al., 1983; BUGHARDI et al., 1990). Vacas alimentadas com dietas formuladas com fontes de amido de maior digestibilidade ruminal (silagem de grãos úmidos, (SGU) ou silagem de milho reidratado, (SMR) geralmente produzem mais leite quando comparadas com vacas alimentadas com milho seco moído (FIRKINS et al., 2001; FERRARETTO et al., 2013; ARCARI et al., 2016a).

O processamento mecânico dos grãos tem objetivos de quebrar o revestimento exterior e aumentar o acesso microbiano às reservas de amido, e consequentemente, aumentar a digestão no rúmen e no trato gastrointestinal. Resultados de estudos com digestibilidade *in situ* sugerem uma relação inversa e linear entre o tamanho de partícula após o processamento e a digestibilidade ruminal do amido do milho (LYKOS & VARGA, 1995). Além do tamanho de partícula (RÉMOND et al., 2004; GIUBERTI et al., 2014), o teor de vitreosidade do endosperma (CORREA et al., 2002) e o tempo de ensilagem (ARCARI et al., 2016a) podem afetar a digestibilidade do amido do milho. Vacas alimentadas com silagens de grãos reidratados e grãos úmidos apresentam maior produção de leite do que vacas alimentadas com

milho seco moído em razão da maior digestibilidade do amido. O aumento da digestibilidade possivelmente está associado com degradação da matriz proteica que envolve o amido do endosperma do grão, principalmente pela redução da quantidade de zeína, que é a principal proteína hidrofóbica da matriz proteica (HOFFMAN et al., 2011). Essa degradação da zeína favorece a ação bacteriana sobre o amido no rúmen, bem como à atuação de enzimas digestivas no abomaso e intestino (GIUBERTI et al., 2014).

O processo de ensilagem aumenta a digestibilidade do amido ao longo do tempo de ensilagem dos grãos, tanto *in vitro* (FERRARETTO et al., 2014, KUNG et al., 2014) quanto *in situ* (BENTON et al., 2005, ARCARI et al., 2016a). Contudo, aumentar a velocidade de com que a digestibilidade do amido se torna maior é um desafio, uma vez que os métodos atualmente estudados envolvem o uso de proteases (KUNG et al., 2014), o que eleva os custos do processamento. Entretanto, estudos que avaliaram os efeitos associados a variação do tamanho de partícula do milho antes da ensilagem aliados a inclusão de inoculante bacteriano sobre a composição, produtos de fermentação da silagem e digestibilidade do amido SMR de grãos de elevada vitreosidade ainda são escassos.

Nossa hipótese é de que quanto maior o tamanho de partícula utilizado para confecção da silagem, maior será o tempo de ensilagem necessário para aumentar a digestibilidade do amido e da PB. Além disso, o uso de inoculante bacteriano associado a redução do tamanho de partícula dos grãos antes da ensilagem irá aumentar a concentração de ácidos orgânicos e digestibilidade da silagem, ao longo do tempo de ensilagem. Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tamanho de partícula, da inoculação bacteriana e do tempo de ensilagem sobre a composição química, produtos da fermentação da silagem, frações nitrogenadas e digestibilidade *in situ* do amido e da PB de SMR de um híbrido de alta vitreosidade.

4.1.3 Material e Métodos

4.1.3.1 Delineamento experimental e arranjo de tratamentos

O estudo teve delineamento experimental split-split plot e com arranjo fatorial de tratamentos $4 \times 2 \times 7$ (quatro tamanhos de partícula, inclusão ou não de inoculante bacteriano e sete tempos de ensilagem), em quadruplicata. O tamanho de partícula do milho apresentou 4 classes, de acordo com o tamanho de partícula (inteiro, grossa, média e fina). O uso de inoculante e os tempos de ensilagem foram considerados como subparcela. Os lotes de milho

inoculados receberam ou não a adição de *Lactobacillus buchneri* cepa CNM – I4323 (Katec Lallemand® Goiânia Brasil), na concentração de 600.000 ufc/g de matéria natural, a qual foi misturada juntamente com a água utilizada para a reidratação.

4.1.3.2 Processo de ensilagem

Um total de 22,4 kg da variedade de milho DKB390, provenientes da área agrícola do campus da Universidade de São Paulo – Pirassununga – SP/BR, foram colhidos em fevereiro do ano de 2014, com teor de MS igual a 810 g MS/Kg e submetidos a secagem em estufa de ventilação forçada até atingir uma média de MS igual a 87%. Os grãos, posteriormente à secagem, foram divididos em 4 subparcelas de acordo com o tamanho da partícula, moídos ou não em moinho de martelos dotados de perneiras de: a) grãos mantidos inteiros para ensilagem; b) 1 mm; c) 2 mm; e d) 8mm. Os tamanhos de partícula dos lotes de milho moído foram determinados por um sistema de peneiras de 2,000, 1,000, 840, 500, 250, 149 e 105 µm de porosidade acopladas em uma bandeja fechada no fundo. O tamanho médio de partícula foi calculado de acordo com Baker & Herrman, (2002). O tamanho de partícula e a composição química das subparcelas de milho estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4- Composição química e tamanho médio de partícula (µm) e uso de inoculante (*Lactobacillus buchneri* - i) do milho variedade DKB390 (teor de vitreosidade de 80%), utilizado para confecção da silagem de milho reidratado.

	Tamanho de partícula e inoculação (i)									P	
	Ic	Ii	MGc	MGi	MMc	MMi	MFc	MFi	EPM	I	TP
Composição química dos híbridos % MS											
MS ^a	87,41	87,52	88,02	87,95	87,12	87,48	87,53	87,22	0,15	0,45	0,38
MS ^b	66,04	66,05	65,92	66,09	65,46	66,08	66,37	65,53	0,21	0,12	0,65
PB	8,16	8,40	8,03	8,12	8,36	8,31	8,25	8,43	0,05	0,71	0,91
PS (%PB)	8,69	8,79	8,02	7,93	7,91	7,96	8,06	8,03	0,07	0,55	0,52
Amido	65,76	65,64	65,18	65,36	65,6	65,35	65,72	65,49	0,27	0,40	0,31
Granulometria											
TMP (µm) ^d	1.909	1.913	1.885	1.871	1.099	1.048	789	795	-	-	-

-: não analisado; ^a matéria seca antes da reidratação; ^b matéria seca após a reidratação; ^{com} teor de endosperma vítreo, ^d TMP tamanho médio de partícula; EMP: erro padrão da média; **I**: inoculante; **TP**: tamanho de partícula; **Ic**: inteiro sem inoculante **Ii**: inteiro inoculado **MGc**: moagem grossa; **MGi**: moagem grossa inoculado; **MMc**: moagem média; **MMi**: moagem média inoculado; **MFc**: moagem fina sem inoculante; **MFi**: moagem fina inoculado.

Após a moagem, cada subparcela foi novamente dividida em dois, sendo uma delas com inclusão de inoculação bacteriana (*Lactobacillus buchneri* cepa CNM I-4323, Katec Lallemand® Goiânia, Brasil, na concentração de 600.000 ufc/g de matéria natural) ou não. Após as etapas de moagem e inoculação, todos os tratamentos foram reidratados para que

alcançassem teor de MS de 670 g Kg/MS. As SMR foram armazenadas em mini silos de 500g (embalagens de bags de polietileno de 250 micras de espessura), em quadruplicata, e armazenadas durante os seguintes tempo de ensilagem: 0, 15, 30, 60, 120, 240 e 400 dias.

4.1.3.3 Análises de composição químicas

O lote de milho ensilado sem moagem, foi desensilado e moído em moinho de martelo com peneira de 8 mm, atingindo o tamanho de partícula semelhante ao tratamento de moagem grossa, para comparação no ensaio de digestibilidade. As análises de composição química e digestibilidade *in situ* do presente estudo foram realizados de acordo com o descrito na seção de análises químicas (3.1.3.3) do capítulo 3.

4.1.4 Análise Estatística

Os dados foram avaliados como um split-split plot (Littell et al., 1996) usando os procedimentos PROC MIXED do SAS (SAS Institute, 2001). Quatro diferentes tamanhos de partícula (inteiro, grossa, média e fina) de um híbrido foram definidos como parcelas inteiras com tempo de ensilagem e inoculação como subparcelas. Os principais efeitos no modelo incluíram o tamanho de partícula, o inoculante, o tempo de ensilagem e suas interações. Os efeitos aleatórios do modelo incluíram repetição e interações da repetição com o tamanho de partícula e inoculante. Os principais efeitos e as principais interações foram declarados quando $P < 0,05$. O arranjo de tratamentos foi em esquema fatorial de tratamentos $4 \times 2 \times 7$, com 4 tamanhos de partícula, 2 tipos de inoculação e 7 tempos de ensilagem. O efeito do tempo de ensilagem foi avaliado como medidas repetidas no tempo. Diversas estruturas de erros foram investigadas, e a estrutura escolhida para cada variável avaliada foi de acordo com o critério de informação bayesiano (BIC).

4.1.5 Resultados

A composição química e o tamanho médio de partícula do milho antes e após a reidratação e ensilagem estão apresentados na Tabela 4. A MS antes da reidratação apresentou valor médio de 87,5% sendo que após a reidratação o valor médio de MS foi de 66,04%. O teor médio de PB, PS%PB e amido apresentaram valor médio de 8,25, 8,13 e 65,51%

respectivamente no momento da confecção das silagens. Nenhuma das variáveis de composição química foi afetada pelo tamanho de partícula ou uso de inoculante no momento da ensilagem ($P>0,05$). Os valores de probabilidade dos efeitos principais e das interações entre os tratamentos sobre as variáveis resposta estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5- Probabilidade do efeito do tamanho de partícula, inoculação bacteriana e tempo de ensilagem sobre a composição química, produtos da fermentação e digestibilidade *in situ* do amido e da proteína da silagem de milho reidratado

Item	Composição Química					Fermentação			Digestibilidade <i>in situ</i> 7h (%MS)	
	MS	pH	Amido (%MS)	N-NH ₃ % PB	PB (%MS)	PS %PB	Ac. Lático	Ac. Acético	Amido	PB
<i>P- Valor - Efeito principal</i>										
TP	0,12	0,05	0,96	<0,01	0,52	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
I	0,36	0,01	0,90	<0,01	0,91	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
T	0,63	<0,01	0,21	<0,01	0,92	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<i>P-Valor Interações</i>										
TP×I	<0,01	0,36	0,97	<0,01	0,51	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
TP×T	0,05	0,27	0,24	<0,01	0,90	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
I×T	0,31	0,48	0,39	<0,01	0,42	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
TP×I×T	0,11	0,56	0,35	<0,01	0,22	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
EPM	0,21	0,08	0,11	0,02	0,02	0,49	0,04	0,03	0,54	0,53

Ac. Acético: expresso mmol/L; Ac. Lático: expresso com base na MS; TP: tamanho de partícula; I: inoculante; T: tempo; TP×I tamanho de partícula × inoculante; TP×T tamanho de partícula × tempo; I × T inoculante × tempo; TP × I × T: tamanho de partícula × inoculante × tempo, EPM: erro padrão da média.

Os resultados de teor de MS, amido e pH das SMR estão apresentados na figura 5. O teor de MS e de amido da SMR não foram afetados pelo tamanho de partícula, pelo tempo de ensilagem e pelo uso de inoculante. Entretanto, o teor de MS apresentou efeito da interação entre tamanho de partícula × inoculante (TP×I) ($P<0,01$) e entre tamanho de partícula × tempo (TP×T) ($P=0,05$) (Tabela 5).

Houve efeito de tamanho de partícula ($P=0,05$), de inoculante ($P=0,01$) e de tempo de ensilagem ($P<0,01$) sobre o pH da SMR (Tabela 5). Os valores de pH de todas as silagens foram reduzidos ($P<0,01$) do dia zero até os 15 dias de ensilagem. Aos 15 dias de ensilagem, foram observados maiores valores médios de pH ($P<0,01$) para as silagens de grãos inteiros com e sem inoculante e silagem moída grossa sem inoculante (4,08) em comparação com as demais silagens. As silagens de grãos inteiros com e sem inoculante apresentaram valores de pH maiores ($P<0,01$) que as demais silagens durante cerca de 70% do tempo de ensilagem. A partir dos 60 dias de ensilagem todas as silagens de grãos moídos apresentaram pH similar entre si ($P>0,05$), cuja média foi inferior ($P<0,01$) que os das silagens de grãos inteiros. Aos

15 e 30 dias de ensilagem foram observados os menores valores de pH ($P < 0,01$), os quais foram atribuídos a silagens com tamanho de partícula fina (3,57) e média (3,63), ambas inoculadas.

Figura 5 - pH, teor de amido e teor MS da silagem de milho reidratado moído fino controle (MFc) □; milho moído fino inoculado (MFi) ■, moagem média controle (MMc) △; moagem média inoculado (MMi) ▲; moagem grossa controle (MGc) ○; moagem grossa inoculado (MGi) ●; ensilado sem moagem controle (SMc) ◇; ensilado sem moagem inoculado (SMi) ◆.

Os resultados para o teor de PB, PS%PB e N-NH₃% PB estão apresentados na Figura 6. Não houve efeito do tamanho de partícula, uso de inoculante ou tempo de ensilagem sobre teor de PB das silagens (Tabela 5). De modo diferente à PB, foi observada interação entre TP×I (P<0,01), TP×T (P<0,01), I×T (P<0,01) TP×I×T (P<0,01) sobre os teores de PS%PB e de NH₃%PB das SMR. Além do efeito de interações, foram observados efeitos isolados de tamanho de partícula (P<0,01), inoculante (P<0,01) e tempo de ensilagem (P<0,01) sobre os teores de PS%PB e de NH₃%PB. Até os 120 dias de ensilagem as silagens moídas finas e médias inoculadas e sem inoculante, sem diferirem entre si (P>0,05), apresentaram maior teor de PS%PB (P<0,01) em comparação com as silagens de grãos inteiros e com moagem grossa. Os menores valores de proteína solúvel observados para o período até os 120 dias de ensilagem (P<0,01), em comparação com as demais silagens foram para silagens de grãos inteiros com e sem inoculante. Aos 400 dias de ensilagem, os tratamentos processados com moagem fina e média inoculados apresentaram maior PS%PB (P<0,01) (57,04 e 55,02% da proteína na forma solúvel, respectivamente), em comparação com as demais silagens (P<0,01). Com exceção das silagens de grãos inteiros inoculadas e sem inoculante, que não apresentaram diferença entre si (P>0,05) ao longo de todo o tempo de ensilagem, aos 400 dias, todas as silagens inoculadas apresentaram maior PS%PB (P<0,01) em comparação com os seus respectivos tamanhos de partícula sem inoculante. Em comparação ao dia zero de ensilagem, aos 400 dias, as silagens de grãos inteiros aumentaram em média 36,5 pontos percentuais no teor de PS%PB, enquanto que as silagens de grãos moídos aumentaram em média 43,9 pontos percentuais no teor de PS%PB.

Com exceção das silagens de grãos inteiros inoculados e sem inoculante, que estenderam os picos de concentração de NH₃%PB dos 15 aos 30 dias de ensilagem, todas as outras silagens, apresentaram maior concentração (P<0,01) de NH₃%PB aos 15 dias de ensilagem. Posteriormente aos 15 dias foi observado uma redução da concentração do nitrogênio amoniacal para todas as silagens. O tratamento que apresentou a maior concentração de NH₃%PB (P<0,01), em comparação com as demais silagens, aos 15 dias de ensilagem foi a silagem moída fina inoculada (4,93% de N-NH₃) que foi 3.8 vezes maior que as silagens de grãos inteiros com e sem inoculante, que apresentaram a menor concentração média de NH₃%PB entre todos os tratamentos aos 15 dias de ensilagem (1,13% N-NH₃%PB).

Figura 6- Teor de PB, teor de proteína solúvel em percentual da PB (PS%PB) e N-NH₃ % nitrogênio total da silagem de milho reidratado moído fino controle (MFc) □ ; milho moído fino inoculado (MFi) ■; moagem média controle (MMc) △; moagem média inoculado (MMi) ▲; moagem grossa controle (MGc) ○ ; moagem grossa inoculado (MGi) ●; ensilado sem moagem controle (SMc) ◇; ensilado sem moagem inoculado (SMi) ◆ .

As concentrações de ácido acético (mmol/L) e ácido láctico (%MS) são apresentadas na Figura 7. Foi observado efeito de interação tripla ($TP \times I \times T$) ($P < 0,01$) para a concentração de ácido láctico e também para a concentração de ácido acético (Tabela 5). A concentração de ácido acético (mmol/l) e ácido láctico (%MS) foram influenciados pelo tamanho de partícula ($P < 0,01$), inoculação ($P < 0,01$) e tempo de ensilagem ($P < 0,01$) (Tabela 5). A concentração de ácido láctico atingiu sua maior concentração com a silagem moída fina sem inoculante (2,23% MS) aos 15 dias de ensilagem ($P < 0,01$), seguido pela silagem moída fina sem inoculante (2,04% MS), que atingiu sua maior concentração aos 30 dias de ensilagem. O uso de inoculante nas silagens com moagem fina e média, produziu menores concentrações de ácido láctico ($P < 0,01$) em comparação com as silagens de moagem fina e média sem inoculante até os 120 dias de ensilagem, sendo que após os 120 dias não foi mais observado diferença entre as silagens moídas fina e média, inoculadas ou não. Silagens de grãos inteiros e moídas grossas, independentemente do uso de inoculante apresentaram baixas concentrações de ácido láctico durante todo o período de ensilagem, sendo que nenhum destes tratamentos alcançou a concentração igual a 1% da MS durante todo o período de ensilagem.

De modo contrário ao ácido láctico, a concentração de ácido acético foi maior ($P < 0,01$) para silagens inoculadas em comparação a silagens sem inoculante. A maior concentração de ácido acético ($P < 0,01$) foi observada para a silagem com moagem grossa inoculada por todo o período de ensilagem.

Figura 7- Teor de ácido láctico (%MS) e ácido acético (mmol/l) da silagem de milho reidratado moído fino controle (MFC) □; milho moído fino inoculado (MFi) ■; moagem média controle (MMc) △; moagem média inoculado (MMi) ▲; moagem grossa controle (MGc) ○; moagem grossa inoculado (MGi) ●; ensilado sem moagem controle (SMc) ◇; ensilado sem moagem inoculado (SMi) ◆.

Os resultados para a digestibilidade *in situ* do amido e da proteína estão expressos na Figura 8. Foi observado efeito de interação tripla (TP×I×T) ($P<0,01$) para a digestibilidade do amido e da proteína. A digestibilidade, tanto para o amido quanto para a proteína foram afetados pelo tamanho de partícula ($P<0,01$), inoculante ($P<0,01$) e tempo de ensilagem ($P<0,01$) (tabela 5). A digestibilidade inicial (tempo 0) do amido (%MS) foi maior ($P<0,01$) a medida que o tamanho de partícula foi reduzido. As silagens moídas finas inoculadas e não inoculada apresentaram maior ($P<0,01$) digestibilidade média inicial do amido (dia zero de ensilagem) (56%) em comparação com as demais silagens, sendo que a menor digestibilidade

inicial média ($P < 0,01$) foi observada para as silagens de grãos inteiros (35,24%). Até os 120 dias de ensilagem, as silagens moídas fina e média inoculadas e sem inoculante apresentaram maior digestibilidade do amido ($P < 0,01$) em comparação com as silagens de grãos inteiros e moídas grossas. Aos 400 dias de ensilagem a silagem que apresentou a menor digestibilidade média ($P < 0,01$) foi a silagem de grão inteiros (74,5%). As silagens que alcançaram as maiores ($P < 0,01$) digestibilidades do amido aos 400 dias foram as silagens moídas fina (95,48%) e moída média (92,52%), ambas inoculadas sendo que não houve diferença entre as duas silagens ($P < 0,05$).

No dia zero de ensilagem, foi observada uma relação inversa entre o tamanho de partícula e a digestibilidade da PB, sendo que medida que o tamanho de partícula reduziu, a digestibilidade da PB foi maior. As silagens moídas finas e apresentaram a maior digestibilidade inicial média ($P < 0,01$) da PB (43,99%). Até 60 dias de ensilagem as silagens moídas finas e médias com e sem inoculante não apresentaram diferença significativa entre si ($P > 0,05$) para digestibilidade da PB, mas foram cerca de 11 pontos percentuais mais digestíveis ($P < 0,01$) em comparação com as silagens moídas grossa. A partir dos 120 de ensilagem as silagens moídas fina, média e grossa não apresentaram mais diferença entre si ($P > 0,05$) sendo maiores ($P < 0,01$) apenas em comparação com as silagens de grãos inteiros. Aos 400 dias de ensilagem, com exceção das silagens de grãos inteiros, as silagens inoculadas apresentaram digestibilidade da PB maior ($P < 0,05$) do que os seus respectivos tamanhos de partícula sem inoculante.

Figura 8- Digestibilidade *in situ* em 7 horas do amido e da PB da silagem de milho reidratado moído fino controle (MFC) □ ; milho moído fino inoculado (MFI) ■ ; moagem média controle (MMC) △ ; moagem média inoculado (MMi) ▲ ; moagem grossa controle (MGC) ○ ; moagem grossa inoculado (MGI) ● ; ensilado sem moagem controle (SMC) ◇ ; ensilado sem moagem inoculado (SMi) ◆ .

4.1.6 Discussão

A redução no tamanho de partícula dos grãos antes da ensilagem, permitiu as silagens atingir maior digestibilidade do amido e da proteína em mais curtos espaços de tempo em comparação com maiores tamanhos de partícula. Entretanto, foi observado que quando o grão é ensilado inteiro e moído após a abertura do silo, este apresenta menor digestibilidade do amido e da PB em comparação com semelhante tamanho de partícula de milho moído antes

da ensilagem, e com o mesmo tempo de ensilagem. A literatura descreve que a redução do tamanho de partícula dos grãos de milho é um método eficaz de aumentar a digestibilidade dos grãos (HUNTINGTON, 1997; RÈMOND et al., 2004). O aumento na digestibilidade *in vitro* de 20 pontos percentuais foi observado quando o tamanho de partícula do milho moído foi reduzido de 1.270 para 552 μ m (FREDIN et al., 2015). Estes resultados são semelhantes aos observados no tempo zero de ensilagem para o presente estudo, uma vez que foram aumentados cerca de 15 pontos percentuais a digestibilidade do amido quando o tamanho de partícula reduziu de uma média de 1.880 para 792 μ m. Embora, os resultados deixem claro o efeito da redução de partícula sobre a digestibilidade do amido, o presente estudo não avaliou nem o tempo nem os custos adicionais para se obter menores tamanhos de partícula a partir da moagem, Fredin et al. (2015) descreve que a redução do tamanho de partícula aumentou de forma considerável o tempo de moagem e consequentemente os custos destinados a realização deste tipo de processamento. Entretanto, mesmo sendo mais custoso em termos de tempo e energia, a redução do tamanho de partícula em materiais destinados ensilagem pode aumentar a eficiência de fermentação e gerar menores perdas de estocagem (HERRMANN et al., 2012).

Os dados do presente estudo sugerem que a redução do tamanho de partícula pode ter intensificado a fermentação, uma vez que foi observado menor pH, e maior teor ácido láctico para a silagem com moagem fina e média, gerando também maiores valores de digestibilidade *in situ* ao final de 400 dias de ensilagem destes dois tratamentos. A maior queda de pH para os tratamentos com menor tamanho de partícula sem uso de inoculante nos períodos iniciais de fermentação (até os 15 dias de ensilagem), são diferentes aos resultados relatados em estudos prévios, onde um menor pH foi observado para silagens de grão úmido (HOFFMAN et al., 2011; KUNG et al., 2014) e silagem de grãos reidratados que utilizaram inoculante bacteriano (FERRARETTO et al., 2015). Diferença de pH em comparação com outros estudos que utilizaram inoculante na silagem, possivelmente podem ter ocorrido por razões ligadas a características da população microbiana presente nos grãos antes da ensilagem, densidade, cepa do inoculante ou teor de umidade da silagem, as quais não foram avaliados especificamente no presente estudo. Entretanto, menores valores de pH e aumento na concentração de ácido láctico também foram observados para diversos tipos de silagem de planta inteira a medida que o tamanho de partícula foi reduzido (HERRMANN et al., 2012). O maior grau de processamento por moagem no presente estudo possivelmente disponibilizou uma maior quantidade de nutrientes para fermentação bacteriana, o que possivelmente pode ter aumentado a quantidade de ácidos orgânicos. Além disso, partículas menores sugerem a

possibilidade de compactações da silagem mais eficientes e consequentemente maiores densidades da silagem por m³, reduzindo a quantidade de oxigênio presente na massa ensilada nos períodos iniciais da fermentação aumentando a eficiência de fermentação (NEUMANN et al., 2004).

A ausência de alterações no teor de PB da silagem do presente estudo se assemelha a estudos prévios que também não descreveram alteração do PB na silagem ao longo do tempo de ensilagem (YOUNG et al., 2012; KUNG et al., 2014; FERRARETTO et al., 2015). A ausência de sinais de deterioração e a boa vedação do silo possivelmente conservou todo o nitrogênio da silagem. Entretanto, as características da fração nitrogenada da silagem sofreram importantes modificações ao longo do período total de ensilagem. O teor de PS%PB foi significativamente aumentado para todos os tratamentos ao longo do período de ensilagem. O efeito dos ácidos orgânicos (LAWTON, 2002) e das proteases bacterianas (HOFFMAN et al., 2011; JUNGES et al., 2015) possivelmente foram os responsáveis por modificar a estrutura das proteínas com caráter insolúvel, observadas nos grãos secos, tornando parte destas proteínas em proteína solúvel. O aumento na solubilidade da PB é sugerido como principal explicação para o aumento da digestibilidade da PB e do amido observado no presente estudo. A alteração do arranjo entre o amido e a matriz proteica, estes que impedem o acesso das bactérias amilolíticas até os grânulos de amido possivelmente é responsável por aumentar a digestibilidade do amido e da PB (GIUBERTI et al., 2014). Entretanto, a maior digestibilidade da proteína no presente estudo deve ser considerada com cautela, uma vez que a solubilidade não é um estimador perfeito de digestibilidade. De acordo com Stern & Satter (1984) a correlação entre solubilidade e degradação ruminal *in vivo* da proteína foi de apenas 0,26 para 34 dietas contendo várias fontes de nitrogênio. A proteína solúvel não é igualmente susceptível à degradação por enzimas de microrganismos ruminais. Solubilidade também não é pré-requisito para degradação, já que parte da proteína insolúvel também é degradada no rúmen. A proteína solúvel também pode ter maior taxa de passagem pelo rúmen que a proteína insolúvel e, portanto, pode deixar o rúmen intacto. Isto ocorre pela maior possibilidade de associação da proteína solúvel à fase fluída da digesta ruminal (STERN & SATTER 1984). Por ser solúvel, esta fração da proteína pode simplesmente ter sido solubilizada no líquido ruminal e deste modo não foi observada como parte da amostra durante a análise de PB do resíduo de incubação, gerando superestimação da digestibilidade verdadeira da PB. O aumento no teor de proteína solúvel ao longo do tempo de ensilagem foi descrito anteriormente na literatura (BARON et al., 1986; HOFFMAN et al., 2011; KUNG et al., 2014; FERRARETTO et al., 2015) e coincide com a redução de algumas subunidades de zeína

(HOFFMAN et al., 2011; KUNG et al., 2014). A mudança no teor de PS%PB ao longo do tempo de ensilagem indica que houve alterações nas estruturas da proteína do grão (zeína). Embora o presente estudo não tenha avaliado o teor de zeína dos grãos, o baixo teor de PS%PB observados nos grãos de milho não fermentados (independentemente do tamanho de partícula) e o elevado teor de vitreosidade sugerem que os grãos usados para confecção da silagem possuíam elevado teor de zeína. Em um estudo anterior foi observada correlação positiva entre a vitreosidade e o teor de zeína (PHILLIPPEAU et al., 2000). A elevada vitreosidade e consequente concentração de zeína no milho é uma característica que limita a digestibilidade do amido (CORREA et al., 2002; ALLEN et al., 2008; LOPES et al., 2009), fato que foi observado na avaliação de digestibilidade do milho não fermentado (dia zero de ensilagem) do presente estudo.

A degradação da proteína é um processo natural durante o processo de fermentação (BARON et al., 1986), o que é sugerido pelo aumento contínuo da concentração de $N-NH_3$ na silagem ao longo do tempo de ensilagem (HOFFMAN et al., 2011; DER BREDOSIAN et al., 2012; KUNG et al., 2014), como produto primário de degradação da PB pelas bactérias (OSHIMA & McDONALD, 1978). Os resultados observados no presente estudo são diferentes daqueles relatados na literatura, uma vez que para silagem de milho reidratado de grãos de elevada vitreosidade foi observado um pico na concentração de $N-NH_3$ aos 15 dias de fermentação. Após esse período foi observada uma redução de concentração do N amoniacal e estabilização da sua concentração a níveis consideravelmente mais baixos que os relatados em estudos anteriores (HOFFMAN et al., 2011; DER BREDOSIAN et al., 2012; KUNG et al., 2014) até o fim do período de ensilagem aos 400 dias. A diferença no padrão de concentração do N amoniacal ao longo do tempo de ensilagem em relação aos estudos anteriormente citados (HOFFMAN et al., 2011; DER BREDOSIAN et al., 2012; KUNG et al., 2014), os quais utilizaram grãos colhidos com alto teor de umidade para confecção de silagem, sugere que grãos colhidos com baixo teor de umidade possivelmente possuem a configuração de proteína diferente de grãos colhidos com elevado teor de umidade.

Mudança na relação de endosperma vítreo: farináceo foi descrito por Johnson et al. (2002), em um estudo que avaliou dois híbridos ao longo da maturação dos grãos, sugerindo que quanto maior o grau de maturação maior é a quantidade de endosperma vítreo no grão para alguns híbridos. O aumento da quantidade de proteína na forma vítrea reduz a quantidade de proteína prontamente disponível para a degradação dos microrganismos fermentadores. De acordo com o discutido por Kung et al. (2014), a quebra de albuminas, glutelinas e globulinas pode ocorrer durante o processo de fermentação da silagem. Estes tipos de proteínas não são

hidrofóbicas como as zeínas, o que possivelmente as tornam mais suscetíveis a degradação bacteriana em comparação com as zeína. A degradação de uma fração mais prontamente disponível da PB dos grãos de alta vitreosidade e colhidos completamente maduros pode ser sugerida como a explicação para o pico de N-NH₃ em períodos iniciais da fermentação, onde há também maior concentração de carboidratos solúveis na silagem o que gera um período mais intenso de fermentação. A redução na concentração de N-NH₃ possivelmente ocorreu, uma vez que por tratar-se de grãos com alta proporção de zeína, proteína de difícil degradação, possivelmente houve uma limitação de N disponível para a multiplicação bacteriana, fazendo com que as mesmas utilizassem o nitrogênio amoniacal para manterem-se ativas.

A redução no tamanho de partícula do milho no presente estudo, permitiu que fossem alcançadas maiores digestibilidades do amido e da PB em menor espaço de tempo. Entretanto, velocidade de aumento da digestibilidade entre as silagens foi semelhante (0,09% ao dia). Deste modo as silagens feitas com tamanhos de partícula fina e média alcançaram maiores valores de digestibilidade em mais curtos espaços de tempo quando comparados com silagens de grãos inteiros e moída grossa, pois apresentaram digestibilidade inicial maior. A única exceção foi observada para os grãos que foram ensilados inteiros e moídos após completarem o tempo pré-determinado de ensilagem, os quais apresentaram aumento menor na digestibilidade em comparação com o tratamento que foi ensilado com tamanho grosseiro de partícula, mesmo que ambos tenham apresentado tamanho de partícula semelhante. Os tratamentos de grãos ensilados inteiros também apresentaram maiores valores de pH e menores valores de N-NH₃ o que sugerem que o tamanho de partícula influenciou na intensidade de fermentação, como sugerido por Hermann et al. (2012), mas apenas quando o milho não foi moído antes da ensilagem.

A literatura relata discrepância entre tamanho de partícula e digestibilidade *in vivo* observado entre grãos ensilados e grãos secos (KNOWLTON et al., 1998; FIRKINS et al., 2001). Os resultados do presente estudo sugerem que as discrepâncias anteriormente discutidas na literatura podem ser em parte geradas pela interação com o tempo de ensilagem, tamanho de partícula e teor de vitreosidade dos grãos, fatores estes, que são suficientemente capazes de alterar significativamente o perfil e a velocidade dos eventos fermentativos dentro do silo. Grãos não fermentados, moídos mais finos são inicialmente mais digestíveis que grãos moídos mais grosseiramente quando um híbrido de mesma vitreosidade é comparado. Entretanto, à medida que o tempo de ensilagem aumenta, silagens com tamanhos de partículas maiores, em comparação com grãos secos com menores tamanhos de partícula, podem ter a digestibilidade do amido compensada, possivelmente pelo aumento da superfície de contato

da bactéria ruminais e enzimas intestinais, com os grânulos de amido, uma vez que parte da proteína que revestia tais grânulos foi solubilizada. Deste modo, a simples comparação entre grãos secos e ensilados ou silagens com diferentes tamanhos de partícula, tempo de ensilagem ou vitreosidade devem ser extremamente criteriosos, levando-se em consideração todos os aspectos passíveis de alterarem a digestibilidade dos nutrientes na silagem e as alterações de compartimento gástrico em que o amido é digerido. Assim, mais estudos são necessários para investigar mais profundamente os fatores que podem alterar *in vitro* e *in vivo* a disponibilidade dos nutrientes da silagem ao longo do tempo de ensilagem e quais os impactos que isso pode causar nos sistemas de produção.

4.1.7 Conclusão

O avanço do tempo de ensilagem aumentou o teor de PS% PB e a digestibilidade *in situ* do amido e da PB em todas as silagens. Silagens com moagem fina e média apresentaram maior digestibilidade do amido e da PB e menores períodos de tempo quando comparados a silagens de grãos inteiros e com moagem grossa. A ensilagem dos grãos inteiros, com moagem posterior a desensilagem, reduziu teor de PS%PB e a digestibilidade tanto para o amido e para a PB em comparação com todos os tratamentos. Com exceção da silagem de grãos inteiros, a digestibilidade do amido aos 400 foi maior para os tratamentos inoculados em comparação com os seus respectivos tamanhos de partícula não inoculados.

4.1.8 Referências bibliográficas

ALLEN, M. S., LONGUSKI, R. A., Y. YING. Endosperm type of dry ground corn grain affects ruminal and total tract digestion of starch in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science** v. 91(E-Suppl. 1) p. 529. 2008.

AOAC. Association of Official Analytical Chemistry. Official methods of analysis. 11. ed. Washington: AOAC. 1990.

ARCARI, M.A., MARTINS, C. M. M. R., TOMAZI, T., SANTOS, M.V. Effect of the ensiling time of hydrated ground corn on silage composition and *in situ* starch degradability. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 53, p 60-71. 2016^a.

ARCARI, M.A., MARTINS, C.M.M.R., TOMAZI, T., GONÇALVES, J.L., SANTOS M.V. Effect of substituting dry corn with rehydrated ensiled corn on dairy cow milk yield and nutrient digestibility. **Animal Feed Science and Technology**, v. 221, Part A, p. 167-173. 2016b.

- BAKER, S., AND T. HERRMAN. Evaluating particle size. MF-2051. Kansas State University. **Coop Extension. Service**, Manhattan, KS. 2002.
- BARON, V. S., STEVENSON, K. R., BUCHANAN-SMITH, J. G. Proteolysis and fermentation of corn grain ensiled at several levels and under several simulated storage methods. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 66, p. 451-461. 1986.
- BENTON, J. R., T. KLOPFENSTEIN, AND G. E. ERICKSON. Effects of corn moisture and length of ensiling on dry matter digestibility and rumen degradable protein. **Nebraska Beef Cattle Reports**, p. 31–33. 2005.
- BUCHANAN, B. B., GRUISSEM, W., JONES, R. L. Biochemistry and Molecular Biology of by dairy cows through a meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 533-550. 2000.
- BURGHARDI, S.R; GARRETT, J.E., GOODRICH, R.D., MEISKE, J.C. Effects of dietary calcium, corn particle size, forage source, and cattle type on site and extent of digestion in steers **Canadian. Journal. Animal. Science**. v. 70, p. 591-599. 1990.
- HERRMANN C; M. HEIERMANN, C. IDLER, A. PROCHNOW 2012. Particle Size Reduction during Harvesting of Crop Feedstock for Biogas Production I: Effects on Ensiling Process and Methane Yields. **BioEnergy Research** v. 5, p 926-936. 2012.
- CORREA C. E. S., SHAVER, R. D., PEREIRA, M. N., LAUER, J. G., KOHN, K. Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 3008–3012. 2002.
- CUNNIFF, P. Official methods of analysis of **AOAC International**. 16ed Arlington: AOAC International. V. 1. 1995.
- DER BEDROSIAN, M. C., KUNG JR. L., NESTOR JR. K. E. The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**. v 95 p.5115–5126. 2012.
- DOMBRINK-KURTZMAN, M. A., BIETZ, J. A. Zein composition in hard and soft endosperm of maize. **Cereal Chemistry**. v.70, p. 105-108. 1993.
- EHRMAN. T. Determination of starch in biomass samples by chemical solubilization and enzymatic digestion. LAP-016. U.S. **Department of Energy. National Bioenergy Center**, Washington, D.C. 1996.
- ERWIN, E.S.; MARCO, G.J.; EMERY, E.M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v.44, p.1768-1771. 1961.
- FERRARETTO, L. F., FREDIN, S. M., SHAVER, R. D. 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**. v. 98, p. 7318–7327. 2015.
- FERRARETTO, L. F., K. TAYSOM, D. TAYSOM, R. D. SHAVER, AND P. C. HOFFMAN. Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia-nitrogen, and ruminal in vitro starch digestibility in high-moisture corn samples. **Journal of Dairy Science**. v. 97, p.3221–3227. 2014.

- FERRARETTO, L. F., P. M. CRUMP., R. D. SHAVER. Effect of cereal grain type and corn grain harvesting and processing methods on intake, digestion and milk production by dairy cows through a meta-analysis. **Journal of Dairy Science**. v. 96, p. 533–550. 2013.
- FIRKINS, J. L., M. L. EASTRIDGE, N. R. ST-PIERRE, AND S. M. NOFTSGER. Effects of grain variability and processing on starch utilization by lactating dairy cattle. **Journal Animal Science**. v. 79 (E. Suppl.), p. E218– E238. 2001.
- FREDIN, S. M., L. F. FERRARETTO, M. S. AKINS, S. J. BERTICS, R. D. SHAVER. Effects of corn-based diet starch content and corn particle size on lactation performance, digestibility, and bacterial protein flow in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 98, p. 541-553. 2015.
- GIUBERTI, G., A. GALLO, F. MASOERO, L. F. FERRARETTO, P. C. HOFFMAN, R., D. SHAVER. Factors affecting starch utilization in large animal food production system: A review. **Starke**. v. 66, p. 72–90. 2014.
- GAYLEAN, M.L; WAGNER, D.G., OWENS F.N. Corn particle size and site and extent of digestion by steers. **Journal. Animal. Science.**, v. 49, p. 204-210. 1979.
- HAMAKER, B. R., MOHAMED, A. A., HABBEN, J. E., HUANG, C. P., LARKINS, B. A. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. **Cereal Chemistry**, v. 72, p. 583-588. 1995.
- HOFFMAN, P. C., N. M. ESSER, R. D. SHAVER, W. K. COBLENTZ, M. P. SCOTT, A. L. BODNAR, R. J. SCHMIDT, AND R. C. CHARLEY. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starchprotein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p. 2465–2474. 2011.
- HUNTINGTON, G. B. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 852–867. 1997.
- JOHNSON, L.M., HARRISON, J.H., DAVIDSON, D. Corn silage management I: Effects of hybrid, maturity, and mechanical processing on chemical and physical characteristics. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.833-853. 2002.
- LYKOS, T; VARGA G.A. Effects of processing method on degradation characteristics of protein and carbohydrate sources *in situ*. **Journal Dairy Science**. v.78, p. 1789-1801.1995.
- KNOWLTON, K. F.; GLENN, B. P.; ERDMAN, R. A. Performance, ruminal fermentation, and site of starch digestion in early lactation cows fed corn grain harvested and processed differently. **Journal of Dairy Science**, v.81, p. 1972-1984. 1998.
- KRISHNAMOORTHY, U., T. V. MUSCATO, C. J. SNIFFEN, AND P. J. VAN SOEST. Borate phosphate procedure as detailed in nitrogen fractions in selected feedstuffs. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p. 217–225. 1982.
- KUNG, L. JR., M. C. WINDLE, AND N. WALKER. The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of highmoisture corn. **Journal of Dairy Science**. v. 97, p. 1707–1712. 2014.
- LAWTON, J. W. Zein: A history of processing and use. **Cereal Chemistry**, v. 79, p. 1-5. 2002.

- LOPES, J. C., R. D. SHAVER, P. C. HOFFMAN, M. S. AKINS, S. J. BERTICS. Type of corn endosperm influences nutrient digestibility in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 4541–4548. 2009.
- McDONALD, P., HENDERSON, A. R., HERON, S. J. E. Microorganisms. In: McDONALD, P. The biochemistry of silage. 2. ed. Aberystwyth, UK: Chalcombe Publications, p. 81-152. 1991.
- MUCK, R. E Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 39, p. 183–191. (Supl. Especial). 2010.
- NEUMANN, M., RESTLE, J., BRONDANI, I. L. Avaliação de silagens de sorgo (*Sorghum bicolor*, L. Moench) ou milho (*Zea mays*, L.) na produção do novilho superprecoce. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 03, p. 438-452, 2004.
- NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of dairy cattle. 7. rev. ed. Washington, DC.: Natl.Acad. Science. 2001.
- OSHIMA, M., MCDONALD, P. A review of the changes in nitrogenous compounds of herbage during ensilage. **Journal Science Food Agriculture**, v.29, p.497-508. 1978.
- PHILIPPEAU, C.; LANDRY, J.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of the protein distribution of maize endosperm on ruminal starch degradability. **Journal Science Food Agriculture**, v. 80, p. 404–408. 2000.
- RÉMOND, D., CABRERA-ESTRADA, J. I., CHAMPION, M. Effect of corn particle size on site and extent of starch digestion in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.1389–1399. 2004.
- SAS Institute. SAS User's Guide: Statistics. SAS Inst. Inc., Cary, NC. 2001.
- STERN, M. D.; SATTER, L.D. Evaluation of nitrogen solubility and the dracon bag technique as methods for estimating protein degradation in the rumen. **Journal of Animal Science**, v.58, p. 714-724. 1984.
- TURGEON, O.A; BRINK, D.R; BRITTON, R.A. Corn particle size mixtures, roughage level and starch utilization in finishing steers diets. **Journal. Animal. Science**, v. 57, p. 739. 1983.
- YOUNG, K. M., J. M. L IM, M. C. DER BEDROSIAN, L. KUNG JR. Effect of exogenous protease enzymes on the fermentation and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**. v. 95, p. 6687-6694. 2012.

5 *Capítulo 5*

5.1 Efeito do tempo de ensilagem, tamanho de partícula e uso de inoculante sobre a composição química, produção de gases e digestibilidade *in situ* da silagem de sorgo reidratado.

5.1.1 Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do tamanho de partícula, inoculante bacteriano e do tempo de ensilagem sobre o perfil de fermentação, composição química, estabilidade aeróbica, produção de gás e digestibilidade *in situ* da silagem de sorgo reidratado (SSR). A SSR foi produzida a partir de grãos sorgo da variedade AG 880, que foram colhidos com teor de MS de 85% e moídos em moinhos de martelo com 3 diferentes tamanhos de peneira (1 (fina), 2 (média) e 8 mm (grossa)). Os grãos moídos foram reidratados e submetidos a ensilagem em frascos de vidro (± 500 g), com tampa metálica equipada com torneira de 3 vias para coleta de gases. Foram utilizados quatro tipos de inoculação bacteriana nas SSR: a) sem inoculante (**Controle**); b) *Lactobacillus buchneri* (cepa CNM I-4323) (**LB**); c) *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum* (**PP**); d) *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus Plantarum* (50%) + *Lactobacillus buchneri* (50%) (**LBpp**). O estudo teve delineamento experimental split-split plot, com arranjo fatorial de tratamentos $3 \times 4 \times 5$ (três tamanhos de partícula, 4 tipos de inoculação e 5 tempos de ensilagem) (5 silos experimentais por tempo de ensilagem utilizados para análises de composição química e 3 silos para teste de estabilidade aeróbica). Os silos foram avaliados aos 0, 15, 30, 120 e 360 dias de ensilagem, quanto à composição química e digestibilidade da silagem. Nos 30 primeiros dias de ensilagem foi avaliada a produção e composição diária dos gases de fermentação. O teor de amido e proteína bruta (PB) não foram afetados pelo tempo de ensilagem, tamanho de partícula ou inoculante. De forma geral todas as silagens apresentaram redução no teor de MS ao longo do tempo de ensilagem. A redução no teor de MS foi maior para as silagens com tamanho de partícula de 1 mm, independentemente do tipo de inoculante utilizado. O pH da silagem reduziu em todas as silagens. Foi observado maior redução no pH do dia zero até o 15º dia de ensilagem para todas as silagens avaliadas. Os maiores valores médios de pH ao longo de todo período de ensilagem, quando comparados as demais silagens, foram observados para as SSR inoculadas com o *L. buchneri* e com tamanho de partícula de 2 e 8 mm. O teor de PS aumentou para todas as silagens ao longo do tempo. A silagem com tamanho de partícula 2 mm inoculada com *L. buchneri*

apresentou a maior concentração (59,22%) de proteína solúvel em percentual da proteína bruta (PS%PB) aos 360 dias em comparação com as demais silagens no mesmo tempo. A concentração de N-NH₃%PB aumentou para todos os tratamentos, com pico de concentração observado no 15º dia de fermentação para todas as silagens. A maior concentração de N-NH₃%PB aos 15 dias foi observada para a silagem com 1 mm de tamanho de partícula e inoculada com *L. buchneri*. Após os 15 dias de ensilagem as concentrações de N-NH₃ reduziram para todas as silagens até que aos 120 dias não houve mais diferença entre os tratamentos. As silagens inoculadas com *L. plantarum* e *P. acidilactici* e moídas em 1 e 2 mm apresentaram maior concentração de ácido láctico (1,78 e 1,73% MS respectivamente) aos 360 dias em relação as demais silagens no mesmo período. Menores concentrações de ácido láctico foram observadas para todas as silagens (1, 2 e 8 mm) inoculados com *L. buchneri* ao longo do período total de ensilagem em comparação com as demais SSR. O teor de ácido acético foi maior ao longo do período total de ensilagem para as todas SSR (1, 2 e 8 mm) inoculadas com *L. buchneri*. A maior concentração de ácido acético foi observada aos 360 dias de ensilagem para a SSR moída a 2 mm quando comparados as demais silagens no mesmo tempo de armazenagem. Todas as silagens inoculadas com *L. buchneri* apresentaram maior estabilidade aeróbica em comparação com as demais silagens. As silagens inoculadas com *L. buchneri* apresentaram estabilidade aeróbica igual a 120 horas, já a partir de 15 dias de ensilagem. A digestibilidade *in situ* da MS e do amido aumentaram para todos os tratamentos ao longo do período total de ensilagem. O tratamento que apresentou o maior digestibilidade aos 360 dias de ensilagem para MS e para o amido foi a silagem inoculada com *L. buchneri* moída a 2 mm (64,8%). Foi observada menor produção total de gases em 30 dias de fermentação para a SSR moída a 1mm e inoculada com *L. plantarum* e *P. acidilactici* (380 ml/kg MS) quando comparado as demais silagens. As SSR que produziram as maiores concentrações de gases combustíveis e H₂SO durante os 30 primeiros dias de ensilagem foram as silagens sem uso de inoculante (1, 2 e 8 mm) e a silagem moída a 8 mm inoculada com *L. buchneri*. A reidratação e ensilagem de grãos de sorgo aumentou a concentração de proteína solúvel e a digestibilidade do amido ao longo do tempo de ensilagem independentemente do tamanho de partícula ou inoculante utilizado. O uso de inoculante *L. buchneri* causou maior estabilidade aeróbica em comparação com as demais silagens. A silagem inoculada com *L. plantarum* e *P. acidilactici* moída a 1 mm produziu a menor quantidade total de gás em 30 dias de fermentação. De forma geral o uso de inoculante bacteriano reduziu a produção total de gases e a concentração de gases combustíveis e H₂SO.

Palavras chave: digestibilidade, ensilagem, inoculante, reidratação, sorgo

5.2 Introdução

O sorgo é considerado uma excelente fonte energética para a alimentação animal, uma vez que o teor de amido é semelhante ao do milho (ZEOULA et al., 1999). Além disso, a cultura do sorgo é uma excelente opção para produção de forragem e grãos em áreas climaticamente desfavoráveis para agricultura de milho (BOLSEN et al., 2003). Entretanto resultados variáveis de desempenho foram reportados na literatura para vacas alimentadas com sorgo (ANDEWAKUN et al., 1989; BOLSEN et al., 2003; OLIVER et al., 2004). Além disso, a aceitação da silagem de planta inteira de sorgo ou mesmo o grão para a alimentação de ruminantes tem limitações em razão dos maiores níveis FDA, lignina e a baixa digestibilidade do amido dos grãos em comparação com a silagem de milho (PROSTKO et al., 1998).

O sorgo é considerado uma alternativa de substituto do milho para a alimentação animal. No entanto, no Brasil, a inexistência de um mercado estruturado desestimula o aumento da área plantada desta cultura (TSUNECHIRO et al., 2002). Adicionalmente, o sorgo compete diretamente com o milho por espaço de armazenagem, o que resulta em intensificação da sua comercialização após a colheita, reduzindo a disponibilidade deste tipo de grãos ao longo do ano (CONAB, 2016). No Brasil, o deságio do preço do sorgo em relação ao milho costuma ser de 25% a 30% (TSUNECHIRO et al., 2002), enquanto que nos Estados Unidos geralmente o deságio do sorgo em relação ao milho é cerca de 10 a 15% (HUCK et al., 1999). Valores elevados de deságio no mercado brasileiro podem refletir um baixo conhecimento do custo: benefício do sorgo no mercado brasileiro de nutrição animal. Deste modo, o sorgo fica em desvantagem em relação ao milho, comprometendo o seu valor como produto de comercialização.

Adicionalmente, o grão do sorgo possui grande quantidade de endosperma periférico compacto, rico em kafirina, (proteína de reserva que reveste os grânulos de amido), o que reduz a digestibilidade do amido, e consequentemente, a produção de leite (PROSTKO et al., 1998; HIBBERD et al., 1982). A silagem de sorgo pode substituir a silagem de milho dietas para bovinos leiteiros no terço médio de lactação, sem efeitos adversos sobre a produção de leite (Bolsen et al. (1989) ou até mesmo sustentar elevadas produções no caso do uso de variedades com alta digestibilidade do FDN (GRANT et al., 1995; OLIVER et al., 2004).

Portanto, as limitações para o uso de silagem de sorgo incluem restrições nutricionais quanto à digestibilidade do amido do grão e de degradação da fibra e do amido para silagens de planta inteira, além das limitações de armazenagem.

A ensilagem do grão (silagem de grão úmido ou silagem de grão reidratado) pode ser uma alternativa para as limitações que o sorgo apresenta quanto à dificuldade de armazenagem e de menor digestibilidade do amido. O tempo de ensilagem pode aumentar a digestibilidade do amido e, conseqüentemente, o valor nutricional da silagem de sorgo. Em silagens de grão úmido e de milho reidratado, o aumento do tempo de ensilagem (ARCARI et al., 2016a) e adição de protease (KUNG et al 2014; FERRARETTO et al, 2015) aumentaram a digestibilidade do amido, por meio de degradação da matriz proteica do endosperma dos grãos. Efeitos benéficos de inoculantes microbianos sobre a fermentação e conservação da silagem de sorgo foram relatados por Cai et al. (1999) e Fiyla (2003). No entanto, a inoculação microbiana não foi capaz de afetar digestibilidade (CAI et al., 1999), ou a sua estabilidade aeróbica (CAI et al., 1999; FIYLA, 2003) de sorgo ensilado.

Considerando que os usos dos grãos de sorgo na nutrição de ruminantes possuem uma enorme janela de oportunidade e que são limitadas as informações sobre as características de ensilagem, valor nutritivo e de degradação ruminal *in situ* de silagem de sorgo reidratado, armazenados por longos períodos e com diferentes tipos de inoculante, foi realizado um experimento para investigar as características da silagem de sorgo reidratado. Nossa hipótese é de que moagem intermediária do sorgo, associado com o uso de inoculante, podem aumentar a estabilidade aeróbica e a digestibilidade do amido, e diminuir a produção de gases durante a ensilagem. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do tamanho de partícula e de uso de inoculante microbiano ao longo de um ano de ensilagem sobre a composição química, digestibilidade do amido, produtos da fermentação, produção de gases e estabilidade aeróbica da silagem de sorgo reidratado.

5.2.1 Materiais e métodos

5.2.2 Delineamento experimental e arranjos de tratamentos

O estudo teve delineamento experimental split-split plot e com arranjo fatorial de tratamentos $3 \times 4 \times 5$ (três tamanhos de partícula, quatro tipos de inoculação e cinco tempos de ensilagem). O tamanho de partícula apresentou, apresentou 3 classes, de acordo com os

seguintes graus de moagem, moído fino (1 mm), moído médio (2 mm) e moído grosso (8 mm). Após a moagem os grãos de sorgo moídos foram reidratados e inoculados com diferentes tipos de inoculantes (1- Controle, 2- *Lactobacillus buchneri*, 3- *Pediococcus acidilactici* e *Lactobacillus plantarum* e uma associação de 4- *Lactobacillus buchneri* (50%), *Pediococcus acidilactici* e *Lactobacillus plantarum* (50%)). Os silos foram avaliados nos seguintes tempos de fermentação (0, 15, 30, 120 a 360 dias). As análises foram realizadas para avaliar o perfil fermentativo, composição bromatológica, produção de gases, estabilidade aeróbica e digestibilidade *in situ* do amido e da matéria seca do grão de sorgo reidratado ensilado.

5.2.2.1 Processo de Ensilagem

Cento e vinte quilos de uma cultivar de sorgo (AG 880), proveniente da área agrícola da Universidade de São Paulo localizada na cidade de Pirassununga-SP, Brasil, foram colhidos em fevereiro do ano de 2015 quando apresentaram teor de MS igual a 83%. Após a colheita os grãos foram submetidos à secagem em estufa de ar forçado (45°C/12h) até atingirem MS média de aproximadamente 87%. Posteriormente a secagem, os foram subdivididos em 4 subparcelas e moídos separadamente em moinho de martelos dotado de peneira de 8, 2 e 1 mm. Os resultados referentes ao tamanho médio de partícula e composição química dos grãos antes e imediatamente após a reidratação estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6- Composição química, tamanho médio de partícula do sorgo moído utilizado para a confecção da silagem.

	Tipo de inoculante / grau de moagem aplicado aos grãos de sorgo											
	Controle 1	LB 1	PP 1	LBpp 1	Controle 2	LB 2	PP 2	LBpp 2	Controle 8	LB 8	PP 8	LBpp 8
MS ^a	85,13	85,43	85,56	85,22	85,11	85,76	85,51	85,39	85,71	85,32	85,09	85,77
MS ^b	69,12	69,86	69,34	69,45	69,23	69,29	69,44	69,50	69,10	69,23	69,72	69,31
PB	8,10	8,09	8,23	8,21	8,32	8,19	8,30	8,33	8,43	8,27	8,5	8,31
PS%PB ^c	2,67	2,74	2,68	2,81	2,76	2,79	2,9	2,87	2,84	2,8	2,78	2,87
Amido	68,16	69,01	68,34	67,98	68,11	68,30	68,59	68,87	68,01	68,56	68,44	68,53
TMP ^d	685	669	678	681	1.065	1.047	1.081	1.046	1.838	1.872	1.891	1,811

Os tratamentos aplicados as silagens correspondem ao tipo de inoculante aplicado: **(Controle** sem inoculante ; **LB:** *Lactobacillus buchneri*; **PP 1:** *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum*; **LBpp 1:** *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus buchneri*) ; seguido pelo tamanho de moagem dos grãos em mm: **(1, 2 e 8 mm)** ^a**MS pré** = % matéria seca antes da reidratação; ^b**MS pós** = % matéria seca pós reidratação; ^c**PS (%PB)** = percentual da proteína solúvel em relação a proteína total da amostra ; ^d**TMP** tamanho médio de partícula (µm).

Após a moagem cada subparcela de sorgo foi homogeneizado e dividida em duas para que uma delas recebesse inoculante e a outra permanecesse como controle. A reidratação das subparcelas foi realizada para que a massa a ser ensilada atingisse, teor de MS próximo a 68%. Posteriormente as subparcelas de sorgo reidratados, inoculados e não inoculados foram distribuídos em mini silos de aproximadamente 500g (frascos de vidro com tampa de rosca metálica, adaptados com válvula de 3 vias na tampa para mensuração da produção de gases) em uma densidade que variou de 0,9 a 1,2 ($\pm 0,03$) ton/m³. Cada tratamento foi distribuído (8 repetições por tempo de fermentação, 5 para análises químicas e 3 para teste de estabilidade aeróbica) de acordo com os seguintes tempos de ensilagem de 0, 15, 30, 120, e 360 dias. Deste modo as amostras foram divididas da seguinte forma:

Sorgo moído fino (1mm):

- Sem inoculante (**Controle 1**);
- Inoculado com *Lactobacillus buchneri* (**LB 1**);
- Inoculado com *Pediococcus acidilactici* e *Lactobacillus plantarum* (**PP 1**)
- Inoculado com uma associação de *Lactobacillus buchneri* (50%), *Pediococcus acidilactici* e *Lactobacillus plantarum* (50%) (**LBpp 1**);

Sorgo com moagem média (2mm):

- Sem inoculante (**Controle2**);
- Inoculado com *Lactobacillus buchneri* (**LB 2**);
- Inoculado *Pediococcus acidilactici* e *Lactobacillus plantarum* (**PP 2**)
- Inoculado com uma associação de *Lactobacillus buchneri* (50%) + *Pediococcus acidilactici* e *Lactobacillus plantarum* (50%) (**LBpp 2**).

Sorgo com moagem grosseira (8mm):

- Sem inoculante (**Controle8**);
- Inoculado com *Lactobacillus buchneri* (**LB 8**);
- Inoculado *Pediococcus acidilactici* e *Lactobacillus plantarum* (**PP 8**)
- Inoculado com uma associação de *Lactobacillus buchneri* (50%), *Pediococcus acidilactici* e *Lactobacillus plantarum* (50%) (**LBpp 8**).

O tamanho de partícula do sorgo moído foi determinado por um sistema de peneiras de 2,000, 1,000, 840, 500, 250, 149 e 105 μm de porosidade e mais uma bandeja fechada no fundo. O tamanho médio de partícula foi calculado usando uma distribuição normal do log (BAKER E HERRMAN, 2002). Os produtos comerciais utilizados por tratamento foram: **LB**: Lalsil® AS; **PP**: Lalsil® CL e **LBpp**: uma combinação dos produtos Lalsil® AS + Lalsil® CL (Lallemand Animal Nutrition). Os produtos foram utilizados conforme recomendação técnica do fabricante nas doses de 1 e 2 g por tonelada de matéria natural, obtendo as concentrações de 100.000 e 130.000 ufc/g de matéria natural para os tratamentos LB e PP, respectivamente.

Os mini-silos foram acondicionados em uma sala escura com temperatura de aproximadamente $25 \pm 5^\circ\text{C}$, até completarem o período de ensilagem pré-determinado para cada tratamento. Ao completarem o período de ensilagem os mini-silos foram congelados a -20°C (exceto aqueles destinados aos testes de estabilidade aeróbica) para interrupção da fermentação. Após todas as amostras completarem o período pré-estipulado de fermentação, as mesmas foram descongeladas para realização das análises químicas.

5.2.2.2 Produção de gases

Para a avaliação da produção de gases foi adaptada uma torneira tipo 3 vias na tampa do frasco de vidro do mini silo. Durante os primeiros 30 dias de ensilagem, a produção de gás foi medida diariamente, através de uma seringa de 200 mL acoplada em uma das vias da torneira e um manômetro digital acoplado a outra das vias da torneira, sendo considerado o volume de gás extraído, a quantidade em mL registrado na seringa após o manômetro atingir pressão igual a zero. Após a mensuração do volume, o gás foi injetado por 30 segundos em aparelho detector de gases (DG 500 Instrutherm®), para mensuração de 2 famílias de gases: gases combustíveis (% LEL), gás sulfídrico (H_2S , ppm).

5.2.2.3 Análise de composição química

As análises de composição química e digestibilidade *in situ* do presente estudo foram realizados de acordo com o descrito na seção de análises químicas (3.1.3.3) do capítulo 3. O teste de estabilidade aeróbica utilizou 3 silos experimentais de cada tratamento em cada tempo de ensilagem. Os mini-silos após completarem o tempo de ensilagem foram abertos tendo a silagem transferida para um recipiente de poliestireno expandido com capacidade para 500 g. Após a transferência para os recipientes de poliestireno as silagens tiveram a temperatura

mensurada por um termômetro tipo espeto a cada 2 horas. Foi considerado a quebra da estabilidade aeróbica quando a temperatura da silagem atingiu 2ª acima da temperatura ambiente (TAYLOR & KUNG 2002)

5.2.3 Análise Estatística

Os dados foram avaliados como um split-split plot (Littell et al., 1996) usando os procedimentos PROC MIXED do SAS (SAS Institute, 2001). Três diferentes tamanhos de partícula (grossa, média e fina) de um híbrido foram definidos como parcelas inteiras com tempo de ensilagem e inoculação como subparcelas. Os principais efeitos no modelo incluíram o tamanho de partícula, o inoculante, o tempo de ensilagem e suas interações. Os efeitos aleatórios do modelo incluíram repetição e interações da repetição com o tamanho de partícula e inoculante. Os principais efeitos e as principais interações foram declarados quando $P < 0,05$. O arranjo de tratamentos foi em esquema fatorial de tratamentos $3 \times 4 \times 5$, com 3 tamanhos de partícula, 4 tipos de inoculação e 5 tempos de ensilagem. O efeito do tempo de ensilagem foi avaliado como medidas repetidas no tempo. Diversas estruturas de erros foram investigadas, e a estrutura escolhida para cada variável avaliada foi de acordo com o critério de informação bayesiano (BIC).

5.2.4 Resultados

Os resultados das análises estatísticas com os respectivos valores de P para os efeitos principais (tamanho de partícula, inoculante e tempo de fermentação), para as interações simples (tamanho de partícula $\times$ inoculante; tamanho de partícula $\times$ tempo de fermentação e tempo de fermentação $\times$ inoculante) e para a interação tripla (tempo de fermentação $\times$ inoculante $\times$ tamanho de partícula) estão apresentados na Tabela 7. O teor médio de MS antes da reidratação foi de 85,41%, sendo que após a reidratação a média do teor de MS foi de 69,38%. O teor de proteína bruta dos tratamentos foi em média 8,25 MS enquanto que o teor médio de proteína solúvel em percentual da PB (PS%PB) foi de 2,79%. O teor de amido foi em média de 68% MS.

Tabela 7- Efeito do tamanho de partícula, inoculante e tempo de fermentação sobre o pH, composição química, conservação, digestibilidade e gases da silagem de sorgo reidratado

Gases da digestão de sorgo forrageiro														
Efeito	pH	Composição Química ²							Conservação ³		Digestibilidade		Gases ⁴	
		MS,	Amido,	PB	PS, % PB	NH ₃ , % PB	Ac. Lático	Ac. Acético	Perda de Peso	Estabilidade aeróbica	Amido,	MS,	Combustíveis, % LEL	H ₂ S, ppm
Valor de P (Efeito Principal)														
TP	<0,01	0,02	0,62	0,12	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
I	<0,01	0,75	0,35	0,31	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
T	<0,01	0,01	0,02	0,13	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Valor de P (Interações)														
TP×I	<0,01	0,11	0,2	0,17	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
TP×T	<0,01	<0,01	0,38	0,41	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
I×T	<0,01	0,35	0,79	0,13	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
TP×I×T	<0,01	0,58	0,05	0,38	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
EPM ¹	0,08	0,2	0,2	0,03	0,3	0,12	0,02	0,03	0,03	0,12	0,48	0,32	0,62	0,56

¹EPM: erro padrão da média. ²MS: matéria seca; PB: proteína bruta; PS %PB: proteína solúvel em % da proteína bruta; NH₃ %PB: nitrogênio amoniacal em % da proteína bruta.

³Perda de peso: perda de peso em % da matéria natural; Estabilidade aeróbica: tempo em horas considerada para perda da estabilidade aeróbica, considerada quando a silagem atingiu 2°C acima da temperatura ambiente. ⁴Combustíveis: gases combustíveis em % de LEL (low explosive limit); H₂SO₄: gás sulfídrico; CO: monóxido de carbono.

Houve interação de TP×T ($P<0,01$; Tabela 7) sobre o teor de MS das SSR. De forma geral todas as silagens apresentaram redução no teor de MS ao longo do tempo total de ensilagem (Figura 11), independentemente do tipo de inoculante utilizado. Houve efeito de interação tripla TP×I×T ($P<0,01$; Tabela 7) sobre o pH da SSR, onde foi observado queda no pH de todos os tratamentos avaliados nos primeiros 15 dias de ensilagem (Figura 12). As silagens inoculadas com o *L. buchneri* e com tamanho de partícula de 2 e 8 mm mantiveram o pH mais elevado em relação aos demais tratamentos ($P<0,01$) por todo o período de ensilagem. A silagem com moagem de 8 mm inoculado com *L. buchneri* apresentou o maior valor de pH durante todo o período de ensilagem. Embora tenha sido observado efeito de interação tripla TP×I×T ($P = 0,05$; Tabela 7) para a concentração de amido da SSR, a concentração final aos 360 dias não diferenciou da concentração inicial (dia zero de ensilagem) (Figura 13).

Figura 9 Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre o teor de MS da silagem de sorgo reidratado. Os tratamentos aplicados as silagens correspondem ao tipo de inoculante aplicado: (**Controle** sem inoculante; **LB**: *Lactobacillus buchneri*; **PP 1**: *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum*; **LBpp 1**: *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus buchneri*), seguido pelo tamanho de moagem dos grãos em mm: (1, 2 e 8 mm).

Figura 10 Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre o pH da silagem de sorgo reidratado. Os tratamentos aplicados as silagens correspondem ao tipo de inoculante aplicado: (**Controle** sem inoculante; **LB**: *Lactobacillus buchneri*; **PP 1**: *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum*; **LBpp 1**: *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus buchneri*), seguido pelo tamanho de moagem dos grãos em mm: (**1, 2 e 8 mm**).

Figura 11 Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre o teor de amido da silagem de sorgo reidratado. Os tratamentos aplicados as silagens correspondem ao tipo de inoculante aplicado: (**Controle**: sem inoculante; **LB**: *Lactobacillus buchneri*; **PP 1**: *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum*; **LBpp 1**: *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus buchneri*), seguido pelo tamanho de moagem dos grãos em mm: (**1, 2 e 8 mm**).

Não houve efeito do tempo de ensilagem, tamanho de partícula e uso de inoculante sobre o teor de PB da SSR (Tabela 7). Não foi observado diferença entre a concentração inicial e final

de PB para os tratamentos durante o período total de ensilagem (Figura 14). Foi observado efeito da interação tripla TP×I×T ($P<0,01$; Tabela 7) para a concentração de proteína solúvel. O teor de PS%PB aumentou para todos as silagens ao longo do tempo de ensilagem (Figura 15). A silagem moída com tamanho médio de partícula 2 mm inoculada com *L. buchneri* apresentou o maior teor de PS%PB aos 360 dias de ensilagem em comparação com as demais silagens no mesmo período de tempo.

O teor de N-NH₃ sofreu efeito da interação tripla TP×I×T ($P<0,01$; Tabela 7). A concentração de N-NH₃ apresentou pico no 15º dia de fermentação para todas as silagens. A maior concentração de N-NH₃%PB ($P<0,01$) foi observada aos 15 dias para a silagem com 1 mm de tamanho de partícula e inoculada com *L. buchneri* (Figura 16). Após os 15 dias de ensilagem a concentrações de N-NH₃ reduziu para todas as silagens até que aos 120 dias de ensilagem não foi mais observada diferenças ($P<0,05$) entre as silagens (Figura 16).

Figura 12 Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre o teor de PB da silagem de sorgo reidratado. Os tratamentos aplicados as silagens correspondem ao tipo de inoculante aplicado: (**Controle** sem inoculante ; **LB**: *Lactobacillus buchneri*; **PP 1**: *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum*; **LBpp 1**: *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus buchneri*), seguido pelo tamanho de moagem dos grãos em mm: (1, 2 e 8 mm).

Figura 13 Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre o teor de proteína solúvel da silagem de sorgo reidratado. Os tratamentos aplicados as silagens correspondem ao tipo de inoculante aplicado: (**Controle** sem inoculante ; **LB**: *Lactobacillus buchneri*; **PP 1**: *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum*; **LBpp 1**: *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus buchneri*), seguido pelo tamanho de moagem dos grãos em mm: (**1, 2 e 8 mm**).

Figura 14 Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre o teor de nitrogênio amoniacal em relação a proteína bruta da silagem de sorgo reidratado. Os tratamentos aplicados as silagens correspondem ao tipo de inoculante aplicado: (**Controle** sem inoculante ; **LB**: *Lactobacillus buchneri*; **PP 1**: *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum*; **LBpp 1**: *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus buchneri*), seguido pelo tamanho de moagem dos grãos em mm: (**1, 2 e 8 mm**).

A concentração de ácido láctico sofreu efeito da interação tripla TP×I×T ($P<0,01$; Tabela 7). Houve aumento da concentração de ácido láctico para todas as silagens ao longo do tempo de ensilagem (Figura 17). A menor ($P<0,01$) concentração de ac. láctico foi observada para as silagens moída a 1, 2 e 8 mm inoculadas com *L. buchneri* em relação aos demais silagens (Figura 17). Aos 360 dias de ensilagem foi observada maior concentração de ácido láctico ($P<0,01$) para as silagens inoculadas com *L. plantarum* + *Pediococcus acidilactici* moídos a 1 e 2 mm em comparação com as demais silagens (Figura 17).

A concentração de ácido acético foi influenciada pela interação tripla TP×I×T ($P<0,01$; Tabela 7). A concentração de acetato foi maior ($P<0,01$) para as silagens inoculadas com *L. buchneri* (Figura 16). O maior teor do ácido acético ($P<0,01$) foi observado para a silagem com tamanho de partícula de 2 mm, já a partir dos 30 dias até o final do período de ensilagem em comparação com as demais silagens (Figura 16). Durante todo o período de ensilagem não houve diferença ($P>0,05$) entre as silagens inoculadas com *L. plantarum* e *P. acidilactici* a combinação entre *L. plantarum* e *P. acidilactici* + *L. buchneri* e as silagens sem o uso de inoculante independentemente do tamanho de partícula.

Figura 15 Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre o teor de ácido láctico (%MS) da silagem de sorgo reidratado. Os tratamentos aplicados as silagens correspondem ao tipo de inoculante aplicado: (**Controle**: sem inoculante; **LB**: *Lactobacillus buchneri*; **PP 1**: *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum*; **LBpp 1**: *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus buchneri*), seguido pelo tamanho de moagem dos grãos em mm: (1, 2 e 8 mm).

Figura 16 Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre o teor de ácido acético (mmol/L) da silagem de sorgo reidratado. Os tratamentos aplicados as silagens correspondem ao tipo de inoculante aplicado: (**Controle** sem inoculante; **LB**: *Lactobacillus buchneri*; **PP 1**: *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum*; **LBpp 1**: *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus buchneri*), seguido pelo tamanho de moagem dos grãos em mm: (**1, 2 e 8 mm**).

A estabilidade aeróbica sofreu efeito da interação tripla TP×I×T ($P<0,01$; Tabela 7), os resultados estão apresentados na Figura 19. O sorgo reidratado e não ensilado (tempo 0) apresentou baixa estabilidade aeróbica, com uma média 26 horas entre todas as silagens. Foi observado um aumento ($P<0,01$) na estabilidade aeróbica em todos os tratamentos testados após 15 dias de ensilagem em comparação com o dia zero de ensilagem. As silagens que apresentaram maior tempo de estabilidade aeróbica ($P<0,01$), foram as silagens inoculadas com *L. buchneri*, chegando a 120 horas de estabilidade em todos os pontos de observação a partir dos 15 até os 360 dias de ensilagem (Figura 19). Para o grupo controle foi observado tempo de estabilidade, com média de 88 horas. Já os tratamentos inoculados com *L. plantarum* + *Pediococcus acidilactici* e a mistura *L. plantarum* + *Pediococcus acidilactici* e *L. buchneri* apresentaram os menores tempos para perda da estabilidade aeróbica, em média de 76 horas ao longo do período total de ensilagem (Figura 19).

Figura 17 Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre o tempo necessário para a perda da estabilidade aeróbica da silagem (2°C acima da temperatura ambiente). Os tratamentos aplicados as silagens correspondem ao tipo de inoculante aplicado: (**Controle**: sem inoculante; **LB**: *Lactobacillus buchneri*; **PP 1**: *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum*; **LBpp 1**: *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus buchneri*), seguido pelo tamanho de moagem dos grãos em mm: (1, 2 e 8 mm).

A perda de peso com base na matéria natural foi mensurada através da diferença do peso da amostra no momento da ensilagem e do peso da mesma amostra no momento em que o período pré-estipulado de fermentação para cada tratamento foi atingido. A perda de peso sofreu efeito da interação tripla TP×I×T ($P<0,01$; Tabela 7). As silagens que apresentaram maior perda de peso ($P<0,01$) ao longo do período total de ensilagem foram os tratamentos que utilizaram *L. buchneri* independentemente do tamanho de partícula (Figura 20). Com exceção da silagem inoculada com *L. buchneri* moída a 8 mm, as silagens contendo tamanho de partícula de 8 mm, apresentaram os menores percentuais de perda de peso ($P<0,01$) aos 360 dias de fermentação em comparação com as demais silagens (Figura 20). As silagens contendo os tamanhos de partículas de 1 e 2 mm, independentemente do tipo de inoculação, não apresentaram diferença entre si ($P>0,05$), porém apresentaram perda de peso superior ($P<0,01$) as silagens contendo o tamanho de partícula de 8 mm (Figura 20).

Figure 18 Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre a perda de peso em % da matéria natural da silagem de sorgo reidratado. Os tratamentos aplicados as silagens correspondem ao tipo de inoculante aplicado: (**Controle**: sem inoculante; **LB**: *Lactobacillus buchneri*; **PP 1**: *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum*; **LBpp 1**: *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus buchneri*), seguido pelo tamanho de moagem dos grãos em mm: (1, 2 e 8 mm).

A digestibilidade da MS e do amido se comportaram de forma semelhante (Figuras 21 e 22, respectivamente). Ambos os valores de digestibilidade sofreram influência da interação tripla TP×I×T ($P<0,01$; Tabela 7). Tanto as digestibilidades da MS quanto do amido aumentaram com o tempo de ensilagem para todas as silagens (Figuras 21 e 22). As digestibilidades referentes ao tempo 0 foram fortemente influenciadas pelo tamanho de partícula ($P<0,01$) (Figuras 11 e 12), apresentando menor digestibilidade ($P<0,01$) para a silagem maior tamanho de partícula (8 mm), intermediária ($P<0,01$) para o tamanho de partícula intermediário (2 mm) e maior valor de digestibilidade ($P<0,01$) para o menor tamanho de partícula (1mm). A menor digestibilidade da MS e do amido ($P<0,01$) foi observado, por todo o período de ensilagem, para as silagens moídas a 8 mm (Figuras 21 e 22).

Aos 360 dias de ensilagem a silagem com tamanho de partícula de 2 mm e inoculado com *L. buchneri* foi o que apresentou maior digestibilidade da MS e do amido ($P<0,01$) em relação as demais silagens com o mesmo tempo de ensilagem (Figuras 21 e 22).

Figura 19 Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre a digestibilidade da MS da silagem de sorgo reidratado. Os tratamentos aplicados as silagens correspondem ao tipo de inoculante aplicado: (**Controle**: sem inoculante ; **LB**: *Lactobacillus buchneri*; **PP 1**: *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum*; **LBpp 1**: *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus buchneri*), seguido pelo tamanho de moagem dos grãos em mm: (1, 2 e 8 mm).

Figura 20 Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre a digestibilidade do amido da silagem de sorgo reidratado. Os tratamentos aplicados as silagens correspondem ao tipo de inoculante aplicado: (**Controle**: sem inoculante; **LB**: *Lactobacillus buchneri*; **PP 1**: *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum*; **LBpp 1**: *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus buchneri*), seguido pelo tamanho de moagem dos grãos em mm: (1, 2 e 8 mm).

Para concentração da família dos gases combustíveis (%LEL), gás sulfídrico (H_2S) (Figura 23) foi observado efeito da interação tripla $\text{TP} \times \text{I} \times \text{T}$ ($P < 0,01$; Tabela 7). Para os tamanhos de partícula de 1 e 2 mm foi observada maior concentração de gases combustíveis ($P < 0,01$) quando a SSR não foi inoculada. Já para o tamanho de partícula de 8 mm as maiores produções ($P < 0,01$) de gases combustíveis foram observadas para as silagens sem o uso de inoculante e inoculado com *L. buchneri* em comparação com as demais silagens (Figura 23)

A produção de gás sulfídrico foi maior ($P < 0,01$) para silagens sem o uso de inoculante com tamanhos de partícula de 1 e 2 mm, sendo que as demais silagens não apresentaram diferença entre si ($P > 0,05$) (Figura 23). Já para o tamanho de partícula de 8 mm, as silagens sem uso de inoculante e a silagem inoculada com *L. buchneri* se apresentaram maiores valores ($P < 0,01$) em comparação com as demais silagens (Figura 23).

Figura 21 Efeito do tempo de fermentação, tamanho de partícula e inoculante sobre a concentração de gases combustíveis, gás sulfídrico (H₂SO₄) e monóxido de carbono (CO) da silagem de sorgo reidratado. Controle: sem inoculante; LB: *Lactobacillus buchneri*; PP: *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici*; LBpp: *Lactobacillus buchneri* + *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici*;

O tratamento que apresentou maior produção de gás foi a silagem com tamanho de partícula de 8 mm e inoculado com *L. buchneri* ($P<0,01$) (Figura 24). Para as silagens sem o uso de inoculante não foi observado diferença ($P>0,05$) para a produção de gás entre os 3 tamanhos de partícula. As silagens sem o uso de inoculante, independentemente do tamanho de partícula, apresentaram produção de gás total superior aos demais tratamentos com inoculantes bacterianos, exceto quando comparado a silagem inoculada com *L. buchneri* e tamanho de partícula de 8 mm (Figura 24). A menor produção de gás ($P<0,01$) foi observada para a silagem moída a 1 mm inoculada com *L. plantarum* e *P. acidilactici*. (Figura 24).

Figure 22 Efeito do tamanho de partícula e inoculante sobre a produção total de gases da silagem de sorgo reidratado. Controle: sem inoculante; LB: *L. buchneri*; PP: *L. plantarum* + *P. acidilactici*; LBpp: *L. buchneri*; *L. plantarum* + *P. acidilactici*.

5.2.5 Discussão

O pH da silagem é um parâmetro importante a longo prazo para a conservação de silagens. Grãos de sorgo possuem baixa capacidade de tampão, o que permite uma queda de pH rapidamente mesmo quando produção de ácido é pequena (ALLI et al., 1983),

sendo este fato sugerido como explicação para o baixo pH observado mesmo para silagens que não receberam adição do inoculante no presente estudo. Embora um pH abaixo 4.0 seja considerado satisfatório para o armazenamento a longo prazo de material ensilado (JASTER, 1995), mesmo nos tratamentos inoculado com *L. buchneri* que apresentaram valores superiores a 4.0, não foi observada a presença de ácido butíricos. A ausência de ac. butírico indica uma boa conservação da silagem, o que provavelmente se deva ao ambiente ácido, inadequado para as enterobactérias e clostrídios, ou a inibição destes microrganismos por outros produtos como o ácido láctico e acético (McDONALD et al., 1991). A diminuição do pH da silagem no presente estudo é semelhante aos resultados em estudos anteriores com ensilagem de milho reidratado, silagem de grão úmido ou sorgo planta inteira (KUNG et al., 2014; ZAFARI et al., 2014; FERRARETTO et al., 2015), sugerindo que o comportamento de queda de pH da SSR é semelhante a silagens de milho e de que o mesmo processo adotado para silagem de milho reidratado pode ser aplicado a SSR.

No presente estudo, com o avanço do tempo de ensilagem, as concentrações de ácido láctico e acético aumentaram em diferentes concentrações ao longo do tempo de ensilagem, dependendo do inoculante usado. O aumento dos produtos finais de fermentação (lactato e acetato) ao longo do período total de ensilagem da SSR sugerem que a atividade microbiana persistiu mesmo em pH baixo. Este resultado é semelhante ao descrito por Kung & Der Bedrosian (2010) para silagem de grãos úmidos de milho. Schmidt et al. (2009) relataram que a população de bactérias ácido lácticas em silagem de alfafa continuaram ativas além dos 180 dias de ensilagem, indicando que as atividades bacterianas se mantem por longos períodos na silagem. O *L. buchneri*, *L. plantarum* e o *Pediococcus acidilactici* parecem estar ativos por longos períodos de tempo, uma vez que no presente estudo os produtos de fermentação como ácido acético, para silagens inoculada com *L. buchneri* e ácido láctico para silagens inoculada com *L. plantarum* e *P. acidilactici* aumentaram de concentração até os 360 dias. Sob condições anaeróbicas e pH baixo, o *L. buchneri* é capaz de converter ácido láctico em acético, etanol e 1, 2 propanodiol (OUDE-ELFERINK et al., 2001), fato que poderia explicar o declínio da concentração de ácido láctico ao longo do período de ensilagem nos tratamentos inoculados com *L. buchneri*.

O aumento da digestibilidade do amido e da PB da SSR ao longo do tempo em que a silagem permaneceu estocada, sugere que assim como a silagem de milho reidratado (ARCARI et al., 2016a; FERRARETTO et al., 2015) a silagem de sorgo reidratado

também é suscetível ao aumento da digestibilidade do amido ao longo do tempo, causado pelo processo de ensilagem. Embora maior número de estudos estejam disponíveis sobre a degradação da zeína (proteína de reserva do endosperma do grão do milho) ao longo do tempo de ensilagem (HOFFMANN et al., 2011, KUNG et al., 2014), os dados observados no presente estudo sugerem um comportamento semelhante da kafirina (proteína de reserva do grão de sorgo) durante o avanço do tempo de ensilagem. Mesmo que o presente estudo apresente como limitação o fato de não ter analisado o teor de kafirina ou o desaparecimento desta ao longo do tempo de ensilagem, foram observadas semelhanças no comportamento da SSR ao longo do tempo de ensilagem com estudos com silagem de grãos úmidos (FERRARETTO et al., 2015) e silagem de milho reidratado (KUNG et al., 2014). Essas semelhanças sugerem que possa ter havido degradação da kafirina pelo processo de ensilagem, semelhante ao relatado por Hoffmann et al. (2011) para a zeína no milho, ao longo de 140 dias de ensilagem. A possível degradação da kafirina durante o tempo de ensilagem poderia explicar o aumento da solubilidade da proteína e da degradação *in situ* do amido uma vez que esta proteína é responsável por circundar parte considerável dos grânulos de amido do grão de sorgo.

O aumento do teor de proteína solúvel do SSR com o avanço do tempo de ensilagem observado em todos os tratamentos do presente estudo é semelhante a outros estudos que avaliaram o efeito do tempo de ensilagem de grãos úmidos e silagem de milho reidratado (FERRARETTO et al., 2014; FERRARETTO et al., 2015). O teor de proteína solúvel foi altamente correlacionado com a digestibilidade do amido em estudos anteriores com silagem de grãos úmidos (KUNG et al., 2014; FERRARETTO et al., 2015), sugerindo que a solubilização da fração nitrogenada dos grãos durante a ensilagem do material pode proporcionar maior acesso das bactérias amilolítica aos grânulos de amido antes envoltos pela matriz proteica (GIUBERTI et al., 2014). Embora o presente estudo tenha sido conduzido com grão de sorgo, o papel das proteínas de reserva do endosperma dos grãos de sorgo é semelhante à desempenhada pela zeína do milho. Sendo que em ambos os grãos (milho e sorgo) as proteínas de reserva são apontadas como fatores de depressão da digestibilidade do amido, uma vez que tanto a zeína (milho) quanto a kafirina (sorgo) são insolúveis e de baixa digestibilidade (PROSTKO et al., 1998).

O teor de N-NH₃ da silagem de sorgo reidratado apresentou comportamento diferente daqueles relatados em estudos que avaliaram silagem de grãos úmidos de milho por longos períodos de ensilagem (HOFFMANN et al., 2011, KUNG et al., 2014). Os

teores de nitrogênio amoniacal observado nas silagens de grãos úmidos de milho em estudos prévios foram relatados como linearmente crescentes de acordo com o avanço do período de ensilagem (HOFFMANN et al., 2011, KUNG et al., 2014). Filya (2003) reportou aumento na quantidade de N-NH_3 em silagens de milho e sorgo ao longo 90 dias de ensilagem. De modo semelhante, Kleinschmit & Kung (2006) relataram um aumento constante no N-NH_3 no milho ensilagem através de 361 dias de ensilagem sem atingir um platô. Os grãos de sorgo utilizados para a confecção da reidratação e ensilagem do presente estudo foram colhidos com elevado teor de MS. Segundo relatado em estudo anterior que avaliaram a vitreosidade de diferentes híbridos de milho, há aumento do teor de vitreosidade a medida que teor de MS do grão aumenta (JOHNSON et al., 2002). Embora sejam escassos os dados referentes aos grãos de sorgo reidratado e ensilado, é possível especular que o grão de sorgo tenha um comportamento semelhante aos grãos de milho durante sua maturação. Deste modo, a medida que aumenta a maturidade dos grãos de sorgo, a vitreosidade no endosperma deste grão poderia aumentar. O aumento da vitreosidade implicaria em maior quantidade de kafirina presente no endosperma do grão de sorgo. Este tipo de proteína possivelmente apresente baixo potencial de degradação pela ação bacteriana durante a fermentação no silo, semelhante ao descrito para a zeína (HOFFMANN et al., 2011). Deste modo a produção de N-NH_3 em um silo de grãos reidratados possivelmente ocorrerá primeiro sobre a fração de proteínas susceptíveis a ação bacteriana, fração esta que será menor a medida que o material ensilado apresentar maior teor de vitreosidade. Este fato poderia explicar o pico de concentração de N-NH_3 aos 15 dias de ensilagem, uma vez que nos períodos iniciais poderia haver maior quantidade de proteína prontamente disponível para a degradação bacteriana gerando elevada degradação de proteína e consequente produção de N-NH_3 . A redução da concentração de N-NH_3 após os 15 dias possivelmente se deva ao consumo do nitrogênio amoniacal pelas próprias bactérias responsáveis pela fermentação do silo, uma vez que a fração proteica remanescente no grão é de difícil degradação.

O tamanho de partícula ao qual os grãos foram submetidos antes do processo de reidratação e ensilagem apresentou influência direta sobre a digestibilidade do amido, sendo consideravelmente maior para grãos com moagem média e fina em comparação com grãos submetidos a moagem grosseira. Segundo Igarasi et al. (2008) o sorgo devidamente processado pode apresentar eficiência de 95 a 100% do milho na alimentação dos bovinos. Entretanto os principais métodos de processamento disponíveis

para o processamento no Brasil (moagem fina) podem elevar o custo final do sorgo (MILLEN et al. 2009)

Reduzir o tamanho da partícula do grão de sorgo antes da ensilagem demonstrou ser importante no aumento da digestibilidade da silagem em períodos iniciais, proporcionando, em comparação aos tratamentos com tamanho de partícula mais grossos, maiores digestibilidades em menores períodos de tempo. A moagem grosseira de grãos de sorgo proporcionaram ao material a ser ensilado, uma grande quantidade de grãos inteiros. Segundo Jobim et al. (2003) o pericarpo que reveste os grãos dos cereais, de modo geral é predominantemente constituído por material fibroso de difícil degradação. Possivelmente, por apresentarem grande quantidade de grãos inteiros, os tratamentos submetidos a moagem grosseira apresentaram menor digestibilidade em comparação com os tratamentos com moagem fina e média em todos os pontos de observação ao longo do estudo.

A maior produção de ácido acético e estabilidade aeróbica ao longo de todo tempo de ensilagem para silagens com uso do inoculante contendo a cepa de *L. buchneri* estão de acordo com a literatura que relata que o uso de *L. buchneri* (DRIEHUIS et al., 1999; RANJIT & KUNG Jr. 2000; TAYLOR & KUNG, 2002; KLEINSCHMIT & KUNG JR. 2006). Embora o uso de inoculante a base de *L. buchneri* tenha proporcionado maiores quantidades de ácido acético e estabilidade aeróbica superior em relação aos demais tratamentos, o uso de inoculantes produtores de ácido láctico (*L. plantarum* e *P. acidilactici*) apresentaram capacidade superior em suprimir a produção de gases em comparação com controle e o *L. buchneri*. A rápida produção de elevadas quantidades de ácido láctico e a rápida queda do pH possivelmente inibiram as populações nativas de bactérias e leveduras presentes no material ensilado. E embora não tenha sido realizada contagem microbiológica no material ensilado no presente estudo, a literatura relata que o uso de inoculante bacteriano é capaz de reduzir a contagem de leveduras presentes na silagem (RANJIT & KUNG Jr. 2000; TABACCO et al., 2011). A rápida inibição de populações bacterianas e de leveduras possivelmente possa explicar a menor produção total de gás e também a menor concentração de gases combustíveis e H₂S observados nas silagens inoculadas com bactérias produtoras heterofermentativas. Embora a maior produção total de gás tenha sido observada para a silagem moída a 8 mm inoculada com *L. buchneri*, de modo geral a ausência de inoculante para a confecção da silagem (tratamento controle) provocou maior produção total de gases. Este fato possivelmente ocorreu pelo desenvolvimento de bactérias deteriorantes nos períodos iniciais da

ensilagem, mesmo que os pH destes tratamentos tenham atingido valores abaixo de 4,0. Embora tenha sido observado menores produções de gás para silagens moídas fina, os resultados observados com a moagem média da silagem sugerem que não seja necessário moer finamente os grãos antes da ensilagem para se obter melhorias significativas na digestibilidade do amido da silagem.

5.2.6 Conclusão

A reidratação e ensilagem de grãos de sorgo colhidos secos, proporcionou um adequado processo de fermentação, aumento da digestibilidade do amido com boa conservação da silagem independentemente do tamanho de partícula ou inoculante utilizado. A utilização de *Lactobacillus buchneri* como inoculante para a silagem de grão de sorgo reidratado possibilitou o aumento da estabilidade aeróbica, independentemente do tamanho de partícula do grão. O *L. buchneri* contribuiu para o aumento da digestibilidade da MS e do amido, mas somente para as granulometrias de 1 e 2 mm e no tempo de conservação de 360 dias. Com exceção do tratamento com granulometria de 8 mm inoculado com *L. buchneri*, a produção total de gás foi maior para o grupo controle. Silagens moída fina e inoculada com *L. plantarum* e *P. acidilactici* produziu menos gás em comparação com as demais silagens. O aumento da granulometria dos grãos antes da ensilagem piorou a digestibilidade do amido nos períodos iniciais de ensilagem, requerendo maior período de tempo para que os grãos moídos grosseiramente apresentassem a mesma digestibilidade de grãos moídos fino.

5.2.7 Referências bibliográficas

- ALLI, I., FAIRBAIRN, R., BAKER, B. E. The effect of ammonia on the fermentation of chopped sugarcane. **Animal Feed Science and Technology**, v.9, p.291-299. 1983.
- ANDEWAKUN, L.O., FAMUYIWA, A.O., FELIX, A., OMOLE, T.A. Growth performance, feed intake and nutrient digestibility by beef calves fed sweet sorghum silage, corn silage and fescue hay. **Journal Animal Science**. v. 67, p. 1341–1349. 1989.
- ARCARI, M.A., MARTINS, C. M. M. R., TOMAZI, T., SANTOS, M.V. Effect of the ensiling time of hydrated ground corn on silage composition and *in situ* starch degradability. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science** v. 53, p. 60-71. 2016a
- ARCARI, M.A., MARTINS, C.M.M.R., TOMAZI, T., GONÇALVES, J.L., SANTOS M.V. Effect of substituting dry corn with rehydrated ensiled corn on dairy cow milk yield and nutrient digestibility. **Animal Feed Science and Technology**, v. 221, p. 167-173. 2016b.
- BOLSEN, K. K., SHERLEY, J. E., LAYTIMI, A. AND DICKERSON. J. Whole-plant grain sorghum and inoculated corn silages in mid-lactation dairy cows diets. Pages 32–37 in Annual Kansas State Dairy Day Proc. Agric. Exp. Stn., Kansas State University, Manhattan. Accessed May 4, 2017. <http://krex.k-state.edu/dspace/bitstream/handle/2097/14666/Dairy89pg32-37.pdf?sequence=1>. 1989.
- BOLSEN, K.K., MOORE, K.J., COBLENTZ, W.K., SIEFERS, M.K., WHITE, J.S. Sorghum silage. In: Al-Amoodi, L. (Ed.), **Silage Science and Technology**. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, USA, p. 609–632. 2003.
- CAI, Y., OHMOMO, S. Effect of lactic acid bacteria and cellulose on the changes in microflora during fermentation, gas production and dry matter loss in silage. **Animal Science and Technology**, v.66, p.941-948, 1995.
- CONAB – 2016. Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 20 agosto de 2017.
- DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; SPOELSTRA, S. F. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **Journal Applied Microbiology**, v. 87, p, 583–594. 1999.
- ERWIN, E.S., MARCO, G.J., EMERY, E.M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v.44, p.1768-1771. 1961.
- FERRARETTO, L. F., FREDIN, S. M., SHAVER, R. D. 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**. v. 98, p. 7318–7327. 2015.

- FERRARETTO, L. F., K. TAYSOM, D. TAYSOM, R. D. SHAVER, AND P. C. HOFFMAN. Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia-nitrogen, and ruminal *in vitro* starch digestibility in high-moisture corn samples. **Journal of Dairy Science**. v. 97, p. 3221–3227. 2014.
- FERRARETTO, L. F., P. M. CRUMP., R. D. SHAVER. Effect of cereal grain type and corn grain harvesting and processing methods on intake, digestion and milk production by dairy cows through a meta-analysis. **Journal of Dairy Science**. v. 96, p. 533–550. 2013.
- FILYA, I. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silage. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 3575-3581. 2003.
- HIBBERD, C.A.; WAGNER, D.G.; HINTZ, R.L. Effect of length of reconstitution on the chemical composition and *in vitro* digestibility of sorghum grain. Oklahoma Agricultural Experiment Station, **Animal Science Research Report**, v.5, p.184-188. 1981.
- Disponível:<http://www.beefextension.com/research_reports/research_56_94/rr82/rr82_41.pdf. Acessado em: 15/06/2017.
- HICKS, R.B., LAKE, R. P. High moisture corn quality control at Hitch. In: **CATTLE GRAIN PROCESSING SYMPOSIUM**. Proceedings ...Tulsa: v. 4, p. 56-61. 2006. Disponível em:<http://beefextension.com/new%20site%202/proceedings06.html> . Acesso em 10/01/2017.
- HOFFMAN, P.C., ESSER, N.M., SHAVER, R.D., COBLENTZ, W.K., SCOTT, M.P., BODNAR, A.L., SCHMIDT, R.J. AND CHARLEY, R.C. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 2465-2474. 2011.
- HUCK, G.L., KREIKEMEIER, K.K., BOLSEN, K.K. Effect of reconstituting field-dried and early harvested sorghum grain on the ensiling characteristics of the grain and on growth performance and carcass merit of feedlot heifers. **Journal of Animal Science**, v.77, p. 1074–1081. 1999.
- IGARASI, M.S., ARRIGON, M.B., SOUZA, A.A., SILVEIRA, A.C., MARTINS, C.L., OLIVEIRA, H.N. Desempenho de bovinos jovens alimentados com dietas contendo grão úmido de milho ou sorgo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p. 513-519. 2008.
- JOBIM, C.C.; BRANCO, A.B.; SANTOS, G.T. Silagem de grãos úmidos na Alimentação de bovinos leiteiros. In: SIMPÓSIO GOIANO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE BOVINOS DE CORTE E LEITE, 5., Goiânia. Anais... Goiânia: UEM-Maringá, p.357-376. 2003.
- KLEINSCHMIT, D.H. AND KUNG JR, L. The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 3999-4004. 2006.
- KLEINSCHMIT, D.H; KUNG JR, L. 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**. v. 89, p. 4005-4013. 2006.

- KUNG JR, L. AND DER BEDROSIAN, M. How well do we really understand silage fermentation? Proceedings Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers. October 19-21. Doubletree Hotel East Syracuse, New York. Department of Animal Science at the New York State College of Agriculture and Life Sciences. Cornell University Ithaca, New York, pp: 87-93. 2010.
- KUNG, L. JR., M. C. WINDLE, AND N. WALKER. The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of high moisture corn. **Journal of Dairy Science**. v. 97, p. 1707–1712. 2014.
- MCDONALD, P., HENDERSON, A.R. AND HERON, S.J.E. The biochemistry of silage, 2nd ed. Chalcombe Publications, Marlow, Buckinghamshire, UK. 1991.
- MILLEN, D.D. A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. **Journal of Animal Science**, v.87, p.3427-3439, 2009.
- MUCK, R. E. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 39:183–191. (Supl. Especial). 2010.
- MUCK, R. E., AND K. K. BOLSEN. Silage preservation and silage additive products. Pages 105–126 in Field Guide for Hay and Silage Management in North America. K. K. Bolsen, ed. NFIA, Des Moines, IA. 1991.
- OLIVER, A.L., GRANT, R.J., PEDERSEN, J.F., O'REAR, J. Comparison of brownmidrib-6 and -18 forage sorghum with conventional sorghum and corn silage in diets of lactating dairy cows. **Journal Dairy Science** v. 87, p. 637–644. 2004.
- OSHIMA, M.; MCDONALD, P. A review of the changes in nitrogenous compounds of herbage during ensilage. **Journal Science Food Agriculture**, v.29, p.497-508. 1978.
- OUDE ELFERINK, S. J. W. H., KROONEMAN, J., GOTTSCHAL, J.C., SPOELSTRA, S.F., FABER, F. AND DRIEHUIS, F. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 125-132. 2001.
- PROSTKO, E. P., J. P. MUIR, AND S. R. STOKES. The influence of harvest timing on forage sorghum silage yield and quality. Texas Agric. Exp. Stn., Stephenville, TX. Accessed Ago. 15, 2017. [http:// articlesearchdatabase.tamu.edu](http://articlesearchdatabase.tamu.edu). 1998
- RANJIT, N.K; KUNG JR, L. The Effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a Chemical Preservative on the Fermentation and Aerobic Stability of Corn Silage. **Journal of Dairy Science**. v. 83, p. 526-535. 2000.
- RÉMOND, D.; CABRERA-ESTRADA, J. I.; CHAMPION, M. Effect of corn particle size on site and extent of starch digestion in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, p. 1389–1399. 2004.
- ROMERO, L.A. Ensilaje de soja, calidad en forrajes conservados. Manual de actualización técnica. Merco Láctea, San Francisco, Córdoba, Argentina, p. 40- 41. 2004.

SCHMIDT, R.J., HU, W., MILLS, J.E.A. AND KUNG JR, L. The development of lactic acid bacteria and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation of alfalfa silage. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 5005-5010. 2009.

TABACCO, E., PIANO, S. REVELLO-CHION, A. BORREANI, G. Effect of *Lactobacillus buchneri* LN4637 and *Lactobacillus buchneri* LN40177 on the aerobic stability, fermentation products, and microbial populations of corn silage under farm conditions. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 5589-5598. 2011.

TAYLOR, C. C., KUNGJR, L. The Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the Fermentation and Aerobic Stability of High Moisture Corn in Laboratory Silos. **Journal of Dairy Science**. v. 85, p.1526-1532. 2002.

TSUNECHIRO, A., MARIANO, R.M., MARTINS. V. A. Produção e preços de sorgo no estado de São Paulo, 1991-2001. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1, p.15-24. Disponível em: Acesso em: 23/06/2017. 2002.

ZAFARI. N, S., KHODAMBASHI, N. EMAMI, E., ROWGHANI, S., BAYAT, A. 2014. Influence of ensiling time on chemical composition, fermentation characteristics, gas production and protein fractions of sweet sorghum silage. **Research Animal Veterinary Science**, v. 4, p. 286-293. 2014.

ZEOULA, M, L., MARTINS, A, S., PRADO, I, N., ALCALDE, C, R., BRANCO, A, F., GERALDO TADEU DOS SANTOS, G, T. 1999. Solubilidade e Degradabilidade Ruminal do Amido de Diferentes Alimentos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 28, p. 898-905. 1999.

⑥ *Capítulo 6*

6.1 Efeito do teor e degradabilidade da proteína bruta da dieta sobre o desempenho de vacas leiteiras utilizando silagem de milho reidratado.

6.1.1 Resumo

Foram conduzidos 2 experimentos para investigar o efeito do uso da silagem de milho reidratado em dietas com variação do teor e da degradabilidade da proteína para vacas em terço médio de lactação. No experimento 1 os animais foram alimentados com dietas contendo 130, 160 ou 180 g PB /kg MS, e teor de PDR próximos de 100 g PDR/kg MS para as 3 dietas. No experimento 2 os animais foram alimentados com dietas contendo 160 g PB/kg MS, mas com variação no teor de PDR, sendo o teor de PDR das dietas de 80, 100 ou 120 g PDR/kg MS. Em cada um dos experimentos foram utilizadas 15 vacas da raça Holandesa em (estágio intermediário de lactação, 150 ± 60 dias experimento 1 e estágio final de lactação, 220 ± 60 dias, experimento 2), com peso vivo de 585 ± 40 kg, distribuídas em quadrado latino com 5 quadrados contemporâneos 3 a 3 com 3 períodos de 21 dias e 3 tratamentos. As variáveis avaliadas para os dois experimentos foram: consumo de nutrientes, digestibilidade aparente total, produção e composição do leite, parâmetros fermentativos do rúmen e balanço de N. No experimento 1, aumentar o teor de PB de 130 para 180 g PB/kg MS incrementou linearmente o consumo de matéria seca (2,32 kg) e o consumo de PB (1,22 kg), também foi observada aumento linear da produção de leite (2,67 L/vaca/dia), gordura, proteína, lactose, caseína e sólidos totais. O coeficiente de digestibilidade da MS, PB e a concentração de N-NH₃ no rúmen, excreção de nitrogênio no leite, fezes e urina aumentou linearmente quando o teor de PB da dieta foi de 130 para 180g PB/kg MS, entretendo não foi observado efeito sobre a concentração de AGCC no rúmen. No experimento 2, o aumento no teor de PDR de 80 para 120 g PDR/kg MS, reduziu o consumo de matéria seca (1,36 kg), a produção de leite (2,54 L/vaca/dia), o teor de proteína, caseína, lactose e sólidos totais. A variação no teor de PDR não influenciou coeficiente de digestibilidade aparente total da MS e da PB, mas o aumento do teor de PDR de 80 para 120 g PDR/Kg MS reduziu o coeficiente de digestibilidade do FDN, FDA e EE e também reduziu a concentração de ácido acético e ácido propiônico no rúmen. O aumento do teor de PB assim como o aumento do teor de

PDR das dietas experimentais, aumentou linearmente a concentração de N-NH_3 no líquido ruminal. O aumento o teor de PDR de 80 para 120g de PDR/kg PB aumentou a excreção de nitrogênio no leite e urina, mas reduziu a excreção de N nas fezes. Já o aumento do teor de PB da dieta de 130 para 180 g PB/kg MS aumentou a excreção de nitrogênio na urina, no leite e nas fezes. Reduzir o teor de PB de 180 para 130 g de PB/kg MS ou aumentar o teor de PDR de 80 para 120 g PDR/kg PB reduziram o consumo de MS, produção de leite e sólidos do leite.

Palavras chave: amido, proteína, silagem, milho reidratado

6.1.2 Introdução

Nos sistemas tradicionais de alimentação de vacas leiteiras, uma grande porcentagem de proteína da dieta não é eficazmente utilizada, causando uma considerável quantia de N excretado nas fezes e urina, causando prejuízos ambientais e econômicos a atividade (MUTSVANGWA et al., 2016). O N excretado pelos ruminantes pode ser convertido em múltiplas formas no ambiente, tais como amônia, um importante poluente do ar; N_2O , um gás com potencial de causar o efeito de estufa; e nitrato, um poluente da água (KEBREAB et al., 2001). Variações consideráveis nos níveis de excreção de N através da manipulação dietética em ruminantes indicam o potencial para redução da excreção do N para o ambiente (CASTILLO et al., 2000). Vacas alimentadas com quantidades de PB maiores que 180 g PB/kg MS geralmente conseguem maximizar a produção de leite (NRC, 2001), mas acabam reduzindo a quantidade de nitrogênio destinado para o leite, e aumentando quantidade de nitrogênio excretado nas fezes e urina (COLMENERO & BRODERICK, 2006; RIUS et al., 2012). Alguns estudos indicam que dietas com menores teores de PB ou PDR podem não causar efeitos negativos sobre a produção de leite (KALSCHEUR et al., 2006; WANG et al., 2007; RIUS et al., 2010). Estudos prévios demonstraram que o aumento na eficiência do uso do N, reduziu a excreção urinária de N, como resultado da redução dos níveis de proteína da dieta (CASTILLO et al., 2000; BURKE et al., 2008). O aumento da eficiência do uso de N dietético pode estar ligado a digestibilidade de outros componentes da dieta, tais como o milho. A deficiência de digestibilidade do amido no rúmen pode levar a falta de substrato

para o crescimento bacteriano no fluido ruminal, reduzindo o uso do N, principalmente o de origem amoniacal. A silagem de milho reidratado vem surgindo no Brasil como uma alternativa para aumentar a digestibilidade do amido e da proteína dos grãos de milho. Esta técnica tem se mostrado capaz de suportar produções de leite superiores a 30 litros/vaca/dia quando foi usado em dietas com silagem de cana de açúcar com 160 g PB/kg/ MS (ARCARI et al., 2016b). No entanto, informações sobre dietas com redução dos níveis de PB ou aumento da degradabilidade do N, são limitadas para dietas utilizando silagem de milho reidratado, uma vez que tradicionalmente os estudos com este foco utilizaram silagem de grãos úmidos ou milho moído seco. Nossa hipótese é de que reduções dos níveis de proteína bruta ou aumento da degradabilidade do N em dietas silagem de milho reidratado podem não prejudicar o desempenho e composição do leite de vacas em terço médio de lactação devido ao aumento da digestibilidade do amido e da proteína presentes na silagem. Deste modo o objetivo do presente estudo foi: (1) para investigar os efeitos da variação do teor de PB sobre os níveis de produção de leite em combinação com parâmetros de consumo e digestibilidade aparente da dieta, além do particionamento do N excretado (2) investigar os efeitos da variação da degradabilidade da PB da dieta sobre os níveis de produção de leite em combinação com parâmetros de consumo e digestibilidade da dieta e particionamento do N.

6.1.3 Material e Métodos

6.1.4 Dietas e Manejo alimentar

Em cada um dos experimentos foram utilizadas 15 vacas da raça Holandesa em (estágio intermediário de lactação, 150 ± 60 dias experimento 1 e estágio final de lactação, 220 ± 60 dias, experimento 2), com peso vivo de 585 ± 40 kg e produção média de $30 (\pm 4.13)$ Kg/dia. As vacas foram alojadas em baias individuais (16 m^2), com controle individual de consumo de alimentos e regime de duas ordenhas (07:00 a.m e 16:00 p.m). As vacas foram selecionadas com base no bom estado de saúde, produção de leite, peso corporal, ordem de partos. Foi utilizado delineamento em quadrado latino com total de 5 quadrados contemporâneos 3 períodos de 21 dias e 3 tratamentos. As coletas de amostras para análises ocorreram durante os 7 últimos dias de cada período experimental, durante

o qual foram mensurados e analisados o consumo de matéria seca e nutrientes, produção de leite (PL) e composição do leite, digestibilidade aparente total dos nutrientes, composição da dieta e parâmetros ruminais. No experimento 1 as dietas foram formuladas para serem isoenergéticas, mas com teores de PB diferenciados (130, 160 e 180 g PB /kg MS mantendo a relação PDR: PNDR e a proteína metabolizável (PM) similar entre as dietas experimentais). No experimento 2 as dietas foram formuladas para serem isoenergéticas e isoproteicas mas com variação no teor de proteína degradável no rúmen (PDR) da dieta (80, 100 e 120g PDR/ kg MS). As dietas foram formuladas usando silagem de cana-de-açúcar como volumoso, farelo de soja, ureia, grão de milho moído reidratado e ensilado, farelo de glúten de milho, suplemento mineral e vitamínico. As composições das dietas de ambos os experimentos se encontram listada na tabela 8.

Tabela 8- Ingredientes e composição química das dietas experimentais.

	Experimento 1			Experimento 2		
	g PB/kg MS			g PDR/kg MS		
	130	160	180	80	100	120
g/kg MS						
SCA ^a	399	400,86	400,68	400,52	402,32	399,88
SMR ^b	444,21	388,70	320,52	358,53	387,22	429,42
Farelo de Soja	89,92	120,86	180,53	120,20	120,86	120
FGM	21,20	40,49	50,52	85	40,41	-
Uréia	6,74	8,81	8	-	8,8	17,99
Mistura Mineral ^c	22,25	24,93	23,21	21	24,93	22,36
Sulfato de Amônio	1	1	1	1,63	1	1,78
Bicarbonato de Sódio	10	8,85	10	8	8,81	8,51
Oxido de Magnésio	1,62	1,63	1,63	1,46	1,62	1,57
Fosfato Bi cálcico	2,17	2,13	2,11	2,41	2,12	2,61
Cloreto de Sódio	2,14	2,11	2,13	1,42	2,15	1,58
Composição Química g/kg MS						
Matéria Seca	434,41	439,62	435,62	470,87	470,42	470,31
EL _L (Mcal/kg) ^d	1,56	1,58	1,57	1,58	1,55	1,53
Matéria Mineral	66,28	62,31	67,64	62,11	60,53	63,22
Proteína Bruta	132	161	187	163,17	162,85	163,27
Amido	306,42	268,26	221,12	247,32	267,12	272,32
Extrato Etéreo	29	27	25	27	27	28
FDN ^e	320	327	329	328	327	325
FDA ^f	199	204	207	206	204	203
Lignina	30	29	28	31	30	32
PDR ^g	82	100	116	80	100	120
PNDR ^g	50	61	71	83,14	62,8	43,2

^a SCA: Silagem de cana-de-açúcar; ^b SMR: Silagem de milho reidratado = milho com tamanho médio de particular de 1,681µm ensilado com teor de MS de 65% por 100 dias antes de ser fornecido aos animais. ^c composição por Kg de produto: cálcio – 190 g, fósforo – 73 g, enxofre – 30 g, magnésio – 44 g, cobre – 340 mg, zinco – 1350 mg, manganês – 940 mg, cobalto – 3 mg, iodo – 16 mg, selênio – 10 mg, ferro – 1064 mg, vitamina A - 100.000 IU, vitamina D - 40.000 IU, vitamina E - 600 IU; EL_L a partir do NRC (2001) ^eFDN = fibra em detergente neutro ^fFDA = fibra em detergente ácido ^gPDR = proteína degradável no rúmen; PNDR = proteína não degradável no rúmen estimado a partir do NRC (2001).

A variedade de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) IAC86-2480 (IAC / APTA, São Paulo, Brasil) foi colhida e cortada mecanicamente (Premiun Flex[®] Menta Máquinas Agrícolas, Cajuru, São Paulo, Brasil) resultando em uma média de tamanho de partícula de 15,6 mm (LAMMERS et al., 1996). Para confecção da silagem utilizou-se o inoculante

bacteriano (*Lactobacillus buchneri*, Lalsil[®] Cana) na concentração de 2 g/ton, pulverizando uma solução diluída (100g / 50L de água) durante o processo de colheita e picagem do material.

Para a silagem de milho reidratado, antes do processo de ensilagem, foi avaliado o teor de umidade (AOAC, método 1990 - 930.15) (870 g de MS / kg de MS) dos grãos de milho seco (grãos integrais) (DOW 2B710 HX[®] Dow Agrosience, Mogi Mirim -SP, Brasil) Milho) e a vitreosidade (70% $\pm$ 1,6 de endosperma vítreo). A vitreosidade do milho foi determinada por dissecação manual dos grãos (DOMBRINK-KURTZMAN & BIETZ, 1993). Resumidamente, 100 grãos foram selecionados aleatoriamente e separados em 10 grupos visualmente homogêneos com base no tamanho e forma do grão. A vitreosidade foi determinada em um grão aleatoriamente selecionado de cada grupo. Os grãos foram embebidos em água destilada durante 3 minutos, secos com uma toalha de papel, e o pericarpo e o germe foram removidos com auxílio de um bisturi, sendo então posteriormente o endosperma total pesado. O endosperma farinaceo foi então removido manualmente utilizando um bisturi e o peso do endosperma vítreo remanescente foi expresso como uma porcentagem do endosperma total.

O mesmo lote de milho foi moído em um moinho de martelos equipado com uma peneira de 2mm, sendo posteriormente reidratado e inoculado com *Lactobacillus buchneri*, cepa CNCM I-4323, (Lalsil[®] AS-KatecLallemand, Goiânia, Brasil) na concentração de 1 g / ton , por pulverização de uma solução diluída (100 g / 100 L de água). Antes e após o processo de reidratação, foi determinada MS do milho moído (n = 4) para calcular a quantidade de água a ser adicionada ao milho moído para atingir 670 g de MS / kg. A reidratação do milho moído foi realizada em um misturador (UNIMIX 1200[®] Casalle, São Carlos, Brasil) por 10 min. Após a reidratação, o milho foi ensilado em silo tipo trincheira a uma densidade de 800 kg / m³ durante 100 dias, antes de ser fornecido aos animais (ARCARI et al., 2016b).

6.1.5 Coleta de amostras e análises

As amostras de ração, os sobras e ingredientes de ração das dietas foram coletadas nos últimos 7 dias de cada período experimental. As amostras de alimento e os sobras foram coletadas duas vezes por dia, manhã e tarde. Para determinar a ingestão de matéria

seca (MS), foram pesadas as quantidades de dieta e sobras para cada vaca do dia 14 para 21. As vacas foram alimentadas de acordo com a ingestão de MS do dia anterior, a fim de manter sobras diárias entre 5 e 10% da quantidade ofertada. As fezes foram coletadas diretamente do reto três vezes ao dia (0800a.m, 1200a.m, e 1600p.m), durante os últimos 3 dias de cada período experimental, e armazenadas a -20 ° C até a análise química.

Após o descongelamento, as amostras de silagem de cana-de-açúcar, sobras, ingredientes e fezes foram pré-secadas em estufa de ventilação forçada (60°C / 72 horas) e processadas utilizando moinhos com peneiras de porosidade de 1 mm (modelo Marconi, MA 048) : MS (método AOAC, 1990; método 934.01), lignina (método AOAC, 1990 973,18), extrato etéreo (AOAC, 1990; método 920,39) e cinzas (AOAC, 1990); As concentrações de FDN e FDA foram determinadas de acordo com Van Soest et al (1991). O teor de N total foi determinado com base na MS para ensilagem e concentrado e numa base fresca para fezes e urina utilizando Rapid N (Elementar Hanau, Alemanha). A análise por FDN incluiu alfa-amilase estável ao calor, sem sulfito de sódio, utilizando sacos ANKOM F57 num analisador de fibra do sistema Ankon® (Ankom Technology Corp., Fairport, NY). O teor de amido foi determinado de acordo com o método de Ehrman (1996). Os carboidratos não-fibrosos (CNF) foram estimados de acordo com as equações descritas pelo NRC (2001). As amostras de silagem de milho reidratado (SMR) foram analisadas quanto ao pH (AOAC 1990; método 973.49). O tamanho de partícula das amostras secas e SMR (n = 4) foi determinado por peneiramento seco, amostras não moídas utilizando peneiras de aberturas de 2.000, 1.000, 840, 500, 250, 149 e 105 µm mais o fundo. Mediu-se o tamanho de partícula (TMP) utilizando uma distribuição logarítmica normal (BAKER & HERRMAN, 2002) (Tabela 9).

Tabela 9- Composição química do milho seco, silagem de milho reidratado, silagem de cana de açúcar e farelo de soja.

	MSM	SMR	SCA	FS
	<i>Composição química</i>			
MS g/kg	870	670	310.7	875.3
PB g/kg MS	81	82	40	500
PS, % PB	6	33.1	-	-
Amido g/kg MS	693	695	1	40
FDN	16.9	16.8 3	593.1	17.7
FDA	3.3	3.2	460.3	10.5
pH	6.1	3.9	4.09	-
TMP (µm)	-	1.099	-	-

-: não analisado; SCA: silagem de cana de açúcar; FS: farelo de soja; MS: matéria seca; PB: proteína bruta; PS: proteína solúvel; FDA: fibra em detergente ácido; FDN: fibra em detergente neutro; TMP: tamanho médio de partícula.

6.1.6 Coleta de amostras e análises químicas do leite

A produção de leite foi medida diariamente de 14 a 21 dias usando um sistema eletrônico (Delaval, Campinas, Brasil) acoplado ao equipamento de ordenha. Os rendimentos de 3,5% de leite corrigido de gordura (LCG 3,5%) foram calculados de acordo com Sklan et al. (1994), utilizando a fórmula: $3,5\% = [0,432 + (0,1625 \times \text{teor de matéria gorda láctea} \times \text{produção de leite})]$, em kg / dia. As amostras de leite foram coletadas de 16 a 19 dias de cada período, refrigeradas e conservadas com 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol (0,05%, peso / volume) para a determinação da gordura do leite, lactose, sólidos totais), Caseína e concentrações de proteína por absorção no infravermelho (Bentley Instruments, 1995). As análises de nitrogênio ureico com leite foram feitas utilizando um sistema automático baseado no método espectrofotométrico enzimático (ChemSpeck 150[®], Bentley Instruments, Chaska, Minnesota, EUA).

6.1.7 Digestibilidade aparente do trato total, coleta e análise de urina e líquido ruminal

A excreção fecal total de cada vaca foi calculada utilizando fibra indigestível em detergente ácido (FDAi) como marcador interno. As amostras de alimentos individuais

(n = 4), sobras (n = 45) e fezes (n = 45) (15 vacas em 3 períodos) foram secas em forno de ar forçado durante 72 h e trituradas para passar por uma peneira de 1 mm (AH Thomas, Philadelphia, NY) e depois foram colocados em sacos Ankom F57 de 4 cm x 5 cm (20 mg de MS / cm²) que tinham sido previamente pesados. As amostras foram replicadas (n = 4) (400 mg por saco) foram incubadas durante 288 h no rumen de duas vacas Holandesas previamente adaptadas a uma dieta experimental semelhante. Após incubação, os sacos foram removidos e lavados em água corrente, e depois analisados quanto à concentração de FDA como descrito por Van Soest et al. (1991) utilizando Ankom[®] System (Ankom Tech. Corp., Fairport, NY). A digestibilidade aparente do trato total foi calculada utilizando-se a proporção de FDAi na ração (corrigida para sobras) e fezes (ARCARI et al., 2016b). A porcentagem de recuperação utilizada no cálculo da digestibilidade com base no FDAi foi igual a 100.

6.1.8 Análises de fluido ruminal e urina

No último dia de cada período experimental, amostras de líquido ruminal (50 ml / vaca) foram coletadas utilizando tubo esofágico, 3 h após a alimentação matinal. Os primeiros 500 ml de fluido ruminal coletados foram descartados, e imediatamente após a amostragem o pH foi determinado usando um potenciômetro. As amostras de fluido do rúmen foram centrifugadas a 3000 r.p.m. E armazenamento a -20 ° C para determinar as concentrações de amoníaco e ácidos graxos de cadeia curta (SCFA). A concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) do fluido ruminal foi determinada de acordo com a metodologia colorimétrica descrita por Chaney & Marbach (1962). A análise da concentração ruminal de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foi realizada de acordo com Erwin et al. (1961). Um cromatógrafo de gás (GC-2014, Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com uma coluna de vidro (Stabilwax[®], Restek, Bellefonte, PA, EUA, 30 m de comprimento / 0,53 mm de diâmetro interno) a 145 ° C (isotérmico) utilizando um injetor split / splitless, e um detector dual FID a 250 ° C foi usado para estas análises.

Amostras de urina de 100 ml / vaca foram coletadas por massagem vulvar e imediatamente o pH foi determinado usando um potenciômetro e armazenado a -20 ° C. As concentrações de creatinina foram obtidas utilizando kits comerciais (Laborlab[®], Guarulhos-SP, Brasil) e foram calculadas pela seguinte equação: creatinina (mg / dl) =

creatinina (mg / dl) $\times 0,020 \times 50$ (COOPER & BIGGS, 1961). O volume diário total de urina foi estimado dividindo a excreção urinária diária de creatinina pelos valores observados de concentração de creatinina nas amostras de urina, de acordo com Oliveira et al. (2001). A excreção urinária de creatinina foi estimada utilizando a equação $24.05 \text{ mg de creatinina / kg de peso vivo}$ proposta por Chizzotti et al. (2007).

6.1.9 Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo programa computacional Statistical Analysis System® (SAS, 2001), após verificação da normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias pelo Proc-UNIVARIATE. Os dados foram analisados de acordo com os efeitos principais dos tratamentos, pelo comando Proc-MIXED do SAS, adotando-se nível de significância de 0,05, de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + Q_j + A(Q)k + Pl + e_{ijkl},$$

em que Y_{ijkl} = é o valor observado; μ = média geral; T_i = efeito fixo de tratamento i , ; Q_j = efeito fixo do quadrado latino j , $j = 1$ a 3 ; $A(Q)k$ = efeito aleatório do animal k dentro de cada quadrado latino, $k = 1$ a 15 ; Pl = efeito fixo do período l , $l = 1$ a 3 ; e_{ijkl} = erro aleatório associado a cada observação. Os graus de liberdade serão calculados de acordo com o método Satterthwaite (DDFM = Satterth).

6.1.10 Resultados

6.1.11 Consumo de nutrientes e digestibilidade aparente total

No presente estudo (experimento 1), o consumo de matéria seca (CMS), foi maior ($P=0,05$), para as vacas que receberam dietas com 160 e 180 g de PB/kg MS em comparação com animais alimentados com dieta contendo 130 g PB/kg MS., Entretanto

as dietas com 160 e 180 g PB/Kg MS não apresentaram diferença entre si ($P>0,05$) para o consumo de MS. No experimento 2 quando as vacas receberam dietas contendo 160 g PB/kg MS, mas com 80 ou 100 g de PDR/kg MS o CMS foi maior ($P=0,04$) em comparação aos animais que receberam dieta contendo 120 g PDR/kg MS, não sendo observada diferença para consumo entre as dietas com 80 e 100 g PDR/kg MS (Tabela 10). No experimento 1, o consumo de proteína (CPB) apresentou efeito linear ($P<0,01$) em relação ao aumento do teor de PB na dieta, sendo que os animais que receberam dietas com maior teor de proteína apresentaram maior consumo de PB total. Já para o consumo de amido (CA) houve redução linear do consumo ($P<0,01$) a medida que foi aumentado o teor de PB na dieta. Já para o experimento 2, a medida que foi aumentado o teor de PDR na dieta foi observado aumento linear ($P<0,01$) no consumo de amido. O consumo de fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido (CFDN e CFDA) também apresentaram comportamento linear crescente ($P<0,01$) em relação ao aumento do teor de PB na dieta. Os animais que receberam a dieta com teor mais elevado de PB apresentaram maior consumo para o consumo de FDA e FDN. No experimento 2, a redução do nível de PDR na dieta aumentou o consumo CFDN e o CFDA, sem que fosse observada diferença para as dietas com 80 e 100 g PDR/kg MS.

No experimento 1 o coeficiente de digestibilidade para matéria seca (CDMS) ($P=0,01$) e proteína bruta dietética (CDPB) ($P<0,01$) foram maiores para os animais alimentados com o maior teor de PB (160 e 180 g PB/kg MS) (Tabela 10). No experimento 2 o coeficiente de digestibilidade do FDN, FDA e EE apresentaram efeito quadrático, sendo o maior valor observado para os animais alimentados com a dieta com nível intermediário de PDR (100 g PDR/kg MS) (Tabela 10).

Tabela 10 - Consumo de nutrientes em relação ao teor e degradabilidade da proteína da dieta.

	g PB/kg MS			P			g PDR/kg MS			P		
	130	160	180	EPM	L	Q	80	100	120	EPM	L	Q
<i>Consumo de Nutrientes (kg)</i>												
MS	18,91 ^b	20,47 ^a	21,23 ^a	0,5	0,05	0,06	19,91 ^a	20,47 ^a	19,11 ^b	0,44	0,13	0,04
MO	17,97 ^b	19,09 ^a	19,95 ^a	0,47	0,02	0,07	18,87 ^a	19,45 ^a	18,28 ^b	0,41	0,24	0,05
PB	2,02 ^c	2,93 ^b	3,24 ^a	0,1	<0,01	0,21	3,18	3,28	3,04	0,07	0,21	0,52
Amido	6,02 ^a	5,63 ^b	4,70 ^c	0,15	<0,01	0,06	5,51 ^c	5,76 ^b	6,07 ^a	0,12	<0,01	0,83
FDN	5,68 ^b	6,20 ^a	6,30 ^a	0,15	<0,01	0,41	5,97 ^a	6,02 ^a	5,58 ^b	0,13	0,03	0,10
EE	0,449	0,55	0,551	0,01	0,07	0,32	0,609 ^a	0,621 ^a	0,563 ^b	0,01	0,24	<0,01
FDA	4,20 ^c	4,54 ^a	4,63 ^a	0,11	<0,01	0,05	4,70 ^a	4,72 ^a	4,37 ^b	0,1	0,01	0,11
<i>Coefficiente de Digestibilidade Aparente Total</i>												
MS	0,684 ^b	0,685 ^b	0,701 ^a	0,33	0,01	0,18	0,678	0,694	0,670	0,6	0,59	0,08
MO	0,71	0,711	0,716	0,29	0,06	0,28	0,705	0,719	0,701	0,54	0,79	0,12
PB	0,800 ^b	0,802 ^b	0,833 ^a	0,65	<0,01	0,8	0,840	0,835	0,826	0,59	0,39	0,93
Amido	0,98	0,979	0,981	0,13	0,21	0,62	0,976	0,979	0,977	0,13	0,65	0,24
FDN	0,405	0,390	0,423	0,92	0,34	0,16	0,390 ^b	0,420 ^a	0,344 ^c	1,32	0,75	0,01
EE	0,678	0,671	0,677	1,62	0,81	0,43	0,727 ^a	0,778 ^a	0,657 ^c	1,35	0,67	<0,01
FDA	0,437	0,429	0,457	0,78	0,19	0,16	0,453 ^b	0,487 ^a	0,411 ^c	1,2	0,87	<0,01

MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; EE: extrato etéreo; FDA: fibra em detergente neutro; L= linear; Q= quadrático; EPM= Erro padrão da média;

6.1.12 Produção e composição do leite

No experimento 1 a produção de leite (Pl) apresentou comportamento linear ($P < 0,01$) apresentando maior produção de leite a medida que o teor de proteína da dieta foi aumentada. A Pl foi 2,67 e 2,23 litros/vaca/dia maior para os animais alimentados com 180 e 160 g PB/kg MS, respectivamente, em comparação com os animais alimentados com 130g PB/kg MS de PB na dieta. A produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (PLCG 3,5%) também apresentou comportamento linear ($P < 0,01$) em relação ao aumento do teor de PB da dieta. A PLCG 3,5% foi 2,73 e 3,56 L/vaca/dia maior ($P < 0,01$) para os animais alimentados com 160 e 180 g PB/kg MS na dieta respectivamente quando comparado aos animais que receberam dieta com 130 g de PB/kg MS. No experimento 2 a produção de leite apresentou comportamento quadrático a medida que o nível de PDR foi diminuído na dieta. A dieta com nível intermediário de PDR (100 g PDR/kg MS) aumentou 2,54 litros de leite a produção quando comparada a dieta com alta PDR (120g

PDR/kg MS), entretanto não houve diferença significativa de produção de leite entre a dieta com 80 e 100 g PDR/kg/MS. A produção de leite corrigida para gordura apresentou o mesmo comportamento que a produção de leite uma vez que não houve efeito das dietas sobre o teor de gordura do leite.

No experimento 1 o teor de gordura do leite apresentou comportamento linear ($P < 0,04$) em relação ao aumento do teor de PB da dieta. Os animais alimentados com teores de PB 160 e 180 g PB/kg MS apresentaram 0,11 e 0,18 pontos percentuais, respectivamente, a mais no teor de gordura em relação aos animais que receberam dieta com 130 g de PB/kg MS. Ainda no mesmo experimento, o teor de PB do leite também apresentou comportamento linear ($P = 0,02$) à medida que o teor de PB da dieta foi aumentado. Não houve diferença estatística para o teor de PB do leite entre os animais que receberam 160 e 180 g PB/ kg MS na dieta, mas esses dois grupos diferiram significativamente dos animais que receberam dieta com 130 g de PB/kg MS. Já para o experimento 1 o teor de sólidos totais (ST) do leite foi outro dos parâmetros mensurados que aumentou sua concentração de forma linear ($P = 0,01$). O teor de ST foi aumentado a medida que o teor de PB foi elevado, sendo encontrado valores estatisticamente iguais de ST para os animais recebendo dieta contendo 16 e 18% de PB, mas que foram maiores que os animais recebendo dietas com 130 g PB/kg MS. O percentual que a caseína representa em relação a proteína bruta do leite (PCAS) foi linear ($P < 0,01$) em relação ao incremento do teor de PB das dietas. O PCAS foi diretamente afetado pelo teor de caseína no leite. A concentração de caseína teve um comportamento linear dos dados ($P=0,04$), apresentando aumento do teor de caseína a medida que o teor de PB da dieta foi aumentado. O teor de lactose apresentou efeito linear ($P < 0,01$) crescente em relação ao aumento do teor de PB na dieta. A concentração de nitrogênio ureico (NU) aumentou de forma linear ($P < 0,01$) a medida que o teor de PB da dieta foi aumentado. A concentração de NU no leite dos animais que receberam dieta com 160 e 180 g PB/kg MS foi 5 e 6,24 ml/dl respectivamente maior que os animais que receberam dieta contendo 130 g PB/kg MS.

A produção de gordura ($P < 0,01$), proteína ($P < 0,01$), lactose ($P < 0,01$), caseína ($P < 0,01$) e ST ($P < 0,01$) (Kg/vaca/dia) foram aumentadas linearmente em relação ao aumento do teor de PB da dieta, sendo as maiores produções diárias alcançadas com a dieta de 18% de PB. Com exceção do teor de caseína, PCAS e produção de caseína as

demais variáveis não apresentaram diferença estatística entre as dietas com 160 e 180 g PB/kg MS mas apresentaram diferença para a dieta com 130 g de PB/kg MS.

Tabela 11 - Efeito do teor e degradabilidade da proteína da dieta sobre a produção e composição do leite.

	g PB/kg MS			P			g PDR/kg MS			P		
	130	160	180	EPM	L	Q	80	100	120	EPM	L	Q
<i>Kg/vaca/dia</i>												
PI	27,65 ^b	29,88 ^a	30,32 ^a	0,66	<0,01	0,13	27,50 ^a	28,02 ^a	25,48 ^b	0,54	<0,01	<0,01
PLCG 3.5%	27,90 ^b	30,63 ^a	31,46 ^a	0,77	<0,01	0,2	28,35 ^a	29,48 ^a	26,21 ^b	0,87	0,02	<0,01
<i>g/100g</i>												
Gordura	3,53 ^b	3,67 ^a	3,71 ^a	0,06	0,04	0,75	3,66	3,74	3,64	0,11	0,91	0,52
Proteína	2,82 ^b	2,87 ^a	2,91 ^a	0,03	0,02	0,83	2,93 ^a	2,98 ^a	2,82 ^c	0,03	<0,01	<0,01
Lactose	4,46 ^b	4,48 ^a	4,52 ^a	0,03	<0,01	0,64	4,42 ^a	4,40 ^a	4,37 ^b	0,03	0,03	0,98
ST	11,91 ^b	12,24 ^a	12,23 ^a	0,11	0,01	0,1	12,15 ^a	12,21 ^a	11,98 ^b	0,15	0,36	0,36
Caseína	2,08 ^c	2,17 ^b	2,32 ^a	0,02	<0,01	0,04	2,22 ^a	2,25 ^a	2,13 ^c	0,03	<0,01	<0,01
PCAS	73,78 ^c	75,61 ^b	79,88 ^a	0,8	<0,01	0,15	75,87 ^a	76,05 ^a	75,37 ^b	0,23	0,21	0,03
<i>mg/dl</i>												
NU	12,71 ^c	17,44 ^b	18,95 ^a	0,55	<0,01	0,32	15,04 ^b	16,30 ^b	19,15 ^a	0,38	<0,01	0,57
<i>Kg/vaca/dia</i>												
Gordura	0,98 ^b	1,08 ^a	1,12 ^a	0,03	<0,01	0,28	1,01 ^a	1,06 ^a	0,93 ^b	0,04	0,12	0,03
Proteína	0,78 ^b	0,85 ^a	0,88 ^a	0,02	<0,01	0,1	0,80 ^a	0,83 ^a	0,71 ^b	0,01	<0,01	<0,01
Lactose	1,23 ^b	1,35 ^a	1,37 ^a	0,03	<0,01	0,03	1,21 ^a	1,23 ^a	1,11 ^b	0,02	<0,01	<0,01
Caseína	0,57 ^c	0,64 ^b	0,70 ^a	0,01	<0,01	0,47	0,61 ^a	0,63 ^a	0,54 ^b	0,01	<0,01	<0,01
ST	3,30 ^b	3,66 ^a	3,71 ^a	0,09	<0,01	0,06	3,34 ^b	3,44 ^a	3,06 ^c	0,09	<0,01	<0,01

PI: produção de leite; PLCG 3.5%: produção de leite corrigida para 3.5% de gordura; ST: sólidos totais; NU: nitrogênio ureico; L: linear; Q: quadrático; EPM: erro padrão da média.

6.1.13 Produção de Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC), N-NH₃ e pH ruminal

As coletas de líquido ruminal para mensuração de pH e concentração de AGCC foram realizadas 3 horas após a alimentação matinal dos animais. A concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) foi significativamente afetada pelas dietas fornecidas aos animais. As concentrações de ácido acético e ácido propionico tenderam ao efeito em relação a dieta fornecida aos animais. Os demais parâmetros não foram influenciados pelos tratamentos. A concentração de N-NH₃ apresentou um forte efeito linear crescente ($P < 0.01$) em relação ao aumento no teor de proteína da dieta. A dieta com maior teor de PB apresentou um aumento maior que 100% na concentração de nitrogênio amoniacal

em relação a dieta com menor teor de PB. As concentrações de ácido acético e ácido propiônico apresentaram tendência para efeito linear ($P=0.08$ e $P=0.09$ respectivamente).

Tabela 12 - Médias ajustadas para o efeito do teor e degradabilidade da proteína sobre a fermentação ruminal.

	g PB/Kg MS			P			g PDR/ kg MS			P		
	130	160	180	EPM	L	Q	80	100	120	EPM	L	Q
pH	6,54	6,59	6,61	0,22	0,33	0,88	6,46 ^b	6,27 ^c	6,53 ^a	0,04	0,39	<0,01
	mmol/L											
Ac. Acético	45,43	45,97	49,44	1,15	0,08	0,45	51,54 ^a	53,03 ^a	48,23 ^b	1,31	0,05	0,52
Ac. Propiônico	15,49	14,71	13,72	0,44	0,09	0,9	17,08 ^b	20,52 ^a	16,45 ^b	0,97	0,74	0,03
Ac. Butírico	11,78	11,2	11,61	0,35	0,84	0,52	13,02	12,76	11,4	0,54	0,15	0,56
Ac Iso-butírico	0,91	0,87	0,84	0,03	0,51	0,9	1,09	0,95	0,93	0,03	0,07	0,38
Ac. Valérico	1,34	1,27	1,24	0,03	0,23	0,77	1,58	1,55	1,58	0,09	0,06	0,32
Ac. Iso-valérico	1,82	1,79	1,68	0,06	0,35	0,79	2,13	2,08	2,17	0,07	0,85	0,67
	mg/dl											
N-NH ₃	12,12 ^c	18,22 ^b	26,34 ^a	1,2	<0,01	0,52	11,53 ^c	18,04 ^b	27,53 ^a	1,86	<0,01	0,56

L= linear; Q= quadrático; EPM= Erro padrão da média. N-NH₃: nitrogênio amoniacal.

6.1.14 Determinação do Balanço de nitrogênio e eficiência do uso de nitrogênio para o leite.

Na avaliação do balanço de nitrogênio o nitrogênio total ingerido (NI), nitrogênio excretado nas fezes (NF), nitrogênio excretado na urina (NU), nitrogênio excretado no leite (NL), nitrogênio total excretado (NT), balanço, e o percentual do nitrogênio ingerido destinado ao leite, fezes e urina foram significativamente influenciados pelas dietas aplicadas. O NI (g/dia) apresentou um comportamento linear ($P<0,01$) em relação ao aumento do teor de PB na dieta. As vacas alimentadas com dieta contendo 180 g PB/Kg MS consumiram cerca de 200 g de N a mais que os animais alimentados com dieta contendo 13% PB/Kg MS. O NEF apresentou comportamento linear ($P=0.03$), sendo que os animais alimentados com valor mais elevado de PB excretaram maior quantidade de nitrogênio nas fezes. Para a excreção de NU os comportamentos dos dados também foram lineares ($P<0.01$) com aumento da excreção de N a medida que o teor de N da dieta aumentou. Para o NL o comportamento dos dados também foi linear ($P<0,01$) em relação ao aumento do teor de PB da dieta. Os animais alimentados com maiores teores de

proteína excretaram maior quantidade de nitrogênio na forma de proteína láctea e nitrogênio ureico. O NT apresentou-se com efeito linear ($P<0.01$) com maior excreção total para as vacas que receberam dieta contendo maior teor de PB. Para os dados de balanço de nitrogênio o comportamento dos dados também foi linear ($P<0.01$) em relação ao aumento no teor de PB na dieta.

O percentual do NI destinado as 3 possíveis vias de excreção de nitrogênio apresentou comportamento linear decrescente ($P<0.01$) em relação ao aumento do teor de PB na dieta para o N excretado no leite e nas fezes. Já para o percentual do N ingerido que foi excretado na urina, os dados apresentaram comportamento quadrático ($P=0.02$), com elevação da excreção para os animais que receberam teor intermediário de PB na dieta.

Tabela 13 Médias ajustadas para balanço de nitrogênio em relação ao teor e degradabilidade da proteína da dieta.

	g PB/kg MS			P			g PDR/ kg MS			P		
	130	160	180	EPM	L	Q	80	100	120	EPM	L	Q
NI g/dia	324,34 ^c	469,99 ^b	519,31 ^a	16,15	<0,01	0,56	508,81 ^b	524,8 ^a	489,21 ^c	11,76	0,57	<0,01
NF g/dia	75,11 ^c	86,67 ^b	92,07 ^a	3,01	0,03	0,06	84,18 ^a	76,84 ^b	71,54 ^b	2,72	0,05	0,85
NU g/dia	114,10 ^c	180,02 ^b	184,02 ^a	8,05	<0,01	0,08	167,25 ^c	175,69 ^b	204,36 ^a	16,59	0,04	0,49
NL g/dia	122,84 ^c	134,76 ^b	138,03 ^a	3,23	<0,01	0,1	126,3 ^b	131,41 ^a	112,57 ^c	3,02	0,12	<0,01
NT g/dia	312,05 ^c	401,45 ^b	414,12 ^a	12,61	<0,01	0,13	377,73 ^c	383,94 ^b	388,47 ^a	18,68	<0,01	0,73
Balanço	12,29 ^c	66,54 ^b	105,19 ^a	8,99	<0,01	0,76	131,08 ^b	140,86 ^a	100,74 ^c	16,81	0,19	0,02
% do N ingerido												
Proteína leite	37,87 ^a	28,67 ^b	26,57 ^b	0,93	<0,01	0,09	24,82 ^a	25,04 ^a	23,0 ^b	0,43	<0,01	<0,01
Fezes	23,15 ^a	18,44 ^b	17,72 ^b	0,65	<0,01	0,8	16,54 ^a	14,64 ^b	14,62 ^b	0,59	0,03	0,93
Urina	35,17 ^b	38,30 ^a	35,43 ^b	1,14	0,93	0,02	32,87 ^b	33,47 ^b	41,77 ^a	1,04	<0,01	0,4

L= linear; Q= quadrático; EPM= Erro padrão da média.

6.1.15 Discussão

No presente estudo a ingestão de MS e a produção de leite aumentaram de forma linear a medida que o teor de PB da dieta aumentou, e reduziram de forma quadrática quando o teor de PDR da dieta foi aumentada. Entre os fatores que afetam o consumo de matéria seca pelos bovinos está a deficiência de nitrogênio ruminal, na forma de amônia, aminoácidos ou peptídeos, por resultar em menor crescimento da microbiota ruminal

(SNIFFEN et al., 1992). Com o menor crescimento microbiano, ocorre diminuição na digestão da parede celular dos alimentos e consequentemente redução no consumo (WILSON & KENNEDY, 1996). Embora a produção de proteína microbiana no rúmen não tenha sido medida nos presentes estudos, menores concentrações de N poderiam ser esperadas no ambiente ruminal, e consequentemente menor multiplicação microbiana, quando foram fornecidas dietas com baixo teor de PB. Mas não quando foi fornecida dieta com alta degradabilidade ruminal da proteína. Entretanto, quando a proteína está na dieta em quantidade insuficiente ou é degradada acima da capacidade de utilização da microbiota do rúmen, ela pode ser absorvida para a corrente sanguínea, deixando de estar presente no rúmen. De modo semelhante aos resultados observados no presente estudo, aumento de CMS linear foi também observada por Ipharraguerre & Clark (2005) e Olomos Colmenero & Broderick (2006a) ao estudarem níveis crescentes de PB na dieta de vacas leiteiras. Para vacas em final de lactação o aumento do teor de PB na dieta de 12.6 para 14.2% também aumentou a ingestão de MS (KALSCHEUR et al., 1999). Pereira et al. (2005b), entretanto, não observaram efeito no consumo de MS em vacas de produção de leite de 20kg/dia e 110 dias de lactação quando o nível de PB foi elevado de 11,3 para 14,4% da MS da dieta. Os resultados variáveis no aumento do consumo de MS podem se dever a um melhor aporte de compostos nitrogenados no rúmen ou a características ligadas a outros ingredientes da dieta. Características intrínsecas da dieta podem proporcionar maior crescimento dos microrganismos fibrolíticos, resultando no aumento na degradação da fibra e consequentemente na taxa de passagem da dieta pelo rúmen. Colmenero & Broderick (2006b) observaram aumentos da atividade celulolítica no rúmen, indicada por aumento na concentração de acetato, quando forneceram dietas com níveis crescentes de PB para vacas leiteiras. Embora tenha sido observado apenas uma tendência ao aumento linear da concentração de acetato no fluido ruminal para o aumento do teor de PB na dieta, quando a degradabilidade proteína da dieta foi aumentada a concentração de acetato reduziu. O aumento da degradabilidade da proteína reduziu a digestibilidade do FDN o que poderia ser sugerido como a explicação para a redução da concentração de acetato no rúmen para este tipo de dieta. As variações de acetato observadas no presente estudo podem sugerir menor atividade celulolítica no rúmen, o que poderia explicar a redução de consumo e consequentemente da produção de leite para vacas alimentadas com dietas de alta degradabilidade da PB.

A ausência de efeito sobre o CMS também é descrita para dietas com elevado teor de PDR (KALSCHEUR et al., 2006). Entretanto de acordo com Broderick & Reynal.

(2009) ao estudarem dietas de vacas leiteiras com 10.5% de PDR fornecido por meio da inclusão de ureia, o aumento da PDR a partir do uso de ureia causou redução linear no CMS. Foi observado ainda redução da produção de leite e de seus componentes (gordura, proteína e sólidos não gordurosos), assim como aumento na excreção de N ureico na urina e no leite, semelhante aos resultados observados no presente estudo, o qual também aumentou os níveis de PDR a partir da inclusão de ureia. O menor consumo de MS no presente estudo foi provavelmente causado pelos efeitos metabólicos da ureia e, ou, a redução da palatabilidade do alimento à medida que se elevou o teor de ureia na ração, conforme Huber & Cook (1972), que atribuíram a redução no consumo em dietas com alto nível de ureia no concentrado (1 a 3%) à pouca palatabilidade desta, e não a efeitos ruminais ou pós-ruminais.

Os aumentos lineares na produção de leite, leite corrigido para gordura e de sólidos do leite observado com o aumento no teor de PB no presente estudo, provavelmente sejam causados pelo maior consumo de MS e PB. Assim como a redução da produção de leite, leite corrigido para gordura e sólidos não gordurosos para a dieta com alta PDR possivelmente se devam a redução no consumo de MS. O aporte de proteína possivelmente resultou em interferência na síntese de proteína microbiana alterando o fluxo de proteína de alto valor biológico para o intestino delgado. Este tipo de proteína disponibilizada à glândula mamária na maioria das vezes possui um perfil de aminoácidos mais adequado a síntese de proteína do leite. Aumento linear da produção de leite e produção de leite corrigido para 3,5% de gordura de gordura e proteína do leite também foram observados por Broderick (2003) quando foram testadas dietas crescentes de PB (15,1; 16,7 e 18,4%). Pereira et al. (2005a), ao trabalharem com vacas no terço médio da lactação, também observaram resultados crescentes na produção de leite corrigido para 3,5% de gordura, na produção de gordura e proteína, mas não encontraram efeito na produção de leite sem correção e nas porcentagens de proteína e gordura, quando utilizaram dietas com níveis crescentes de PB (11,3; 12,3; 13,3 e 14,4%).

O aumento linear na digestibilidade aparente total da PB, observado para o aumento do teor de PB na dieta, pode estar relacionado com o efeito da diluição do nitrogênio metabólico fecal (BRODERICK, 2003; PEREIRA et al., 2005a; COLMENERO & BRODERICK, 2006b). Em vários trabalhos, foram demonstrados aumentos nas digestibilidades de MS, MO, PB e FDN com aumentos nos níveis de PB na dieta (BRODERICK, 2003; PEREIRA et al., 2005b; COLMENERO & BRODERICK, 2006a), sendo relacionados ao maior suprimento de nitrogênio ruminal, o qual é essencial

para o atendimento das exigências dos microrganismos que degradam a fibra do alimento, proporcionando aumento do consumo, da taxa de passagem e do aproveitamento dos nutrientes. Entretanto no presente trabalho houve um aumento apenas numérico para a digestibilidade do FDN, com o aumento do teor de PB da dieta, o que possivelmente pode ser atribuído as características da fibra da silagem de cana de açúcar que possui menor digestibilidade do FDN (OLIVEIRA et al 2011). Além disso, foi observado que o aumento do teor de PB na dieta reduziu o consumo total de amido, entretanto este fato ocorreu devido a questões intrínsecas a formulação da dieta. O aumento da participação de amido oriundo de silagem de milho reidratado, sugerido por Arcari et al. (2016a) como de alta digestibilidade ruminal, na dieta poderia prejudicar a atividade das bactérias celulolíticas devido a redução do pH, reduzindo a digestibilidade da porção FDN da dieta. Entretanto a combinação de aumento de consumo de amido com concomitante redução na digestibilidade do FDN foi observada apenas na dieta de alta PDR. De acordo com Conrad et al. (1964), em dietas com digestibilidade da MS de 52 a 66%, valores próximos aos do presente estudo o consumo de MS está diretamente relacionado à digestibilidade da MS. A baixa degradabilidade da fibra da cana de açúcar no rúmen pode agir como um limitador de consumo devido à baixa digestibilidade do FDN. Deste modo, é sugerido que a maior consumo de amido no experimento 2 pode ter prejudicado a digestibilidade do FDN consequentemente auxiliado na redução do CMS.

A quantidade de N urinário observado nos presentes estudos foi maior para vacas alimentadas com maior teor de PB e maior teor de PDR, sugerindo que estas dietas tenham produzido maior quantidade nitrogênio amoniacal no rúmen, o que de fato foi observado em ambas as dietas. A absorção do nitrogênio amoniacal pelo epitélio ruminal pode levar, via ciclo da ureia, a produção de elevada quantidade de ureia sanguínea. Deste modo, é sugerido que as vacas alimentadas maior teor PB ou PDR eliminem maior quantidade de N urinário para eliminar ureia plasmática. Em uma revisão sobre eficiência de uso do nitrogênio nas dietas de vacas leiteiras, Castillo et al. (2000) relataram que, quando a ingestão de N de vacas em lactação foi maior do que 400 g de N/d, a excreção N na urina aumentou exponencialmente, mas a taxa de excreção de N nas fezes diminuiu linearmente. Esses autores sugeriram que a utilização de 150 g de PB/ kg MS seria um valor ideal para produzir uma redução na excreção de N urinário, sem alterar a produção de leite. Esses resultados são semelhantes aos observado no experimento 1 onde 160 g PB/kg/MS de PB na dieta não prejudicou a produção de leite em comparação com o fornecimento de 180 g PB/ kg MS. Em um estudo anterior realizado por Mendonça et al.

(2004), houve diferença na excreção de N na urina (g/d) entre vacas alimentadas com silagem de milho e vacas alimentadas com cana de açúcar. Agle et al. (2010) descreveu redução da excreção do nitrogênio urinário em dietas com baixa PB (12,4% MS), em comparação a dietas com alta PB (15,4% MS), mas sem efeitos de níveis de proteína do leite. Neste estudo, houve efeitos das dietas sobre a excreção de N nas fezes (g/d). Mendonça et al. (2004) não relataram aumento da excreção de N nas fezes com um aumento de ureia (0,35 ou 1% de MS) na dieta. Já para o presente estudo foi observado redução do N fecal para dietas com maior inclusão de ureia, uma vez que dificilmente a ureia irá passar além do rúmen sem ser degradada, incorporada a proteína microbiana ou absorvida para a corrente sanguínea. Em outro estudo o aumento no conteúdo de PB da dieta também não apresentou efeito sobre excreção fecal N (AGLE et al., 2010). No presente estudo houve maior quantidade de nitrogênio excretado no leite como uma proporção de N total consumido, em dietas de vacas alimentadas com baixa PB, resultou de uma maior eficiência utilização do N ingerido para conversão em proteína do leite. Colmenero & Broderick (2006) relataram uma diminuição da eficiência do uso do N quando o teor de PB das dietas aumentou de 13,5 para 19,4% PB MS. De forma similar aos estudos de Colmenero & Broderick (2006), os resultados do presente estudo indicam que para vacas em lactação terço médio de lactação com produção média de leite de 30 kg / d e cana de açúcar como volumoso, o uso de dietas com baixa PB foi mais eficiente em termos de uso do nitrogênio uma vez que um maior percentual do N ingerido que foi destinado a ser excretado no leite, porem acarretando em redução da produção de leite para vacas alimentadas com menor teor de PB.

Os dados do presente estudo sugerem que para vacas de produção próxima a 30 litros de leite por dia consumindo como volumoso a cana de açúcar, a alta digestibilidade aparente total do amido, que foi por volta de 98% não permitiu a redução do teor de PB a 130 g PB/kg MS nem o aumento da degradabilidade da proteína a 120 g PDR/kg PB sem que houvesse redução na produção de leite. Entretanto, o uso de silagem de cana de açúcar e de grãos de milho reidratados mostrou-se viável para o nível de produção apresentado pelas vacas no presente estudo.

6.1.16 Conclusão

Vacas em em terço médio de lactação alimentadas com dieta contendo baixo nível de PB (130 g PB/kg MS) apresentaram redução do consumo de MS, produção de leite, leite corrigido para gordura e teor de sólidos do leite. Entretanto a dieta com baixo teor de PB aumentou a eficiência da excreção do N para o leite e reduziu a excreção de N para urina, fezes. O fornecimento de dietas com alta quantidade de PB (180g PB/kg MS) não gerou benefícios em relação ao uso do nível intermediário de PB (160g PB/kg MS). Dietas contendo 160 g PB/kg MS contendo 120 g/PDR/kg MS também reduziram o consumo de MS, produção de leite e de sólidos do leite. A dieta com maior teor de PDR também reduziu a produção de acetato e propionato no fluido ruminal. O aumento da PDR na dieta gerou aumento na excreção de nitrogênio na urina e no leite. De forma geral a manutenção do nível de PDR em 100 g PDR/Kg MS apresentou maior consumo de MS e produção de leite.

6.1.17 Referências Bibliográficas

AGLE. M., HRISTOV N. A., ZAMAN. S., SCHNEIDER. C., NDEGWA, P.M., VADDELLA, V.K. Effect of dietary concentrate on rumen fermentation, digestibility, and nitrogen losses in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.93, p. 4211–4222. 2010.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists) International. Official Methods of Analysis. 15th edn. **Association of Official Analytical Chemists**; Washington, DC, USA. 1990.

ARCARI, M.A., MARTINS, C. M. M. R., TOMAZI, T., SANTOS, M.V. 2016 b. Effect of the ensiling time of hydrated ground corn on silage composition and in situ starch degradability. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 53, p. 60-71. 2016a

ARCARI, M.A., MARTINS, C.M.M.R., TOMAZI, T., GONÇALVES, J.L., SANTOS M.V. Effect of substituting dry corn with rehydrated ensiled corn on dairy cow milk yield and nutrient digestibility. **Animal Feed Science and Technology**, v. 221, p.167-173. 2016b.

BRODERICK, G.A. Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.1370-1381. 2003.

CASTILLO, A.R.; KEBREAB, E.; BEEVER, D.E. Review of efficiency of nitrogen utilization in dairy cows and its relationship with the environmental pollution. **Journal of Animal Feed Sciences**, v.9, p.1-32. 2000.

CHANEY, A.L., MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinic Chemistry**, v. 8, p. 130-132. 1962.

CHIZZOTTI, M.L., VALADARES FILHO, S.C., VALADARES, R.F.D. Consumo, digestibilidade e excreção de uréia e derivados de purinas em vacas de diferentes níveis de produção de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.138-146. 2007.

COLMENERO, J.J.O., BRODERICK, G.A. Effect of dietary crude protein concentration on ruminal nitrogen metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.1694-1703. 2006a

COLMENERO, J.J.O., BRODERICK, G.A. Effect of dietary crude protein concentration on milk production and nitrogen utilization in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.1704-1712. 2006b.

CONRAD, H.R., PRATT, A.D., HIBBS, J.W. Regulation of feed intake in dairy cows. I - Change in importance of physical and physiological factors with increasing digestibility. **Journal of Dairy Science**, v. 47, p. 54-62. 1964.

COOPER, J. M. & BIGGS, H. G. An evaluation of four methods of measuring urinary creatinine. **Clinic. Chemistry**, v.7, p. 665-673, 1961.

DOMBRINK-KURTZMAN, M. A., BIETZ, J. A. Zein composition in hard and soft endosperm of maize. **Cereal Chemistry**. v. 70, p. 105-108. 1993.

EHRMAN, T. 6 Determination of Starch in Biomass Samples by Chemical Solubilization and Enzymatic Digestion. LAP-016 U.S. **Department of Energy National Bioenergy Center**, Washington, D.C. 1996.

ERWIN, E.S., MARCO, G.J., EMERY, E.M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v.44, p.1768-1771. 1961.

HUBER, J.T., COOK, R.M. Influence of site of administration of urea on voluntary intake of concentrate by lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 55, p. 1470-1473. 1972.

IPHARRAGUERRE, I. R., CLARK, J. H. Varying Protein and Starch in the Diet of Dairy Cows. II. Effects on Performance and Nitrogen Utilization for Milk Production. **Journal of Dairy Science**. v.88, p. 2556–2570. 2005.

KALSCHEUR, K. F., R. L. BALDWIN, B. P. GLENN, AND R. A. KOHN. 2006. Milk production of dairy cows fed differing concentrations of rumen-degraded protein. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 249–259. 2006.

KALSCHEUR, K.F., VANDERSALL, J.H., ERDMAN, R.A. Effects of dietary crude protein concentration and degradability on milk production responses of early, mid, and late lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.545-554. 1999.

LAMMERS B.P., BUCKMASTER D.R, HEINRICHS A. J. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. **Journal of Dairy Science** v. 79, p. 922–928. 1996.

MENDONÇA, S.S., CAMPOS, J.M.S., VALADARES FILHO, S.C. Consumo, digestibilidade aparente, produção e composição do leite e variáveis ruminais em vacas leiteiras alimentadas com dietas à base de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.481-492. 2004.

MUTSVANGWA, T., K. L. DAVIES, J. J. MCKINNON, AND D. A. CHRISTENSEN. Effects of dietary crude protein and rumen-degradable protein concentrations on urea recycling, nitrogen balance, omasal nutrient flow, and milk production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 99, p. 6298–6310. 2016.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of dairy cattle. 7. rev. ed. Washington, DC. **National Academy. Science**. 2001.

OLIVEIRA, A. S., DETMANN, E., CAMPOS, J. M. S., PINA, D. S., SOUZA, S. M., COSTA, M. G. Meta-análise do impacto da fibra em detergente neutro sobre o consumo, a digestibilidade e o desempenho de vacas leiteiras em lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.1587-1595. 2011.

OLIVEIRA, A.S., VALADARES, R.F.D., VALADARES FILHO, S.C. Produção de proteína microbiana e estimativas das excreções de derivados de purinas e de uréia em vacas lactantes alimentadas com rações contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-protéicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.1621-1629. 2001.

PEREIRA, M.L.A., VALADARES FILHO, S.C., VALADARES, R.F.D. Consumo, digestibilidade aparente total, produção e composição do leite em vacas no terço inicial da lactação alimentadas com níveis crescentes de proteína bruta no concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.34, p.1029-1039. 2005

RIUS, A. G., S. KITTELMANN, K. A. MACDONALD, G. C. WAGHORN, P. H. JANSSEN, AND E. SIKKEMA. Nitrogen metabolism and rumen microbial enumeration in lactating cows with divergent residual feed intake fed high-digestibility pasture. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 5024–5034. 2012.

SAS Institute. SAS User's Guide: Statistics. SAS Inst. Inc., Cary, NC. 2001.

SKLAN, D., KAIM, M., MOALLAM, U. AND FOLMAN, Y. Effect of dietary calcium soaps on milk yield, body weight, reproductive hormones, and fertility in first parity and older cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 1652-1660. 1994.

SNIFFEN, C.J., O'CONNOR, J.D., VAN SOEST, P.J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, p. 3562-3577. 1992.

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

WANG, C., J. X. LIU, Z. P. YUAN, Y. M. WU, S. W. ZHAI, AND H. W. Y.E. Effect of level of metabolizable protein on milk production and nitrogen utilization in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2960–2965. 2007.

WILSON, J.R.; KENNEDY, P.M. Plant and animal constraints to voluntary intake associated with fiber characteristics and particle breakdown and passage in ruminants. **Australian Journal Agricultur Research**. v.47, p.199-225. 1996.