**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Silagem de grãos de sorgo reconstituídos para vacas leiteiras:
efeitos da conservação da silagem e respostas de aditivos**

Evandro Paulo Schönell

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Ciências. Área de
concentração: Ciência Animal e Pastagens

**Piracicaba
2016**

Evandro Paulo Schönell
Zootecnista

**Silagem de grãos de sorgo reconstituídos para vacas leiteiras: efeitos da
conservação da silagem e respostas de aditivos**

Orientador:
Prof. Dr. **LUIZ GUSTAVO NUSSIO**

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Ciências. Área de
concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Schönell, Evandro Paulo

Silagem de grãos de sorgo reconstituídos para vacas leiteiras: efeitos da conservação da silagem e respostas de aditivos / Evandro Paulo Schönell. - - Piracicaba, 2016.
105 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Estabilidade aeróbia 2. Prolaminas 3. Amido 4. *L. buchneri* 5. Benzoato de sódio
6. Degradação in situ 7. Eficiência alimentar 8. Fermentação ruminal I. Título

CDD 636.08552
S371s

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*Aos meus pais Nelson Schonell e Maria de Lourdes Schonell,
pelos exemplos de vida, ajuda e paciência.
As minhas irmãs e família, pelo apoio incondicional.
À Ingrid Santana, por todo o amor e companheirismo
DEDICO.*

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz e ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade em cursar o programa de Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo e à FAPESP projeto temático nº 2014/06819-4.

Ao professor Dr. Luiz Gustavo Nussio, pela orientação, pelos valorosos ensinamentos, conselhos e amizade. És um exemplo de profissional, o qual seguirei por toda a minha carreira. Obrigado pela confiança depositada na minha pessoa.

Ao João Luiz Pratti Daniel, pela amizade e pelos conselhos ao longo desses anos, por me orientar durante as etapas de condução e elaboração desse trabalho, sou eternamente grato!

Aos meus professores e orientadores da UDESC/Chapecó, em especial ao Dilmar Baretta e Carlos Eduardo Oltramari pelo incentivo e apoio para ingressar na pós-graduação.

Aos professores (as) do Departamento de Zootecnia, os quais contribuíram para a construção do meu conhecimento. Especialmente à Prof^a. Carla Bittar, Prof. Roberto Sartori, Prof. Flávio Portela Santos, Prof. Alexandre Vaz Pires e Prof^a. Ivanete Susin.

À USP de Pirassununga pela colaboração na colheita, armazenamento e moagem dos grãos, principalmente na figura do Eng. Agrônomo Eduardo. Agradecer também ao laboratório de Nutrição Animal, em especial ao Prof. Dr. Franscisco Palma Rennó pelas análises de derivados de purina.

Aos colegas do QCF (Grupo de Pesquisa em Qualidade e Conservação de Forragens) pelas ajudas nos trabalhos à campo, em laboratório e pela amizade. Em especial à Greiciele de Moraes, colega de pesquisa com silagem de grãos, pela disposição e ajuda em todas as etapas desse trabalho. Aos colegas de pós-graduação e funcionários do Departamento de Zootecnia, meu muito obrigado.

Aos amigos de Santa Catarina e de Piracicaba os quais motivaram e que estiveram sempre ao meu lado, nos momentos tristes e alegres.

E a todos que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Os grandes feitos são conseguidos não pela força, mas pela
perseverança.” (Samuel Johnson)*

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO GERAL	15
Referências	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 A cultura do sorgo (<i>Sorghum bicolor</i>).....	19
2.2 A técnica de ensilagem de grãos reconstituídos	20
2.3 Aditivos em silagens de grãos de sorgo reconstituídos.....	23
2.4 Silagens de grãos reconstituídos para ruminantes.....	27
Referências	31
3 ADITIVOS QUÍMICOS E MICROBIANOS EM SILAGENS DE GRÃOS DE SORGO RECONSTITUÍDOS	37
Resumo.....	37
Abstract.....	37
3.1 Introdução	38
3.2 Material e Métodos.....	39
3.2.1 Local, confecção das silagens e tratamentos.....	39
3.2.2 Análises dos grãos frescos reconstituídos e dos mini-silos.....	41
3.2.3 Avaliação da degradabilidade <i>in situ</i>	44
3.2.4 Análises estatísticas	45
3.3 Resultados e Discussão	46
3.3.1 Degradabilidade <i>in situ</i> da matéria seca.....	46
3.3.2 Aspectos fermentativos	49
3.4 Conclusões.....	59
Referências	59
4 USO DE <i>L. buchneri</i> E BENZOATO DE SÓDIO EM SILAGENS DE GRÃOS DE SORGO RECONSTITUÍDO PARA VACAS LEITEIRAS	65
Resumo.....	65
Abstract.....	65
4.1 Introdução	66
4.2 Material e Métodos.....	67

4.2.1 Local, ensilagem e tratamentos	67
4.2.2 Avaliações nos grãos antes e após o processo fermentativo	70
4.2.3 Ensaio de lactação.....	74
4.2.4 Análises estatísticas	79
4.3 Resultados e Discussão	80
4.3.1 Aspectos da conservação das silagens de grãos de sorgo reconstituído.....	80
4.3.2 Degradabilidade <i>in situ</i> da MS de silagens de grãos de sorgo	86
4.3.3 Desempenho dos animais	88
4.4 Conclusão.....	99
Referências.....	100

RESUMO

Silagem de grãos de sorgo reconstituídos para vacas leiteiras: efeitos da conservação da silagem e respostas de aditivos

A ensilagem de grãos de sorgo reconstituídos é uma forma de processamento que visa aumentar a disponibilidade dos nutrientes e consequentemente seu valor nutritivo. São poucos os trabalhos com relação ao uso de aditivos nesse processo, bem como, sua influência no desempenho de bovinos leiteiros. O sorgo é um cereal que, tradicionalmente tem menor valor comercial em relação ao milho. Dessa forma, buscar formas de aumentar seu valor nutritivo, assim como conservá-lo de maneira adequada é de extrema importância. Sendo assim, esse estudo foi dividido em duas etapas: Exp. 1) Foram testados aditivos químicos e microbianos em silagens de grãos de sorgo reconstituídos. Os tratamentos foram: (i) sem aditivo (Controle); (ii) *Lactobacillus buchneri* (5×10^5 ufc g^{-1} MN) (LB); (iii) *Lactobacillus plantarum* (5×10^5 ufc g^{-1} MN) (LP); (iv) LB + LP (Combo); (v) *Lactobacillus buchneri* + nitrito de sódio ($1,5 g kg^{-1}$ MN de nitrito) (LBNit) e (vi) benzoato de sódio ($2,0 g kg^{-1}$ MN) (Benz). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com seis tratamentos e quatro repetições. Maiores taxas de degradabilidade ruminal foram obtidas para os tratamentos LB e Combo, enquanto LBNit e BZ tiveram menores perdas fermentativas. As contagens de leveduras obtidas foram menores para os tratamentos LB, Combo, LBNit e BZ, o que explicou a maior estabilidade aeróbia obtida. As silagens com *L. buchneri* ou benzoato de sódio, apresentaram resultados satisfatórios quanto à manutenção da qualidade higiênica das silagens. Exp. 2) Com base nos dados obtidos no 1º experimento, foram avaliados a adição de *L. buchneri* e benzoato de sódio em silagens de grãos de sorgo reconstituídos para vacas leiteiras. As vacas foram alocadas em cinco quadrados latinos e quatro tratamentos: (i) silagem sem aditivo (Controle); (ii) silagem inoculada com *L. buchneri* (5×10^5 ufc g^{-1} MN) (LB); (iii) silagem tratada com benzoato de sódio ($2,0 g kg^{-1}$ MN) (Benz) e (iv) sorgo grão moído fino (SGM). Os resultados evidenciaram maior solubilização da matriz proteica em ambos os tratamentos ensilados. As taxas de degradabilidade da MS foram maiores para Controle, LB e BZ. Obteve-se maior CMS para o SGM enquanto a produção de leite foi semelhante entre os tratamentos. A digestibilidade da dieta foi maior para os tratamentos Controle, LB e BZ comparado ao SGM. Os animais que receberam o tratamento SGM apresentaram maior tempo de ingestão e mastigação, reflexo do maior CMS. O uso de aditivos na ensilagem de grãos de sorgo reconstituídos se mostrou eficiente no controle de perdas, estabilidade aeróbia e no desempenho de vacas leiteiras.

Palavras-chave: Estabilidade aeróbia, Prolaminas; Amido; *L. buchneri*; Benzoato de sódio; Degradação in situ; Eficiência alimentar; Fermentação ruminal

ABSTRACT

Reconstituted sorghum grain silage for dairy cows: effects of silage conservation and additives responses

The reconstituted sorghum grain silage is a type of processing which aims to increase the availability of nutrients and consequently its nutritional value. There are few reports about the use of additives in this process, as well its influence on the performance of dairy cows. Sorghum is a cereal that has traditionally lower price compared with maize. Thus, search for ways to increase their nutritional value and preserve appropriately is important. Therefore, this study was separated into two phases: Exp. 1) were tested the addition of chemical and microbial additives for reconstituted sorghum grain silage. The treatments were: (i) without additive (control); (ii) *Lactobacillus buchneri* (5×10^5 cfu g⁻¹ FM) (LB); (iii) *Lactobacillus plantarum* (5×10^5 cfu g⁻¹ FM) (LP); (iv) LB + LT (Combo); (v) *Lactobacillus buchneri* + sodium nitrite (1.5 g kg⁻¹ FM nitrite) (LBNit) and (vi) sodium benzoate (2.0 g kg⁻¹ FM) (Benz). The experimental design was entirely randomized with six treatments and four replications. Higher ruminal degradability rates were obtained for the LB and Combo treatments, while LBNit and BZ had lower fermentative losses. Yeasts counts were lower for LB, Combo, LBNit and BZ, which explained the higher aerobic stability. Silages with *L. buchneri* and sodium benzoate, showed satisfactory results in maintaining the hygienic quality of silages. Exp. 2) Based on data obtained in the first experiment, were evaluated the addition of *L. buchneri* and sodium benzoate in reconstituted sorghum grain silages offered dairy cows. The cows were allocated in one of five Latin squares and four treatments: (i) silage without additive (Control); (ii) silage inoculated with *L. buchneri* (5×10^5 cfu g⁻¹ FM) (LB); (iii) silage treated with sodium benzoate (2.0 g kg⁻¹ FM) (Benz) and (iv) finely ground grain sorghum (SGM). The results showed increased solubilization of the protein matrix in Control, LB and BZ. The DM degradability rates were higher for Control, LB and BZ. The DMI was higher for SGM, while milk production was similar between treatments. The digestibility of the diet was higher for treatments Control, LB and BZ compared to the SGM. Animals which received the treatment SGM showed higher time consuming and chewing, reflection of the increased of DMI. The use of additives in reconstituted sorghum grain silage provided effective losses control, higher aerobic stability and better performance of dairy cows.

Keywords: Aerobic stability; Prolamines; Starch; *L. buchneri*; Sodium benzoate; In situ degradation; Feed efficiency; Ruminal fermentation

1 INTRODUÇÃO GERAL

As fontes principais de amido utilizadas em dietas para ruminantes, tais como o milho e sorgo, são semelhantes em sua composição. Entretanto, apresentam diferenças em relação à degradabilidade ruminal e aproveitamento do amido no trato digestivo total, conferindo ao sorgo menor valor nutricional, quando comparado ao milho. A menor degradabilidade ruminal está relacionada à matriz proteica presente nos grãos de cereais, a qual é responsável por envolver os grânulos de amido, impedindo a ação das enzimas amilolíticas (ROONEY; PFLUGFELDER, 1986; HUNTINGTON, 1997). A matriz proteica do sorgo é composta pelas kafarinas e o milho pelas zeínas, consideradas proteínas hidrofóbicas (HAMAKER et al., 1995), insolúveis no rúmen e dificultam a ação das enzimas secretadas pelos microrganismos ruminais (PHILIPPEAU et al., 1997; LARSON; HOFFMAN, 2008).

As formas de processamento do grão, tal como moagem, ensilagem e floculação, tem por objetivo a quebra da matriz proteica e facilitar o acesso dos microrganismos ruminais e suas enzimas para realizar a fermentação e degradação do alimento. A ensilagem apresenta grande eficiência no que diz respeito à ocorrência de proteólise e ataque enzimático, desencadeados pela fermentação dos grãos ensilados, o que leva à maior degradação da matriz proteica (PHILIPPEAU; MICHALET-DOREAU, 1998) e posteriormente, o acesso das bactérias ruminais é facilitada (ARRIGONI et al., 1998).

A ensilagem de grãos de sorgo representa uma alternativa importante na melhoria dos valores nutricionais desse grão, além de ser uma forma de armazenamento de grãos na propriedade. Com ela, é possível contornar fatores críticos tal como a falta de silos especializados e estrutura adequada para a estocagem dos grãos secos. Adicionalmente, evitar o ataque de pragas e microrganismos indesejáveis, que reduzem a qualidade dos grãos. As pesquisas com silagens de grãos de sorgo reconstituídos, caracterizada pela reidratação do grão seco, seguida por ensilagem, ainda são escassas na literatura, principalmente no que diz respeito à escolha e uso de aditivos no momento da ensilagem, bem como, no desempenho de vacas leiteiras. Vários aditivos são desenvolvidos com o intuito de auxiliar no processo de fermentação, contribuir na redução das perdas de matéria seca (MS) da silagem, preservar o valor nutritivo da massa ensilada e aumentar a estabilidade aeróbica da silagem após a abertura dos silos (WEISS,

1996).

Silagens de alta qualidade tipicamente apresentam concentrações elevadas de ácidos orgânicos, baixo pH e baixo conteúdo de amônia (McDONALD et al., 1991). A concentração elevada de ácidos orgânicos é importante para conservação da silagem, além de ter significado nutricional para ruminantes. Adicionalmente, algumas características relacionadas à massa a ser ensilada são importantes no processo fermentativo, como teor de carboidrato solúvel alto, capacidade tampão baixa e teor adequado de MS, além de contagens suficientemente altas de bactérias lácticas e baixas populações de microrganismos indesejáveis (leveduras, clostrídeos, bacilos, enterobactérias e listeria) (McDONALD, 1991). Entretanto, nem todo o material possui estes requisitos, silagem de sorgo e milho grãos tipicamente apresentam baixo teor de ácido láctico e carboidrato solúvel, além de menor teor de umidade. Dessa forma, essas silagens podem ser propensas a maior deterioração e menor estabilidade em aerobiose. Dessa forma, ressalta-se a importância do uso de aditivos para modular a dinâmica de fermentação, mitigar perdas durante o processo fermentativo e o período pós-abertura dos silos.

Os objetivos desse estudo foram avaliar a influência de aditivos químicos e/ou microbianos sob a conservação, qualidade higiênica e estabilidade aeróbia de silagens de grãos de sorgo reconstituídos e seus efeitos no desempenho de vacas leiteiras de alta produção.

Para melhor compreensão das etapas dessa pesquisa, redigiu-se essa dissertação em três capítulos:

Capítulo 1: Revisão de literatura: Aspectos da conservação e do uso de silagens de grãos de sorgo reconstituídos para ruminantes;

Capítulo 2: Aditivos químicos e microbianos em silagens de grãos de sorgo reconstituídos;

Capítulo 3: Uso de *L. buchneri* e benzoato de sódio em silagens de grãos de sorgo reconstituído para vacas leiteiras.

Referências

ARRIGONI, M.D.; VIEIRA, P.; SILVEIRA, A.; FURLAN, L.; COSTA, C.; CHARDULO, A.; CURI, P. Estudos dos efeitos da restrição alimentar no desempenho de bovinos jovens confinados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, p. 987-992, 1998.

HUNTINGTON, G.B. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75, p. 52–867, 1997.

LARSON, L.; HOFFMAN, P.C. Technical note: a method to quantify prolamin proteins in corn that are negatively related to starch digestibility in ruminants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, p. 4834-4839, 2008.

McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2nd. ed. Lincoln: Chalcombe Publ., 1991. 340 p.

PHILIPPEAU, C.; MICHALET-DOREAU B. Influence of genotype and stage of maturity on rate of ruminal starch degradation. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, 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**, Champaign, v. 81, p. 2178-2184, 1998.

ROONEY, L.W.; PFLUGFELDER, R.L. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 63, p.1607-1623, 1986.

WEISS, B. When to consider silage additives, Tri-State Dairy Nutrition Conference, **Fort Wayne**, IN, USA. 1996, p.125-138.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do sorgo (*Sorghum bicolor*)

O sorgo é cultivado, principalmente, no período da safrinha pelos agricultores. Isso é comprovado quando observa-se os dados das últimas safras, onde a área plantada de sorgo aumentou de 2014/15 para 2015/16 em 14,2 mil ha (722,6 mil ha em 2014/15 vs. 736,8 mil ha 2015/16) (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2016). Esse aumento é reflexo da maior área de soja plantada no ano safra 2015/16, onde após a colheita da soja, muitos agricultores optaram em destinar parte da lavoura para o plantio de sorgo safrinha, com intuito de diminuir os riscos na lavoura, dada a maior resistência e menor exigência hídrica do sorgo.

Contrário ao aumento da área plantada, as estimativas de produção de grãos por ha em 2016 será menor a observada em 2015 (2844 vs. 2635 kg grãos ha⁻¹ para 2015 e 2016) (CONAB, 2016). Isso por conta do aumento nos preços dos insumos necessários para o plantio, gerando cortes nos gastos. Segundo estimativas da CONAB (2016) a produção total de sorgo grão em 2016 será de 1.931,4 milhões de toneladas (t), menor à observada em 2015. Porém, essa estimativa não engloba as produções do sorgo safrinha colhidas em maio/junho desse mesmo ano, já que é uma estimativa de janeiro de 2016.

Comparado a outros cereais, como o milho por exemplo, a participação do sorgo na produção total de grãos é muito pequena (1,9 vs. 82,3 milhões de t, respectivamente), porém é um cereal que tem sua importância. Muito utilizado em substituição ao milho em dietas para bovinos de leite e de corte, apresenta como principal atrativo o custo de produção e aquisição. Os preços praticados em 2015 foi em média de R\$ 15,08 pela saca de 60 kg (CONAB, 2015). Já para o milho o preço em maio de 2016, segundo dados do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - CEPEA/ESALQ (2016) foi de R\$ 49,00 a saca de 60 kg. Dada a grande diferença entre preços e considerando que o sorgo representa em torno de 80% do valor nutricional do milho e se processado representa $\pm$ 90% (ROONEY; PFLUGFELDER, 1986), utilizar o sorgo grão em dietas para ruminantes, dependendo da época do ano, pode trazer economia para a produção de leite e/ou carne.

O sorgo é considerado uma planta de clima quente, dada essa característica, possui mecanismos eficientes para tolerar déficit hídrico (EMBRAPA, 2008). De acordo com a EMBRAPA (2008), existem variedades adaptadas a diferentes climas, inclusive à regiões frias, tal como o sul do Brasil. Contudo, as plantas adaptadas a climas frios e/ou quentes tem uma faixa de temperatura ótima de crescimento, não excedendo 38 °C e inferiores a 16 °C (EMBRAPA, 2008). Por pertencer ao grupo de plantas de metabolismo C4, a planta de sorgo responde de maneira mais eficiente à radiação solar, assim, apresenta ótima produção de MV ha⁻¹. Dados publicados no relatório da Agência Paulista de Tecnologias dos Agronegócios – APTA (2011), onde foi realizado o levantamento de cinco safras de milho e sorgo no estado de São Paulo, constataram uma produção de MV superior para o sorgo (52,2 vs. 47,6 t ha⁻¹) comparado ao milho. Entretanto, vale ressaltar que essa maior produção de forragem precisa estar associada a qualidade do grão a ser fornecida aos animais, a qual geralmente é menor para o sorgo. Ainda, de acordo com esse relatório a menor qualidade do sorgo pode estar atrelada aos ataques de pássaros, os quais consomem os grãos e diminuem sua concentração na forragem. Desse modo, relatam-se produções de MS digestível inferiores para o sorgo (9,8 vs. 10,2 t ha⁻¹), por conta da menor contribuição do grão em relação ao milho (APTA, 2011).

De modo geral, a composição bromatológica dos grãos de sorgo apresenta semelhança ao milho. Segundo o National Research Council - NRC (2001) o sorgo grão apresenta, com base na MS 8,2% de PB; 10,9% de FDN; 5,9% de FDA; 3,1% de EE; 2,0% de MM; 3,08 de ED, Mcal kg⁻¹ e 70,96% de NDT. Já em relação ao amido os dois cereais apresentam valores semelhantes, próximo a 72% (HUNTIGTON, 1994). Sua composição pode variar de acordo com o tipo de híbrido, nível de adubação realizada e características climáticas de cultivo.

2.2 A técnica de ensilagem de grãos reconstituídos

A técnica de ensilagem de grãos reconstituídos, consiste na adição de água suficiente para elevar o teor de umidade do grão colhido seco para valores médios de 35% (BENTON; KLOPFENSTEIN; ERICKSON, 2005; COSTA et al., 1999). Por ser uma técnica pouco conhecida pelos produtores de leite no Brasil, comparada à técnica de ensilagem de grão úmido (colhido com teor de umidade natural do grão),

a reconstituição pode ser uma alternativa importante na conservação dos grãos na propriedade e uma boa opção ao grão úmido.

A reconstituição do grão colhido seco (estágio maduro) e ensilado, permite a otimização dos recursos disponíveis, principalmente na redução dos custos de transporte. Isso ocorre, pois muitas vezes o produtor compra grãos de outras propriedades, distantes do local onde irá ocorrer o processo de ensilagem. Dessa forma, transportar grãos secos pode tornar o transporte mais barato, pois o mesmo contém pouca teor de umidade.

Os custos de produção de silagem de grãos reconstituídos com secagem e estocagem são maiores quando comparados ao grão úmido. Dos poucos dados disponíveis na literatura, relata-se que a produção de grãos úmidos (no caso milho) pode ser 8,8% menor comparado a produção de grãos secos (JASPER et al., 2009). No entanto, os menores riscos de colheita (técnica da reconstituição permite maior intervalo de colheita comparada ao grão úmido) e a facilidade de compra de grãos secos em diferentes épocas do ano, fazem da reconstituição uma ótima opção de uso.

Assim como outras formas de estocagem de grãos, a técnica de reconstituição gera algumas perdas de MS. Fernandes (2014) relatou perdas de MS para silagens grãos de milho reconstituídos na faixa de 6,59% vs. 2,47% para grão úmidos no trabalho de Daniel et al. (2012). Diferente desses valores, resultados preliminares de Schonell et al. (2015) mostram perdas de MS em média de 0,8 % em pesquisa com silagens de grãos de sorgo em mini-silos experimentais. Assim, quando ensilados em silos maiores, as perdas em silagens de grãos de sorgo podem chegar próximo às obtidas com milho grão ensilado. Pflugfelder e Rooney (1986) em estudo com diferentes formas de reconstituição de grãos de sorgo, constataram perdas de MS na faixa de 2,0% para silagens de sorgo sem passar pelo processo de germinação (similar ao trabalho de Schonell et al., 2015) e de 12-20% para tempos de germinação de 12 e 48 h, respectivamente.

De acordo com Aguerre, Cajaville e Repetto (2015), a grande maioria do sorgo comercializado é na forma de grão seco, desse modo, a reconstituição do grão para ensilagem é uma das formas para aumentar o valor nutricional desse grão, o qual se fornecido *in-natura* é baixo. Além disso, é considerada de baixo custo, no entanto, os efeitos da reconstituição e o modo de operação ainda são bastante inconsistentes (AGUERRE; CAJARVILLE; REPETTO, 2015).

O processo de reconstituição pode ser realizado a partir do umedecimento dos grãos secos moídos, técnica difundida para o milho e também pode ser feita a imersão do grão na água e ensilado o grão inteiro, porém antes de fornecer aos animais é preciso realizar a moagem. A imersão do grão em água antes da ensilagem, tem como objetivo desencadear o processo de pré-germinação. Alguns autores sugerem a imersão dos grãos em água durante 21 h, após, os mesmos podem ser ensilados (SIMPSON et al., 1985). De acordo com esse mesmo autor essa etapa é primordial e é o primeiro fator de resposta envolvendo os resultados da reconstituição. Entretanto, essa resposta está relacionada ao tipo de híbrido empregado no processo.

Híbridos de sorgo com endosperma macios ou duros terão menores e maiores respostas, respectivamente. Balogun et al. (2005) não obtiveram diferença na digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) após a imersão do sorgo durante 24 h na água, comparado ao grão seco moído. Neste mesmo trabalho, os tratamentos não afetaram a composição química nem a degradabilidade ruminal da MS. Contrário a esses resultados, outros autores encontraram aumentos na digestibilidade da MS no rúmen e no trato total de 27 e 9,0%, respectivamente, em dietas com grãos de sorgo reconstituído comparado ao grão seco moído (HILL et al., 1991). Aguerre, Cajarville e Repetto (2015), obtiveram taxas de degradabilidade da MS semelhante em silagens de grãos de sorgo reconstituído sob duas formas, reconstituído e ensilado já moído ou grão inteiro passado pelo processo de germinação.

O período de germinação do grão de 1 a 5 d é crucial para a eficiência do processo de reconstituição. Esse período permite que o amido do grão inicie o processo de hidrólise, sinalização efetuada pelo hormônio vegetal giberelina, o qual causa a liberação de enzimas proteolíticas e amilolíticas ao migrar para a camada de aleurona do grão. A moagem ou laminação anteriores a reconstituição impedem a rota da giberelina e inibem boa parte deste processo autolítico (SULLINS et al., 1971). Entretanto, enzimas presentes no grão moído ainda podem ser ativadas pela adição de água, durante o processo de reconstituição, o que pode resultar em degradação enzimática (SULLINS et al., 1971). É preciso ressaltar, que no caso da germinação requer sementes intactas, além da presença de oxigênio e calor, fatores importantes para o aumento do valor alimentício do grão no processo de reconstituição.

De modo geral, alguns estudos relatam que curtos períodos de germinação do grão de sorgo antes da ensilagem podem acelerar a fermentação anaeróbica e promover maior valor nutritivo final (PFLUGFELDER et al., 1986; BALAGUN et al., 2005; AGUERRE; CAJARVILLE; REPETTO, 2015). No entanto, essa técnica apresenta grande variabilidade nos resultados. Na prática, a técnica de germinação pode ser difícil de ser executada, pois demanda muita mão de obra na imersão dos grãos, espaço e tempo empregado. Além de estar relacionada à maiores perdas de MS (12-20%) (PFLUGFELDER; ROONEY, 1986).

2.3 Aditivos em silagens de grãos de sorgo reconstituídos

O uso de aditivos no processo de ensilagem busca obter melhorias no processo fermentativo, proporcionar uma queda eficiente do pH da massa ensilada e promover a proteção contra microrganismos deterioradores durante o processo de estocagem, bem como, no processo de pós abertura. Assim, proporcionar melhorias na estabilidade aeróbia da silagem e promover menores de perdas de MS e energia.

Durante o processo de fermentação, bactérias anaeróbicas, principalmente as ácido lácticas, realizam a fermentação dos açúcares presentes na massa, diminuindo o pH (<4,0) da mesma e conservando-a. Após a abertura do silo ou mesmo durante o período de estocagem (no caso de furos na lona ou problemas na vedação), inicia-se o processo de deterioração aeróbia, através da atividade de leveduras, bactérias aeróbicas e fungos filamentosos, que reduzem o valor nutritivo e promovem perdas de MS, devido ao consumo de açúcares e ácidos orgânicos, promovendo o aumento da temperatura, pH e redução da concentração de ácido láctico (KUNG Jr. et al., 2007). Nesse contexto, entra a importância do uso de aditivos com o intuito de preservar a silagem após exposição ao ar para reduzir perdas.

A eficiência de um aditivo está diretamente relacionado ao controle das perdas de MS ocasionado pela ação de microrganismos maléficos. Esse fato ocorre devido ao processo de fermentação inadequado da silagem, que propicia o crescimento de microrganismos deterioradores, que degradam a proteína, com produção de alguns compostos como ácidos fracos (butírico, valérico e capróico), aminas (cadaverinas, putrecinas e histaminas), dióxido de carbono e amônia (NH₃). Além, é claro, da perda de nutrientes em geral (VILELA, 1984), a qual afetará o consumo de matéria seca (CMS) dos animais e por consequência seu desempenho.

Têm-se como conceito de aditivo ideal, aquele que é seguro para o ser humano, no qual reduz perdas de MS, melhora qualidade higiênica da silagem, evita fermentações secundárias de microrganismos como *Clostridium* ou enterobactérias, aumenta o valor nutritivo e melhora a estabilidade da silagem após a abertura do silo (HENDERSON, 1993).

Em relação aos aditivos microbianos, as bactérias ácido lácticas (BAL) são classificadas em homofermentativas, as quais produzem ácido láctico a partir de glicose (hexoses), heterofermentativas facultativas, que produzem ácido láctico a partir de hexoses, pentoses e dióxido de carbono, etanol e/ou ácido acético; heterofermentativas obrigatórias que oxidam hexoses e pentoses até ácido láctico, acético e propiônico (MUCK, 2010).

A inoculação de silagens com bactérias homofermentativas, faz com que a concentração de ácido láctico na silagem seja maior, o que reduz rapidamente o pH e inibe o crescimento de microrganismos indesejáveis (FILYA et al., 2000). Pelo fato de converterem os açúcares presentes na massa ensilada somente até ácido láctico, a utilização desse grupo de microrganismos apresenta menores perdas fermentativas (McDONALD et al., 1991). Nesse grupo se fazem presentes *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Streptococcus faecium*, *Enterococcus faecium* e *Lactococcus lactis*. A ação desses microrganismos no que diz respeito à rápida queda do pH, é importante no controle de crescimento de bactérias anaeróbias do gênero *Clostridium*, presentes no solo e que podem contaminar a silagem. Esses microrganismos fermentam açúcares, ácido láctico e aminoácidos, assim, produzem ácido butírico e aminas. A fermentação por *Clostridium* resulta em perdas significativas de MS e seus produtos de fermentação reduzem a palatabilidade e estabilidade da silagem (JOBIM et al., 1999).

O microrganismo *L. plantarum* é uma das bactérias homofermentativas utilizadas em silagens. Weinberg et al. (1993) relata que em silagens que apresentam níveis de carboidratos residuais em combinação com alta concentração de ácido láctico e ausência de concentração suficiente de ácido acético, estão associadas as maiores perdas durante exposição aeróbia. Isso se dá pelo fato dos carboidratos solúveis e ácido láctico serem substratos para o desenvolvimento de fungos em exposição ao ar, enquanto que o ácido acético é capaz de inibi-los (FYLIA, 2003). Dessa forma, silagens inoculadas com *L. plantarum* podem apresentar menor estabilidade em aerobiose, porém, com possibilidade de haver

menores perdas durante o processo fermentativo, visto que, esse tipo de microrganismo fermentam os açúcares somente até ácido láctico, conforme comentado anteriormente.

Morais (2016), em sua revisão de literatura sobre aditivos em silagens de grãos úmidos, destaca que as doses comumente utilizadas de bactérias homofermentativas (*L. plantarum*, principalmente) em experimentos de grãos úmidos/reconstituídos de milho variaram entre 5×10^4 e 1×10^7 ufc g⁻¹. Independente da dose utilizada, a autora conclui que houve similaridade na composição química dos grãos, exceto pela tendência de maior consumo de carboidratos em silagens inoculadas e maior concentração de ácido láctico em silagens tratadas, 1,3 vezes superior ao de grãos fermentados sem inoculante (MORAIS, 2016).

A atenção dos pesquisadores até pouco tempo estava focada para aditivos que maximizavam a produção de ácido láctico através da inoculação de bactérias homofermentativas (KUNG et al., 2003). Entretanto, essas silagens tendem a ser instáveis em meio aeróbico, não sendo capazes de manter a estabilidade após a abertura do silo (RIBEIRO et al., 2005), além de não inibir o crescimento de leveduras, um dos grupos de microrganismos responsáveis pela degradação do ácido láctico e perdas de MS no processo de exposição ao ar.

A partir desse conhecimento, as pesquisas se concentraram no uso de bactérias heterofermentativas. Esse grupo é composto pelos *Lactobacillus buchneri*, *Pediococcus cerevisiae*, *Propionibacterium shermani* e *Propionibacterium acidipropionici*, os quais são capazes de produzir ácidos estáveis em meio aeróbico com ação antifúngica e microbiana (DANNER et al., 2003). O *L. buchneri* é o microrganismo mais conhecido e estudado desse grupo, o qual é capaz de transformar ácido láctico em ácido acético; 1,2, propanodiol e traços de etanol. Já o *L. diolivorans* converte o 1,2-propanodiol para 1-propanol e ácido propiônico, o qual exerce grande ação antifúngica, semelhante ao ácido acético (MOON, 1983).

Segundo Kleinschmit e Kung Jr. (2006) a inoculação com *L. buchneri* em silagens de milho, sorgo, trigo, cevada e gramíneas, reduziu a concentração de ácido láctico, aumentou a concentração de ácido acético e melhorou estabilidade aeróbia dessas silagens, devido à inibição do crescimento de leveduras. Mesmo resultado foi encontrado em mini-silos experimentais com sorgo grão reconstituído inoculados com *L. buchneri*, onde não houve a quebra da estabilidade em dez dias de avaliação (240 h) (SCHONELL et al., 2015).

A combinação de bactérias homofermentativas e heterofermentativas vem sendo bastante empregada em silagens, comumente chamada de “combo”. O efeito dessa associação é observado em estudos onde se testou *L. buchneri* e *L. plantarum* em silagens de milho e sorgo, concluindo que a adição do *L. buchneri* em combinação com *L. plantarum* melhorou a estabilidade aeróbia dessas silagens, sendo preferível a utilização desses dois microrganismos, pois acelera a fermentação inicial, produzindo ácido láctico, queda rápida de pH, diminuição da degradação de proteína e aumento da estabilidade aeróbia (FILYA, 2003). Contrariamente, Taylor e Kung (2002) observaram que essa associação em silagens de grãos úmidos de milho não melhorou a estabilidade aeróbia quando comparado ao tratamento somente com *L. buchneri*.

Já na classe de aditivos químicos, o benzoato de sódio vem sendo bastante empregado em silagens. Este aditivo é um agente conservante utilizado amplamente na indústria alimentícia, principalmente no controle de microrganismos indesejáveis e que vem sendo empregado no controle da qualidade de alimentos para a nutrição animal (BERNARDES et al., 2007). O benzoato de sódio, inibe a ação de microrganismos como clostrídeos, fungos filamentosos e leveduras, as quais iniciam o processo de deterioração aeróbia consumindo o ácido láctico presente no meio, o que aumenta o pH e fornece um ambiente favorável ao crescimento de outros microrganismos indesejáveis (WOOLFORD, 1975).

A inclusão de benzoato de sódio em silagens, era realizado no passado em altas doses, cerca de 10 a 20 g kg⁻¹. Essa dose, normalmente, provocava a esterilização do alimento, prejudicando o processo fermentativo. Além disso, ocasionava danos aos equipamentos de aplicação, devido à ação corrosiva desse ácido (BERNARDES et al., 2007). Atualmente, o benzoato de sódio tem sido utilizado nas doses de 0,5 a 2 g kg⁻¹ de matéria natural (MN) (BERNARDES et al., 2007).

Assim como o benzoato de sódio, o nitrito de sódio também age no controle do crescimento de clostrídeos e outros microrganismos. Sua forma de ação resume-se na quebra do nitrato da forragem, formando nitrito e óxido nítrico, os quais inibem o crescimento de bactérias indesejáveis na silagem (SPOELSTRA, 1985). Entretanto, em alimentos com baixos teores de nitrato, os quais apresentam risco de fermentação clostrídica, o uso de nitrito de sódio é interessante para o controle desse microrganismo (CUSTÓDIO, 2013).

O nitrito de sódio vem sendo amplamente utilizado na indústria alimentícia, exclusivamente como conservador dos alimentos. Estudos demonstram sua eficiência no controle de clostrídeos em embutidos, através da inibição da piruvato ferredoxina oxiredutase e a ferredoxina, sendo que essa inibição é resultado da destruição dos centros de ferro e enxofre das enzimas e a formação de complexos ferro-enxofre-óxido-nítrico (CARPENTER et al., 1987). O nitrito atua na inibição de clostrídeos, ao interferir nas enzimas que apresentam ferro e enxofre em sua estrutura, o que impede a formação de adenosina trifosfato (ATP) a partir do piruvato. Não foi encontrado efeito de nitrito de sódio sob bactérias ácido lácticas, devido a sua falta de ferredoxina (JAY, 1994; FRANCO; LANDGRAF, 1996), o que possibilita seu uso em silagens, associado à inoculantes contendo bactérias ácido lácticas.

De modo geral, a escolha do uso ou não de aditivos em silagens, deve levar em conta principalmente seu custo, atrelado aos benefícios no processo de conservação e no desempenho dos animais. Existem vários estudos com aditivos em silagens de grãos úmidos e/ou reconstituídos de milho, porém no que se refere ao sorgo grão as pesquisas são escassas, não só no uso de aditivos como também no processo de ensilagem como um todo.

2.4 Silagens de grãos reconstituídos para ruminantes

A ensilagem de grãos reconstituídos é uma alternativa interessante no armazenamento dos grãos, sendo considerada uma forma de processamento úmido do grão (HALE, 1973). As técnicas de processamento do grão têm por objetivo expor os grânulos de amido à digestão, através da quebra da matriz proteica que reveste o grão, implicando no rompimento das ligações entre os grânulos de amido. Esse processo possibilita uma melhor ação da população microbiana ruminal, que irá digerir esse amido (LIKOS; VARGA, 1995).

Essa ação microbiana será maior ou menor pronunciada, de acordo com o tipo de processamento realizado. Atualmente, as diferentes técnicas de processamento dos grãos se diferenciam quanto aos aspectos de aproveitamento do amido, nas diversas porções do trato digestivo e isso está relacionado à eficiência nutricional energética do alimento. Muitos autores relatam que digerir amido no

intestino trará menos perdas energéticas por conta da diminuição da produção de ácido graxo voláteis (AGV's) e aumento de glicose absorvida no rúmen (McLEOD et al., 2006).

Com o tipo de processamento empregado podemos modular o local de digestão do grão. Trabalhos tradicionais de processamento e efeito na digestibilidade do alimento, mostram um menor aproveitamento ruminal de grãos moídos e floculados no rúmen, com isso um maior escape para digestão no intestino. Embora a degradação do amido do milho floculado seja maior no rúmen em comparação com grãos moídos e menor que grãos ensilados, a extensão de digestão do grão floculado no trato total é maior que grãos moídos, dado o melhor aproveitamento no intestino (OWENS; SODERLUND, 2006; FERRARETTO et al., 2013). Para as silagens de grãos úmidos ou reconstituídos, há um maior aproveitamento desse amido no rúmen, onde o mesmo é fermentado principalmente até propionato, principal precursor de glicose, escapando menos amido para o intestino.

Segundo Reynolds (2006), grande parte do amido que escapa da fermentação ruminal é digerida no intestino delgado, porém, quanto maior é o escape de amido, menor tende a ser a eficiência da digestão no intestino delgado, ou seja, ocorre uma limitação na capacidade de digerir o amido. Ainda, devido essa limitação de digestão no intestino delgado, grande quantidade de amido pode chegar ao intestino grosso e sofrer fermentação cecal, o que aumenta as perdas de proteína microbiana e nitrogênio (N) nas fezes.

Nocek e Tamminga (1991) mostraram pouco efeito no desempenho ao deslocar a digestão da glicose do rúmen para o intestino. No entanto, Theurer et al. (1999) observaram benefícios quando aumentou a digestão ruminal do amido, principalmente em relação a produção e porcentagem de proteína no leite, este fato é atribuído ao aumento na produção de proteína microbiana, promovido pela fermentação do amido no rúmen, além da contribuição do N solúvel contido em silagens de grãos úmidos. Reynolds et al. (2002), infundiram amido no duodeno de vacas em lactação por um período de duas semanas, esses autores observaram aumento linear na produção de leite, porém ocorreu decréscimo na concentração de gordura. Com isso, os autores concluíram que ao se infundir glicose pós-rúmen, ocorre um aumento na produção de leite, diminuição da produção e concentração de gordura e redução no consumo de MS (REYNOLDS et al., 2002).

Uma das formas de se avaliar o processamento do amido é a mensuração do amido fecal (%), o qual está diretamente relacionado a digestão do amido no trato total (ZINN et al., 2007). Este autor sugere fórmulas para cálculo da digestibilidade aparente do amido no trato total, com base no percentual de amido nas fezes, sendo essa uma ferramenta na adequação de dietas e principalmente na comprovação da eficiência do processamento, seja por floculação, ensilagem, moagem fina, entre outros. Fredin et al. (2014) ressalta que a concentração de amido nas fezes representa perdas econômicas importantes e que podem ser evitadas.

A substituição dos grãos secos moídos pela silagem de grãos reconstituídos em dietas de ruminantes, pode levar à um aumento na digestão do amido consumido e por consequência diminuição do amido nas fezes, no entanto, pode provocar modificações na dinâmica ruminal (DEBRABANDER et al., 1992). Para silagens de grãos, um aspecto importante a considerar, é a maior taxa de desaparecimento dos grãos provenientes de genótipos de endosperma macio em comparação à menor taxa observada para genótipos de endosperma duro, comumente encontrados no Brasil (KOTARSKI et al., 1992). Existe uma grande diferença no endosperma do sorgo em relação ao milho, principalmente na distribuição e concentração da proteína (prolamina) presente no grão, a qual concentra-se mais na camada periférica do endosperma, além de ser extremamente denso, espesso e duro (ROONEY; PFLUGFELDER, 1986). Essas características o deixam impermeável à água e à enzimas digestivas, o que propicia menor degradabilidade ruminal e valor nutritivo comparado ao milho (ROONEY; PFLUGFELDER, 1986).

A matriz proteica do milho e do sorgo é composta pelas zeínas e kafarinas, respectivamente, as quais são consideradas proteínas hidrofóbicas (HAMAKER et al., 1995). Assim, são insolúveis em fluído ruminal e responsáveis por dificultar a ação das enzimas secretadas pelos microrganismos ruminais (PHILIPPEAU et al., 1997; LARSON; HOFFMAN, 2008). A presença dessas prolaminas em maior quantidade no grão está relacionada à menor degradabilidade ruminal. O processo de ensilagem do grão tem por objetivo degradar essa proteína e a quantificação dela em silagens é um indicativo do correto processo fermentativo. Ao degradar essa proteína, os valores de $N-NH_3$ e N solúvel aumentam, sendo eles melhor aproveitados pelos ruminantes, especialmente para síntese de proteína microbiana, associado aos níveis de energia na dieta.

Em pesquisa com bovinos confinados, Benton et al. (2005) observaram maior degradabilidade ruminal da MS e da proteína nos tratamentos com silagem de grão úmido de milho e silagem de grão reconstituído, comparado ao tratamento controle (grão seco). Outro estudo realizado com silagem de grãos de sorgo obtiveram resultados semelhantes ao observado para o milho, porém com menor degradabilidade do amido no rúmen e maior no intestino delgado em resultados obtidos com bovinos de corte confinados (IGARASI, 2008).

O maior aproveitamento ruminal de grãos fermentados está diretamente relacionado à ocorrência de proteólise e de ataque enzimático, desencadeados pela fermentação dos grãos ensilados, o que leva à degradação da matriz proteica (PHILIPPEAU; MICHALET-DOREAU, 1998) e posteriormente facilita o acesso das bactérias ruminais (ARRIGONI et al., 1998).

Bush, Netemeyer e Adams publicaram dois artigos (1976, 1979) utilizando sorgo grão reconstituído para vacas leiteiras. Esses autores compararam o efeito de dietas com sorgo moído fino e reconstituído (grãos germinados e ensilados por três semanas) para vacas leiteiras. Os resultados obtidos ($p=0,05$) no primeiro experimento (1976) foi para o teor de gordura no leite, maior para o tratamento ensilado (3,81 vs. 3,75), fato não repetido no segundo experimento. Apesar de não ter havido significância e com valores abaixo do esperado observou-se, maior digestibilidade aparente da MS (64,9 vs. 63,5). Esse valor indica baixa digestibilidade da MS em dietas com sorgo grão reconstituído para vacas leiteiras, fato também observado no segundo experimento (1979) (63,4 vs. 60,5 para reconstituído e moído, respectivamente). Em ambos estudos não houve diferença para CMS e produção de leite.

Em estudos com grãos úmidos de milho, Oba e Allen (2003) verificaram redução (7,6%) no CMS para o tratamento com grãos ensilados vs. grão seco. Mesmo comportamento foi descrito na revisão de Ferrareto, Crump, Shaver (2013), onde o CMS de vacas leiteiras foi menor ($p=0,01$; 22,4 vs. 23,6 para silagem de grão úmido e grão moído na dieta). Outro fator, não avaliado pelos autores (BUSH et al., 1976, 1979) foi o teor de N ureico no leite (NUL), o qual tende a ser menor em dietas com grãos processados (FERRARETO; CRUMP; SHAVER, 2013). Da mesma forma, Moraes (2016) contrastou silagem de grãos de milho reconstituído, tratado ou não com benzoato de sódio vs. milho moído e observou ($p=0,01$) menor NUL para os tratamentos onde as vacas receberam silagem de grão reconstituído.

Contudo, é evidente a carência de pesquisas que abordam o desempenho de vacas leiteiras alimentadas com grãos de sorgo reconstituído, principalmente moído e ensilado. De modo geral, o uso de silagem de grãos de sorgo em dietas para vacas leiteiras pode ser atrativa, principalmente em relação ao seu menor custo de aquisição, quando comparado com o milho e os possíveis benefícios na produção leiteira. A busca por alternativas para melhorar o processo fermentativo e diminuir as perdas durante o processo é de importância fundamental.

Referências

- AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA AGROPECUÁRIA. **Produção de Milho e Sorgo para silagem no Estado de São Paulo**. Pesquisa e Tecnologia, Colina, v. 8, n. 2, 2011.
- AGUERRE, M.; CAJARVILLE, C.; REPETTO, J.L Impact of water addition, germination, ensiling and their association on sorghum grain nutritive value. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdã, v. 205, p. 75–81, 2015.
- ARRIGONI, M.D.; VIEIRA, P.; SILVEIRA, A.; FURLAN, L.; COSTA, C.; CHARDULO, A.; CURI, P. Estudos dos efeitos da restrição alimentar no desempenho de bovinos jovens confinados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, p. 987-992, 1998.
- BALOGUN, R.O.; ROWE, J.B.; BIRD, S.H. Fermentability and degradability of sorghum grain following soaking, aerobic or anaerobic treatment. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 120, p. 141–150, 2005.
- BENTON, J.R.; KLOPFENSTEIN, T.J.; ERICKSON, G.R. Effects of corn moisture and length of ensiling on dry matter digestibility and rumen degradable protein. **Nebraska Beef Cattle Reports**, Lincoln, v.151, p.31-33, 2005.
- BERNARDES, T. F.; REIS, R. A.; SIQUEIRA, G. R.; AMARAL, R. C.; PIRES, A. J. V. Estabilidade aeróbia da ração total e de silagens de capim-marandu tratadas com aditivos químicos e bacterianos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 4, p. 754-762, 2007.
- BUSH, L.J.; NETEMYER, D. T.; ADAMS, G. D. Reconstituted sorghum grain for lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 62, p. 1094-1097, 1979
- CARPENTER, C.E.; REDDY, D.S.A; CORNFORTH, D.P. Inactivation of clostridial ferredoxin and pyruvateferredoxin oxidoreductase by sodium nitrite. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, p.549. 1987.

CEPEA, CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. Indicadores de preço do milho. Disponível em: <<http://cepea.esalq.usp.br/milho/>>. Acesso em 15/05/16.

CUSTÓDIO, L. **Estratégias de controle de perdas em silagens de cana-de-açúcar** 2013. 90p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Conjuntura mensal de preços do sorgo período fevereiro 2015**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_03_17_08_44_51_sorgofevereiro2015.pdf> Acesso em: 15 maio 2016.

_____. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Relatório Janeiro de 2016, Brasília, v. 3, n. 4, 2016.

COSTA, C.; ARRIGONI, M.B.; SILVEIRA, A.C.; CHARDULO, L.A.L. Silagem de grãos úmidos. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 7., 1999. Local. **Anais...** local: editora, 1999. p.69-87.

DANIEL, J.L.P.; MORAIS, G.; FERNANDES, J.; CARVALHO, P.A.; NUSSIO, L.G. Additives in high moisture grain silages: A meta-analysis. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON BEEF CATTLE. 2012, São Pedro, SP. **Proceedings...** 2012, São Pedro, SP. Disponível em CD-ROM. 2012, 21p.

DANNER, H.; HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; BRAUN, R. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 562-567, 2003.

DEBRABANDER, D.L.; COTTYN, B.G.; BOUCQUE, C.H.V. Substitution of concentrates by ensiled high-moisture maize grain in dairy cattle diets. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v.38, p.57-67, 1992.

EMBRAPA. Cultivo do sorgo. 2008. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/sorgo_4_ed/plantio-plantio.htm> Acesso em: 15/05/16.

FERNANDES, J. **Influência de genótipo, maturidade e tempo de armazenamento na qualidade de silagens de grãos de milho com alta umidade**. 2014. 97p: il. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Piracicaba, 2014.

FERRARETTO, L. F.; CRUMP, P. M.; SHAVER, R. D. 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**, Champaign, v. 96, p. 533–550, 2013.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996, 182 p.

FILYA, I; ASHBELL, G; HEN, Y .et al. The effect of bacterial inoculants on the fermentation and aerobic stability of wholecrop wheat silage. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.88, p. 39-46, 2000.

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 silages. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 3575–3581. 2003.

FREDIN, S. M.; FERRARETTO, L. F.; AKINS, M. S.; HOFFMAN, P. C.; SHAVER, R. D. Fecal starch as an indicator of total-tract starch digestibility by lactating dairy cows, **Journal of Dairy Science**, Champaign, vol. 97, p.1862–1871, 2014.

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**, Saint Paul, v.72, p.583–588, 1995.

HALE, W.H. Influence of processing of the utilization of grains (starch) by ruminants. Tucson. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 37, p.1075-1083, 1973.

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

HILL, T.M., SCHMIDT, S.P., RUSSELL, R.W., THOMAS, E.E., WOLFE, D.F. Comparison of urea treatment with established methods of sorghum grain preservation and processing on site and extent of starch digestion by cattle. **Jounal Animal Science**, Champaign, v. 69, p. 4570–4576, 1991.

HUNTINGTON, G.B. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.75, p.52–867, 1997.

IGARASI, M.S.; ARRIGONI, M.B.; HADLICH, J.C. et al. Características de carcaça e parâmetros de qualidade de carne de bovinos jovens alimentados com grãos úmidos de milho ou sorgo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.3, p.520-528, 2008.

JASPER, S.P.; SEKI, A.S.; SILVA, P.R.A.; BIAGGIONI, M.A.M.; BENEZ, S.H.; COSTA, C. Comparação econômica da produção de grãos secos e silagem de grãos úmidos de milho cultivado em sistema de plantio direto. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.33, p.1385-1391, 2009.

JAY, J. M. Microbiologia moderna de los alimentos. **Zaragoza: Editorial Acribia**, 1994. 804p.

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

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 JR., L.; STOKES, M.R.; LIN, C.J. Silage additives. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 305-360.

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**, Champaign, v.89, p.4005-4013, 2006.

KOTARSKI, S.F.; WANISKA, R.D.; THURN, K.K. Starch hydrolysis by the ruminal microflora. **Journal Nutrition**, Amsterdam, v. 122, p. 178–190, 1992.

LARSON, L.; HOFFMAN, P. C. Technical note: a method to quantify prolamin proteins in corn that are negatively related to starch digestibility in ruminants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, Minnesota, v. 91, p. 4834-4839, 2008.

LIKOS, T.; VARGA, G.A. Effects of processing method on degradation characteristics of protein and carbohydrate sources in situ. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.78, p.1789-1801, 1995.

McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2nd. ed. Lincoln: Chalcombe Publ., 1991. 340 p.

McLEOD, K. R.; BALDWIN, R.; EL-KADI, S.; HARMON, D. Site of starch digestion: impact on energetic efficiency and glucose metabolism in beef and dairy cattle. (2006). Disponível em: <http://beefextension.com/proceedings/cattle_grains06/06-18.pdf> Acesso em: 14/05/16.

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

MORAIS, G. A fermentação de grãos de milho reidratados influenciada pela aplicação de aditivos: aspectos da conservação e do valor nutritivo para vacas leiteiras. 2016. 111p:il. **Tese (Doutorado)** - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Piracicaba, 2016.

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

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requirements of dairy cattle, Washington, 7th.ed. **National Academy Press**, 2001. 381p.

NETEMYER, D. T.; BUSH, L.J.; ADAMS, G. D. Feeding value of reconstituted and finely ground sorghum grain for dairy cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 60, p. 748-751, 1976

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

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**, Champaign, v.86, p.174-183, 2003.

OWENS, F.N.; SODERLUND, S. Ruminal and postruminal starch digestion by cattle. In: CATTLE GRAIN PROCESSING SYMPOSIUM. 2006, Stillwater. **Proceeding...** 2006, Stillwater. Disponível em: http://beefextension.com/proceedings/cattle_grains06/06-17.pdf. Acesso: 11 maio. 2014.

PFLUGFELDER, R.L.; ROONEY, L.W. The role of germination in sorghum reconstitution. Amsterdã, **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 14, p. 243–254, 1986.

PHILIPPEAU, C.; MICHALET-DOREAU B. Influence of genotype and stage of maturity on rate of ruminal starch degradation. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, 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**, Champaign, v.81, p.2178-2184, 1998.

REYNOLDS, C. K. Production and metabolic effects of site of starch digestion in lactating dairy cattle. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 130. p. 78-94, 2006.

REYNOLDS, C.K. Economics of visceral energy metabolism in ruminants: Toll keeping or internal revenue service. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 80, p. 74-84, 2002.

RIBEIRO, J.L. et al. Desenvolvimento de aditivos microbianos para ensilagem: realidade e perspectivas. In: REIS, R.A. et al. (Eds.). **Volumosos na produção de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2005. p.1-23.

ROONEY, L.W.; PFLUGFELDER, R.L. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 63, p.1607-1623, 1986.

SPOELSTRA, S.F. Nitrate in silage. **Grass and Forage Science**. Malden, v.40, p. 1-11, 1985.

SULLINS, R. D.; ROONEY, L. W.; RIGGS, J. K. Physical changes in the kernel during reconstitution of sorghum grain. **Cereal Chemistry**, Champaign, v. 48, p. 567-575, 1971.

SIMPSON JR, E.J.; SCHAKE, L.M.; PFLUGFELDER, R.L.; RIGGS, J.K. Evaluation of moisture uptake, aerobic and anaerobic phases of reconstitution upon sorghum grain digestibility and performance of steers. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 60, p. 877–882, 1985.

SCHONELL, E. P.; MORAIS, G.; SILVA, J.; MATTIELLO, T.; FRANDOLOSO, A.; TESTA, M.; DANIEL, J. L. P.; NUSSIO, L. **Effects of chemical and microbial additives on the conservation of reconstituted sorghum grain silage.** Proceedings. In: XVII International silage conference, Piracicaba, 2015.

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

VILELA, D. Aditivos na ensilagem. Centro Nacional de Pesquisa de gado de Leite, **EMBRAPA**, Coronel Pacheco, MG. Circular técnica nº 21, nov. 1984.

WEISS, B. When to consider silage additives, Tri-State Dairy Nutrition Conference, **Fort Wayne**, IN, USA. 1996, p.125-138.

WOOLFORD, M. K. Microbial screening of food preservatives, cold sterilants and specific antimicrobial agentes as potential silage additives. **Journal of Science of Food and Agriculture**, Malden, v. 26, 229-237, 1975.

ZINN, R.A.; BARRERAS, A.; CORONA, L.; OWENS, F.N.; WARE, R.A. Starch digestion by feedlot cattle: predictions from analysis of feed and fecal starch and nitrogen. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.85, p.1727-1730, 2007.

3 ADITIVOS QUÍMICOS E MICROBIANOS EM SILAGENS DE GRÃOS DE SORGO RECONSTITUÍDOS

Resumo

A ensilagem de grãos de sorgo reconstituídos pode apresentar fermentação inadequada, assim, aumentar a possibilidade de deterioração. A aplicação de aditivos pode contribuir para reduzir perdas, entretanto, são poucos os trabalhos com aditivos para esse tipo de silagem. Diante disso, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de aditivos químicos e microbianos sob a qualidade fermentativa e degradabilidade da MS de silagens de grãos de sorgo reconstituídos. Os grãos foram moídos e reconstituídos até atingir, em média, 65% de MS. Os tratamentos foram: (i) Controle (sem aditivos); (ii) *L. buchneri*, 5×10^5 ufc g⁻¹ MN (LB); (iii) *L. plantarum*, 5×10^5 ufc g⁻¹ MN (LP); (iv) LB + LP (Combo); (v) LB + 1,5 g de nitrito de sódio kg⁻¹ MN (LBNit) e (vi) benzoato de sódio, 2,0 g kg⁻¹, MN (BZ). Como silos experimentais, foram utilizados baldes plásticos de 6 L, com quatro repetições por tratamento em um delineamento inteiramente casualizado. Para a análise estatística, utilizou-se o procedimento MIXED do SAS, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Maiores taxas de degradabilidade ruminal foram obtidos para LB e Combo, os demais foram semelhantes ao Controle. Os tratamentos LBNit e BZ tiveram menores perdas fermentativas, embora a perda foi baixa para todos os tratamentos. Menores contagens de leveduras foram obtidos para os tratamentos LB, Combo, LBNit e BZ, o que explica a maior estabilidade aeróbia, a qual não reduziu com 240 h de avaliação. De maneira geral, as silagens inoculadas com *L. buchneri* ou tratadas com benzoato de sódio, apresentaram resultados satisfatórios quanto à manutenção da qualidade higiênica.

Palavras-chave: *L. buchneri*; *L. plantarum*; Nitrito de sódio; Benzoato de sódio; Degradabilidade da matéria seca

Abstract

Reconstituted sorghum grain silage may have inadequate fermentation resulting in higher losses. The use of additives can contribute to solve this problem, however, there are few reports evaluating additives for this type of silage. The aim of this study was to evaluate the effect of chemical and microbial additives on the fermentation and ruminal degradability of reconstituted sorghum grain silage. Sorghum grain were ground and rehydrated until 65% of DM. The treatments were: Control (without additives); *L. buchneri*, 5×10^5 cfu g⁻¹ FM (LB); *L. plantarum*, 5×10^5 cfu g⁻¹ FM (LP); LB + LP (Combo); LB + 1.5 g of sodium nitrite kg⁻¹ FM (LBNit) and sodium benzoate, 2.0 g kg⁻¹ FM (BZ). Experimental silos were made of plastic buckets (6 L), four replicates per treatment in a completely randomized design. The statistical analysis, were made using the Mixed procedure of SAS, the means were compared by Tukey test ($\alpha=0.05$). Higher ruminal degradability rates were obtained for LB and Combo treatments, the others treatments were similar to Control. The LBNit and BZ treatments had lower fermentation losses comparing with others treatments. Yeasts count were lower in LB, Combo, LBNit and BZ, which explains the higher aerobic stability even in 240 hours of evaluation. In general, the silages

inoculated with *L. buchneri* or treated with sodium benzoate, showed satisfactory results regarding the maintenance of hygienic quality.

Keywords: *L. buchneri*; *L. plantarum*; Sodium nitrite; Sodium benzoate; Dry matter degradation

3.1 Introdução

No que se refere a silagem de grãos reconstituídos, o processo natural de ensilagem desses grãos resulta em um perfil com poucos produtos de fermentação, o que pode propiciar maior crescimento de microrganismos indesejáveis no processo fermentativo, tais como leveduras, fungos e clostrídeos. Fernandes (2014), em pesquisa com grãos reidratados de milho, observou maior produção de ácido butírico, produto resultante do metabolismo de clostrídeos e com isso maiores perdas de MS quando comparados à grãos úmidos. Carvalho (2014) encontrou mais genes de clostrídeos em silagens de grãos reidratados, comprovando a maior participação desse microrganismo nas silagens.

Por se tratar de silagens com menor quantidade de produtos de fermentação, em comparação a silagens de milho (planta inteira), essa característica faz com que a massa ensilada esteja propensa a deterioração. McDonald et al. (1991) relata que elevadas concentrações de ácidos orgânicos são importantes para a conservação da silagem e para que isso seja alcançado, algumas características, relacionadas à massa ensilada, são importantes no processo fermentativo como: teor de carboidrato solúvel alto, capacidade tampão baixa e teor adequado de MS. Características essas raramente encontradas em grãos de milho ou de sorgo para ensilagem, por apresentarem menores teores de carboidrato solúvel e maiores teores de MS quando comparadas as silagens de milho planta inteira, por exemplo, o que por si só já estabelece limitação à fermentação.

Ressalta-se a importância do uso de aditivos, com o objetivo de modular a dinâmica de fermentação e diminuir perdas. As pesquisas com silagens de grãos reconstituídos ainda são escassas na literatura, principalmente no que se refere à escolha e uso de aditivos no momento da ensilagem. Vários aditivos foram desenvolvidos com o objetivo de auxiliar no processo de fermentação, contribuir na redução das perdas de MS durante a ensilagem, preservar o valor nutritivo da massa ensilada e aumentar a estabilidade aeróbica da silagem após a abertura dos silos (WEISS, 1996).

O uso de silagens de grãos reidratados tem trazido bons resultados para as propriedades que a adotaram, principalmente quanto a maior degradabilidade do amido no rúmen e trato total, o que se reflete em produtividade animal. Contudo, um dos maiores problemas enfrentados é a deterioração da massa após a abertura do silo, o que proporciona perdas de MS e energia, e que pode impactar o desempenho dos animais. Para essa primeira etapa da pesquisa, os objetivos foram avaliar, identificar e recomendar, eficientes aditivos para ensilagem de grãos de sorgo reconstituído disponíveis no mercado, com base na avaliação dos aspectos fermentativos e na degradabilidade ruminal *in-situ*.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Local, confecção das silagens e tratamentos

O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo (ESALQ/USP). Os grãos de sorgo tiveram origem no Estado de Goiás e apresentavam em média 91,16% de MS. Os grãos foram moídos em moinho de martelo com peneira de número 5 e armazenados em sacos plásticos até o momento da ensilagem. Após a moagem, determinou-se o tamanho médio de partículas por meio da agitação de duas amostras sobre um conjunto de peneiras com malhas de 4,0; 1,7; 1,18; 0,6; 0,42; 0,345; 0,105 e fundo (Adaptado de ZANOTTO; BELLAVER, 1996). O tamanho médio de partículas dos grãos de sorgo moídos para esse experimento foi de 1,67 mm, classificado como sorgo moído, de acordo com Litherland (2006) (Figura 1).

Figura 1 - Distribuição de partículas do sorgo grão moído utilizado na confecção das silagens

Para análise dos taninos totais, foram tomadas amostras de 5 g *in-natura* dos grãos de sorgo moídos, acondicionados em tubos tipo falcon, congeladas e enviadas para o Laboratório de Análise de Alimentos da ESALQ/USP. A metodologia utilizada é a do método da vanilina, de acordo com Nakamura et al. (2003) com leitura em espectrofotômetro à 500 nm, os valores foram expressos em taninos totais (%) por grama de amostra (Tabela 1). De acordo com os valores de taninos totais, considera-se que os grãos de sorgo utilizados neste experimento são de baixo tanino (0,5%). Magalhães et al. (2000) relata que percentuais abaixo de 0,7% são decorrentes de outros fenóis e não são capazes de prejudicar o desempenho animal.

No momento da ensilagem, seis tratamentos foram impostos: (1) controle sem aditivo (Controle); (2) (LB) *L. buchneri* na dose de 5×10^5 ufc g⁻¹ na matéria natural (MN) (cepa CNCM I - 4323- Lallemand Animal Nutrition); (3) *L. plantarum* 5×10^5 ufc g⁻¹ na MN (LP) (Sill All 4x4 WS – Altech®); (4) LB + LP ambos na dose 5×10^5 (Combo); (5) LB + Nitrito de sódio na dose de 1,5 g kg⁻¹ MN (LBNit) (Nitrito de sódio com pureza de 99%) e (6) benzoato de sódio na dose de 2,0 g kg⁻¹ MN (BZ) (99% de pureza).

Os cálculos de reidratação do sorgo foram realizados com o intuito de atingir 35% de umidade na massa, à partir da equação abaixo (1):

$$(1) \quad \text{Quantidade L/tonelada} = 1000 - \left(\frac{(100 - y) * 1000}{(10 - x)} \right)$$

Onde: y= matéria seca desejada (%)

x= matéria seca inicial (%)

Foi utilizada água deionizada, a qual foi quantificada com o auxílio de proveta. Os aditivos foram diluídos no total de água a ser adicionada na massa e em seguida homogeneizada manualmente. Para o tratamento sem aditivo (Controle) foi adicionado apenas água deionizada.

A ensilagem foi realizada em mini-silos experimentais com 8,0 cm de raio e 18 cm de altura, com capacidade para 3,6 L, dotados de tampa para vedação. Antes do processo de ensilagem, procedeu-se a pesagem dos mini-silos para obtenção da tara. A ensilagem foi realizada compactando-se a massa manualmente até atingir massa específica de $\pm 1000 \text{ kg de MN m}^{-3}$. Depois de cheios, compactados e vedados, os mesmos tiveram novamente seu peso quantificado para posterior avaliação das perdas totais de MS e gases. Após 90 d de estocagem, os silos tiveram novamente seu peso avaliado, abertos e realizadas as avaliações planejadas. Durante o armazenamento, os silos foram mantidos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz e calor até o momento da abertura.

O delineamento experimental utilizado nos mini-silos foi inteiramente aleatorizado, com seis tratamentos e quatro repetições, totalizando 24 unidades experimentais.

3.2.2 Análises dos grãos frescos reconstituídos e dos mini-silos

Amostras dos grãos de sorgo antes da ensilagem e das silagens após a abertura foram coletadas para determinação da composição químico-bromatológica (Tabela 1). O peso das amostras foi quantificado e essas foram desidratadas em estufa de circulação forçada a 55°C por 72 h para determinação da MS em estufa. Após a secagem, o material foi processado em moinho de facas tipo Willey com peneira de malha 1,0 mm. A determinação do teor de MS total foi realizada por secagem em estufa a 105°C durante 12 h (AMERICAN OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTRY - AOAC, 2000). As cinzas foram obtidas por combustão das amostras a 600°C durante 4 h (AOAC, 1997). A análise de proteína bruta foi realizada pelo

método de combustão de Dumas (Leco 2000, Leco Instruments Inc). O extrato etéreo (EE), determinado pelo método de extração Soxhlet segundo AOAC (1997). A fibra em detergente neutro (FDN) foi obtida segundo Van Soest et al. (1991), utilizando-se sulfito de sódio e α -amilase. A análise de carboidratos solúveis em etanol foi realizada conforme metodologia descrita por Hall (2000).

Foram coletadas amostras para extração e quantificação das proteínas de reservas (prolaminas) de amostras dos grãos moídos de sorgo antes da ensilagem e das silagens. Após a abertura dos silos para a extração das prolaminas, as amostras foram moídas em moinho tipo Wiley com peneira de malha 1 mm de acordo com Nellis (2013). A concentração de proteína foi quantificada com o kit da Bio-Rad, segundo metodologia de Bradford (1976), utilizando zeína (Zeín, Sigma Aldrich®) como padrão. Os valores foram determinados em relação à regressão da curva padrão de concentrações conhecidas de zeína.

O teor de proteína solúvel (PB-solúvel) das amostras foi determinada por meio da imersão de 500 mg de amostra em 5 mL de solução de álcool terciário e 50 mL de solução líquida de borato-fosfato (KRISHNAMOORTHY et al., 1982). A proteína ligada a fibra em detergente neutro e em detergente ácido foi determinada no resíduo após lavagem nos respectivos detergentes, conforme metodologia de Van Soest (1991) e filtradas em papel filtro Wathmman 541. Todas as frações protéicas foram determinadas por meio da digestão, destilação e titulação em equipamento Macro-Kjeldhal. Para a determinação da fração N-NH₃ na amostra fresca, procedeu-se a destilação em equipamento Macro-Kjeldhal, juntamente com 2 g de MgO.

Para avaliação do perfil microbiano das amostras dos grãos e das silagens foram feitas diluições 1:10, por meio da adição de 225 g de água deionizada estéril em 25 g de amostra fresca, a qual foi homogeneizada durante 4 minutos em homogeneizador de alimentos (Nova Ética®, Vargem Grande Paulista, Brasil). Foram realizadas diluições decimais sequenciais (10^{-1} a 10^{-6}), procedendo o plaqueamento em triplicata. Como meio de cultura utilizou-se: Ágar Malt para contagem de leveduras e bolores; MRS ágar para contagem de BAL; RCM ágar enriquecido com vermelho neutro e cicloserina para contagem de clostrídeos (JONSSON, 1990). Nesse mesmo extrato aquoso procedeu-se também a leitura do pH, em equipamento digital marca Digimed DM-22®, previamente calibrado.

Os teores de ácido acético, propiônico, butírico e demais produtos de fermentação foram determinados no extrato aquoso após filtragem em gaze e centrifugação, por meio de cromatografia gasosa com detector de massas (GC-MS) (GCMS QP 2010 plus, Shimadzu®, Kyoto, Japan), utilizando coluna capilar (Stabilwax, Restek®, Bellefonte, USA; 60 m, 0,25 mm ø, 0,25 µm crossbond carbowax polyethylene glycol). O teor de ácido láctico foi determinado por método colorimétrico (PRYCE, 1969).

Para o cálculo de matéria seca em estufa 55 °C, corrigida para produtos voláteis, utilizou-se a fórmula proposta por Weissbach (2009) (2), onde ácidos graxos voláteis incluem: ácido acético, propiônico, iso-butírico, butírico, iso-valérico e valérico.

$$(2) \text{ MS corrigida (\%MV)} = \text{MS estufa (\%MV)} + 0,08 \times \text{ácido láctico (\%MV)} + 0,77 \times \text{1,2-propanodiol (\%MV)} + 0,87 \times \text{2,3-butanodiol (\%MV)} + 0,95 \times \text{ácidos graxos voláteis* (\%MV)} + \text{lactato de etila (\%MV)} + \text{1-propanol (\%MV)} + \text{2-butanol (\%MV)} + \text{acetato de propila (\%MV)} + \text{etanol (\%MV)} + \text{álcool iso-propílico (\%MV)} + \text{acetato de etila (\%MV)} + \text{acetona (\%MV)}.$$

Para avaliação da estabilidade aeróbia, foram tomadas amostras de 1,5 kg das silagens de cada unidade experimental, dispostas sem compactação em baldes plásticos abertos, mantidos em sala climatizada a 25 ± 1 °C por 240 h. As temperaturas foram mensuradas a cada 30 min., com o uso de data loggers (modelo: *Novus tagtemp®*) inseridos no centro geométrico da massa. A estabilidade foi definida como o tempo (h) necessário para elevação da temperatura da massa em 2 °C em relação à temperatura ambiente. Adicionalmente avaliou-se: temperatura máxima alcançada pela massa (TMax), tempo necessário para a massa atingir a temperatura máxima (HTmax), acúmulo de temperatura em 5 d (AC5d) e 10 d (AC10d) de exposição aeróbia, além da perda de MS durante as 240 h de exposição aeróbia.

Tabela 1 - Composição químico-bromatológica, perfil microbiano e caracterização física dos grãos de sorgo antes do processo de ensilagem

Item	Média e desvio padrão
Química/bromatológica	
Matéria seca, %	91,16 ± 0,72
Matéria mineral, % MS	1,75 ± 0,15
Proteína bruta, % MS	7,80 ± 0,06
Proteína bruta solúvel, % PB	8,78 ± 0,35
Nitrogênio insolúvel FDN, % PB	32,28 ± 1,30
Extrato etéreo, % MS	3,79 ± 0,49
Fibra em detergente neutro, % MS	6,96 ± 0,41
Carboidrato não fibroso, % MS	79,68 ± 1,06
Carboidratos solúveis, % MS	7,40 ± 0,34
Prolaminas, % MS	8,27 ± 0,42
Taninos totais, % da amostra in-natura	0,54 ± 0,43
Caracterização física	
Peso 100 grãos, g	2,39 ± 0,12
Tamanho médio de partícula da moagem dos grãos, mm	1,67 ± 0,02
Perfil microbiano	
BAL, log ufc g ⁻¹	6,4 ± 0,11
Fungos, log ufc g ⁻¹	4,7 ± 0,06
Leveduras, log ufc g ⁻¹	4,2 ± 0,46

MS: matéria seca; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro

3.2.3 Avaliação da degradabilidade *in situ*

O ensaio de degradabilidade *in situ* da MS foi realizado nos grãos de sorgo secos e moídos antes da ensilagem e das silagens de sorgo grão reconstituído tratadas ou não com aditivos após 90 d de estocagem. Para isso, utilizou-se duas vacas da raça Holandesa em lactação, providas de cânula ruminal, mantidas em baias individuais do tipo *tie-stall*, equipadas com bebedouro e cochos individuais. Foram quantificados 5 g de amostras e acondicionadas em sacos de náilon náilon (20cm por 10cm, com porosidade de 30 µm), após a quantificação do peso das amostras, os sacos foram selados e amarrados com a utilização de barbante elástico de látex. Os mesmos foram mantidos sob refrigeração e retirados somente 2 h antes do horário da incubação, os tempos de incubação foram: 0, 12, 24 e 48 h. Os sacos foram incubados de forma reversa aos tempos e retirados em uma única vez. Após a remoção dos sacos do rúmen, os mesmos foram imersos em gelo e posteriormente lavados juntamente com os sacos referentes ao tempo zero (AFRC, 1992). Após a lavagem, os sacos com as amostras foram levados até estufa de circulação de ar e mantidas durante 72 h à 55° C, após esse período tiveram

novamente seu peso quantificado e por diferença calculou-se a degradação de MS em % para cada tempo de incubação.

Para obtenção dos parâmetros de degradabilidade, foi utilizado o modelo proposto por Orskov e McDonald (1979) (3).

$$(3) Y(t) = a + b(1 - e^{-k_d \cdot t}) \geq t;$$

Sendo:

$Y(t)$ = degradabilidade potencial estimada;

$a + b$ = fração potencialmente degradável;

e = número neperiano (2,7182);

k_d = taxa de degradação (h^{-1});

t = tempo de incubação (h).

À partir dos dados de degradação para cada tempo, obteve-se as frações solúvel (A) = 100% (massa inicial) – resíduo do tempo zero (massa final); fração insolúvel (C) = resíduo do tempo 48h; fração potencialmente degradável (B): $100 - (A + C)$.

A degradabilidade potencial (%) = $100 - C$ e degradabilidade efetiva = $A + B [k_d / (k_d + k_p)]$ foram calculados de acordo com Ogden et al. (2005).

3.2.4 Análises estatísticas

A análise dos dados das amostras dos silos experimentais foi realizada pelo procedimento MIXED do SAS e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + \varepsilon_{(i)k}$$

Em que:

Y_{ijk} = valores observados para as variáveis no nível i de tratamentos, na repetição k ;

μ = média comum a todas as observações;

A_i = efeito fixo do nível i de tratamentos (i = Controle, LB, LP, Combo, LBNit, BZ);

$\varepsilon_{(i)k}$ = resíduo.

O ensaio de degradação *in situ* das silagens foram avaliados por delineamento em blocos casualizados (DBC). O modelo incluiu efeito fixo de tratamento (Controle, LB, LP, Combo, LBNit ou BZ), efeito fixo do bloco (vaca A ou B), e a interação variável x tratamento. O termo de erro testado foi a interação vaca x tratamento. Da mesma forma, foram avaliadas quatro estruturas de covariância (VC, CS, AR (1) e UN), tendo sido escolhida a estrutura CS (Heterogeneous Compound Symmetry), com base no menor valor do critério de Akaike.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Degradabilidade *in situ* da matéria seca

As silagens inoculadas com *L. buchneri* (LB) ou em associação com *L. plantarum* (Combo) promoveram maiores valores de fração solúvel da MS (A) em relação aos outros tratamentos (Tabela 2). Esse efeito é reflexo da maior solubilização da matriz proteica obtida nesses tratamentos, prova disso, foram os maiores valores de N solúvel obtidos para LB e Combo (Tabela 3). Quanto à fração (A) obtida no tratamento BZ, o mesmo não diferiu estatisticamente do LP e Controle ensilado. Já para o tratamento com nitrito de sódio, houve diminuição da fração (A) dessa silagem, com aumento considerado na fração B, a qual foi semelhante do sorgo seco moído (Tabela 2).

Tabela 2 - Influência do sorgo grão moído seco, reconstituído e ensilado ou não com aditivos sobre a fração solúvel (A), fração potencialmente degradável (B), fração indigestível (C), taxa de degradação, degradação potencial (Deg_{pot}) da MS e degradabilidade efetiva (DEGEf)

Variável	Tratamentos							EPM	P-valor
	Controle	LB	LP	Combo	LBNit	BZ	SGM		
A (%)	34,24b	47,06a	36,80b	48,16a	29,37c	34,18b	16,87d	0,89	<0,01
B (%)	52,44b	43,37c	52,30b	41,92c	60,28a	56,92b	61,84a	2,78	<0,01
C (%)	13,31b	9,56b	10,88b	9,90b	10,33b	8,89b	21,28a	2,31	<0,01
Kd (% h ⁻¹)	3,33bc	4,11b	3,35bc	5,09a	2,83c	3,31bc	2,62c	0,25	<0,01
DEG _{pot} (%)	86,68a	90,43a	89,11a	90,09a	89,66a	91,10a	78,72b	2,31	<0,01
DEGEf, 2% h ⁻¹	66,79b	76,29a	69,57b	78,08a	64,62b	69,00b	52,02c	1,71	<0,01
DEGEf, 5% h ⁻¹	55,04b	66,69a	57,81b	69,15a	51,14b	56,42b	38,21c	1,27	<0,01
DEGEf, 8% h ⁻¹	49,53bc	61,84a	52,27b	64,35a	45,12c	50,56b	32,19d	1,04	<0,01

Controle: tratamento sem aditivo; LB: *L. buchneri*; LP: *L. plantarum*; Combo: LB+LP; LBNit: *L. buchneri* + nitrito de sódio; BZ: benzoato de sódio; SGM: sorgo grão moído; A: fração solúvel; B: fração potencialmente digestível; C: fração indigestível; DEG_{pot}: (100 - C). DEGEf: estimada de acordo com a taxa de passagem para cada tratamento de acordo com a fórmula de Ogden et al. (2005). Médias seguidas de mesma letra na linha são semelhantes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. EPM = 2,82, p<0,01 para Tratamento x Tempo de incubação.

Quanto ao tratamento sorgo moído seco (SGM), o mesmo apresentou fração solúvel reduzida, resultado que comprova que a ensilagem é um método eficiente em promover maior disponibilidade da MS no rúmen, bem como, da boa resposta que o sorgo apresenta, frente à um método de processamento (PFLUGFELDER E ROONEY, 1986). Arrigoni et al. (1998) relata que a ensilagem de grãos úmidos é capaz de aumentar a degradabilidade da MS devido à quebra da matriz proteica, expondo o grão ao ataque dos microrganismos ruminais. Tal fato foi observado nesse estudo, onde os valores de N- solúvel e N-NH₃ foram superiores para os tratamentos ensilados, especialmente com aditivos microbianos (Tabela 3).

Quanto à fração potencialmente degradável no rúmen (B), o tratamento LBNit e o sorgo moído seco (SGM), foram os que apresentaram valores estatisticamente superiores, não variando entre si (Tabela 2). Entretanto, para o SGM, a fração insolúvel (C) foi superior, o que infere menor disponibilidade e degradabilidade da MS para o não tratado, com base na degradabilidade potencial obtida (78,72%) (Tabela 2). Valores de frações B e C obtidas no tratamento BZ, apontam resultado positivo quanto ao uso desse aditivo em silagens para a alimentação animal. Teoricamente, menores valores de fração solúvel, sem aumentar a fração insolúvel, podem ser benéficos do ponto de vista de saúde ruminal. Nesse cenário, o amido é lentamente degradado e o pH ruminal não cai bruscamente, favorecendo a atividade de muitas bactérias, especialmente as fibrolíticas. De maneira geral, os dados de fração C para os tratamentos ensilados, mostraram superioridade em relação ao sorgo moído seco.

Com base nos resultados obtidos nesse estudo, observou-se que as silagens tratadas com *L. buchneri* exclusivo ou em associação com outros microrganismos (Combo) promoveram maiores taxas de degradação, comparado aos outros tratamentos (Tabela 2). As taxas de degradação para esses tratamentos (Kd h⁻¹) mostraram os efeitos já obtidos na variável fração A, com maiores taxas de degradação para Combo e LB. Para os tratamentos Controle, LP, BZ, LBNit e SGM, os resultados foram estatisticamente semelhantes. Com base nisso, pode-se afirmar que o *L. buchneri* teve efeito positivo sob o aumento da degradação da MS de grãos de sorgo. É esperado maiores taxas de degradação da MS e de outros nutrientes em grãos processados. Em estudo com grãos úmidos de milho, Ladely et al. (1995) encontraram taxas de digestão do amido *in vitro* 76% mais rápida que o milho grão quebrado (9,7 vs. 5,5% h⁻¹, respectivamente).

Quanto aos valores obtidos para degradabilidade potencial (DEG_{pot}), os tratamentos ensilados foram superiores (89,51%) em relação ao não ensilado (78,72%) (Tabela 2), não apresentando diferença estatística entre os tratamentos ensilados. Em estudo semelhante, porém com silagens de grãos de milho reconstituído, Moraes (2016) encontrou maiores valores de degradabilidade potencial para o tratamento LB, seguido do Combo. Nesses tratamentos a autora sugere que a maior degradabilidade ruminal da MS para esses tratamentos, foi ocasionada pelos menores valores de prolamina e proteína ligada à fibra para essas silagens, supostamente por uma solubilização da matriz proteica. Esse resultado corrobora aos obtidos no presente estudo, onde os valores N solúvel foram superiores para os tratamentos com aditivos microbianos, especialmente (LB, LP e Combo). Em outro estudo, Passini et al. (2002) encontraram degradabilidade potencial da MS inferior para o tratamento com silagem de grãos úmidos de sorgo vs. moído fino (96,71 vs. 99,83%, $p=0,02$).

O período de estocagem das silagens é um fator diretamente relacionado à degradabilidade da MS no rúmen. Benton, Klopfentein e Erickson (2005) em pesquisa com grãos úmidos de milho, observaram aumentos na degradabilidade da MS até os 28 d de estocagem e aumento progressivo até os 372 d de armazenamento. Ainda, os autores relatam uma maior degradação nas silagens que apresentaram 30% de umidade vs. 24%. Contrário à esse resultado, Fernandes (2014) em trabalho com grãos úmidos de milho, não observou diferença quanto a interação período de estocagem e degradabilidade da MS.

A degradabilidade efetiva da MS obtida através do modelo proposto por Orskov e McDonald (1979) mostrou superioridade para os tratamentos ensilados vs. sorgo moído seco, em todas as taxas de passagens (K_p) consideradas (2, 5 e 8 % h^{-1}). Os tratamentos com aditivos microbianos (LB e Combo) apresentaram degradação da MS superiores em todas as taxas de passagens. Os tratamentos Controle, LP, LBNit e BZ foram semelhantes para K_p de 2 e 5 % h^{-1} . Ao considerar uma taxa de passagem de 8 % h^{-1} , o tratamento LBNit foi inferior aos outros ensilados, porém superior ao SGM.

Em estudo com silagens de grãos úmidos de sorgo, Passini et al. (2002) encontraram degradabilidade efetiva inferior quando comparado ao sorgo moído fino ($p<0,01$). Já quando testou-se a degradabilidade efetiva para grãos úmidos de milho, os resultados foram contrários, com maiores valores para o tratamento ensilado.

Esses resultados negativos para o tratamento com sorgo ensilado se deve ao tamanho de partícula adotado pelos autores, os tratamentos ensilados apresentavam 5 mm, já o moído fino 0,2 mm. Dessa forma, uma melhor resposta era esperada para o moído fino. Entretanto os dados obtidos para o tratamento com milho grão, sugerem uma melhor efetividade do processamento úmido desses grãos (ensilagem) no aproveitamento ruminal da MS. Com base nessa afirmação, os dados obtidos no presente estudo, apontam uma significativa melhora no aproveitamento da MS de grãos de sorgo, já que adotou-se o mesmo tamanho de partícula em ambos os tratamentos ensilados e o incubado seco no rúmen.

3.3.2 Aspectos fermentativos

A composição química das silagens, tratadas com aditivos químicos e microbianos estão apresentadas na Tabela 3. O teor de MS das silagens variou entre os tratamentos em 0,61 pontos percentuais, suficiente para diferir estatisticamente, porém este resultado não pareceu influenciar nos resultados obtidos. Quando corrigiu-se a MS para produtos de fermentação (MSc), essa diferença é anulada entre os tratamentos ($p=0,17$).

Quanto aos valores de EE, os mesmos apresentaram diferença estatística entre os tratamentos ($p<0,01$) (Tabela 3), porém isso não é suportado pela literatura. O maior valor de PB para o tratamento LBNit pode ser atribuído a composição e efeito do nitrito de sódio no aumento do N total, já que o mesmo foi determinado pelo método de combustão de Dumas (Leco 2000, Leco Instruments Inc) (Tabela 3).

Os valores médio de prolamina obtido na amostra de grãos de sorgo moído seco foi de 8,27%. As silagens inoculadas com LB e LP (Combo) apresentaram maiores valores de prolaminas (7,28%) (Tabela 3). Entretanto, esses valores obtidos foram menores que o reportado para o grão seco. Por outro lado, os menores valores obtidos foram encontrados nos tratamentos LBNit e BZ não é esperado, haja visto que esses tratamentos, por serem aditivos químicos, sua atuação visa a inibição ou diminuição da proteólise nos grãos, a qual em suma é realizada pelos microrganismos.

Tal fato é suportado na literatura, onde em um recente estudo de Junges et al. (2015), onde foi isolado e quantificado a contribuição de diferentes fontes proteolíticas no processo de ensilagem de grãos de milho reidratados, observou-se

maior ação das proteases de origem bacteriana. Dessa forma, os aditivos químicos, tal como benzoato de sódio e nitrito de sódio, por ter sua ação inibitória nos microrganismos, deveriam proporcionar fermentação e proteólise menos intensa.

Tabela 3 - Composição químico bromatológica das silagens tratadas com diferentes aditivos

Item	Tratamentos						EPM	P-valor
	Controle	LB	LP	Combo	LBNit	BZ		
MS, % MN	67,43ab	66,41b	67,41ab	66,54b	67,55ab	67,99a	0,27	<0,01
MSc, %	68,13	68,55	67,98	69,04	68,69	68,29	0,29	0,17
MM, % MS	1,24	1,24	1,29	1,29	1,39	1,32	0,04	0,31
EE, % MS	3,16ab	3,21ab	3,58a	3,07b	3,56a	3,56a	0,10	<0,01
PB, % MS	7,75ab	7,80ab	7,92ab	7,93ab	7,97a	7,54b	0,09	0,03
Prolaminas, %MS	5,28c	5,69bc	6,20b	7,28a	2,97d	2,80d	0,20	<0,01
PB-Solúvel, % PB	14,38b	21,76a	19,88a	19,36a	14,47b	7,23c	0,75	<0,01
NIDN, % N total	21,82cd	18,01d	22,61c	19,99cd	26,99b	37,83a	0,89	<0,01
NIDA, % N total	25,59ab	23,1abc	24,50ab	25,97a	20,66c	22,92bc	0,64	<0,01
N-NH ₃ , % N total	5,12b	6,74a	4,74b	7,47a	5,30b	4,79b	0,18	<0,01
FDN, % MS	7,45a	6,43b	6,91ab	6,76b	7,04ab	7,52a	0,15	<0,01
CS, %MS	2,21d	3,84b	4,88a	3,39bc	3,19c	4,56a	0,10	<0,01
CNF, % MS	80,38ab	81,29a	80,28ab	80,94ab	80,02b	80,05b	0,25	0,01

MS: matéria seca; MSc: matéria seca corrigida para voláteis; MM: matéria mineral; PB: proteína bruta; NIDN: nitrogênio insolúvel em detergente neutro; NIDA: nitrogênio insolúvel em detergente ácido; FDN: fibra em detergente neutro; EE: extrato etéreo; CNF: carboidratos não fibrosos; CS: carboidratos solúveis; Controle: tratamento sem aditivo; LB: *L. buchneri*; LP: *L. plantarum*; Combo: LB+LP; LBNit: *L. buchneri* + nitrito de sódio; BZ: benzoato de sódio. Médias seguidas de mesma letra na linha são semelhantes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Nesse estudo, os valores de prolaminas ficaram acima do que é esperado, explicado pela técnica utilizada para sua determinação, como citado anteriormente. Por outro lado, outras formas de elucidar a proteólise ocorrida nos grãos são os valores de PB-solúvel e N-NH₃, os quais foram maiores ($p<0,01$) para os tratamentos com aditivos microbianos, especialmente *L. buchneri* individual ou combinado (Combo). Já os menores valores de PB-solúvel foram obtidos para os tratamentos com aditivos químicos, especialmente BZ, resposta já esperada. Para o LBNit, não houve efeito em relação ao controle, dessa forma pode-se afirmar que o *L. buchneri* combinado nesse tratamento houve efeito relativamente positivo. Os valores de N-NH₃ para os outros tratamentos (Controle, LP, LBNit e BZ) não variaram entre si, o que mostra que houve atividade de proteólise nesses tratamentos, porém não convertida à N solúvel e sim passível de ser volatilizada na forma de N-NH₃.

Morais (2016) encontrou resultados semelhantes à esse estudo, onde os aditivos com bactérias heteroláticas (LB) apresentaram menores valores de

prolaminas e maiores de PB solúvel. Dessa forma, silagens de grãos inoculadas com *L. buchneri* são mais eficientes em desencadear proteólise no silo (MORAIS, 2016). Contudo, ao observar os dados do presente estudo, referentes à inoculação de grãos de sorgo com *L. plantarum* (LP), se verificam valores de PB solúvel semelhantes estatisticamente em relação ao LB.

Já para os dados de NIDN, os valores mostraram superioridade para o tratamento LB, em diminuir os valores de proteína ligada à fibra, com menores valores em relação ao LP, LBNit e BZ. Esse resultado aponta para uma maior disponibilidade de N nas silagens inoculadas com LB em relação às demais. Para o tratamento BZ, obteve-se valores relativamente altos de NIDN (37,83%) como também de FDN (7,52%), dessa forma sua degradabilidade a nível de rúmen poderia ser prejudicada ou dependente de taxa de passagem. Tal fato pode ser observado no ensaio de degradabilidade *in situ* nesse experimento, onde obteve-se para o tratamento BZ, menores valores de degradabilidade em até 12 h de incubação.

Embora as silagens inoculadas com LB e Combo apresentaram melhores valores de degradabilidade ruminal da MS e a comprovação que houve maior atividade proteolítica nesses tratamentos, conforme discutido anteriormente, os valores de pH dessas silagens foram superiores ($p < 0,01$) aos demais tratamentos (Tabela 4), o qual foi maior para o Combo, seguido pelo LB. Moraes (2016) encontrou valores semelhantes, porém em seu experimento os maiores valores de pH foram obtidos para o tratamento LB.

Esse maior valor de pH em silagens inoculadas com *L. buchneri* é esperado, haja visto que o principal produto de fermentação dessas bactérias é o ácido acético, o qual tem pK_a de 4,76 (LEHNINGER; NELSON; COX, 2013). Já para inoculantes à base de bactérias homoláticas, tais como *L. plantarum*, onde o principal produto de fermentação dessas bactérias é o ácido lático o pH tende a ser menor, pois o pK_a desse ácido é menor (3,86) (LEHNINGER; NELSON; COX, 2013).

O tratamento contendo *L. plantarum* não foi eficiente em aumentar a contagem de BAL nas silagens. Resultado semelhante foi obtido por Moraes (2016), onde a contagem de BAL foi menor para as silagens inoculadas com esse microrganismo. Moraes (2016) aponta em sua revisão que são esperados resultados contrários na literatura, onde com a presença de *L. plantarum*, espera-se silagens com menor pH, aumento de ácido lático e maior contagem de BAL. Embora tenha-

se obtido menores contagens de BAL para o tratamento LP, esse resultado não afetou na produção de ácido láctico, a qual foi maior para esse tratamento (Tabela 6).

Tabela 4 - Teores de matéria seca em estufa e corrigida para produtos de fermentação, pH, microbiologia e perdas fermentativas das silagens de sorgo grãos reconstituídos tratadas com aditivos

Item	Tratamentos						EPM	P-valor
	Controle	LB	LP	Combo	LBNit	BZ		
MS, % MN	67,43ab	66,41b	67,41ab	66,54b	67,55ab	67,99a	0,27	<0,01
MS _c , %	68,13	68,55	67,98	69,04	68,69	68,29	0,29	0,17
pH	3,96 ^c	4,34 ^b	3,96 ^c	4,40 ^a	3,98 ^c	4,01 ^c	0,01	<0,01
BAL, log ufc g ⁻¹	6,67 ^{ab}	6,98 ^{ab}	4,86 ^b	7,18 ^{ab}	7,92 ^a	6,64 ^{ab}	0,55	0,03
Fungos, log ufc g ⁻¹	4,23	3,87	4,3	4,08	4,32	4,48 ^a	0,47	0,96
Leveduras, log ufc g ⁻¹	4,74 ^a	<2,0 ^b	4,6 ^a	<2,0 ^b	<2,0 ^b	<2,0 ^b	0,06	<0,01
Clostrídeos, log ufc g ⁻¹	2,56	2,29	2,41	2,52	2,79	<2,0	0,31	0,53
Perdas fermentativas, %	0,73 ^c	1,40 ^a	0,62 ^d	1,34 ^b	0,52 ^e	0,20 ^f	0,01	<0,01

MS: matéria seca; MN: matéria natural; MS_c: matéria seca corrigida para compostos voláteis; ufc: unidades formadoras de colônias; Controle: tratamento sem aditivo; LB: *L. buchneri*; LP: *L. plantarum*; Combo: LB+LP; LBNit: *L. buchneri* + nitrato de sódio; BZ: benzoato de sódio. Médias seguidas de mesma letra na linha, são semelhantes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

A contagem de fungos foi semelhante entre os tratamentos ($p=0,96$) (Tabela 4), haja visto da ótima vedação que mini silos experimentais são capazes de proporcionar. No entanto, para contagem de leveduras, houve maior controle do crescimento desses microrganismos nas silagens tratadas com *L. buchneri* exclusivamente ou combinados com outros aditivos (Combo e LBNit), com contagens inferiores a 2,0 ufc g⁻¹. O ácido acético, principal produto do metabolismo das bactérias heteroláticas, tal como o *L. buchneri*, tem ótimas propriedades antifúngicas. Este ácido age inibindo o crescimento de leveduras nas silagens, por provocar o desequilíbrio iônico da célula (WOOLFORD, 1975). Outro aditivo que teve efeito positivo sob o controle do crescimento de leveduras foi o benzoato de sódio, se assemelhando um efeito aos tratamentos mencionados.

Não houve diferença estatística quanto à contagem de clostrídeos nas silagens de grãos de sorgo (Tabela 4). Embora os valores encontrados tenham sido baixos, numericamente o tratamento BZ apresentou contagem inferior aos demais tratamentos (<2,0 ufc g⁻¹). Os valores encontrados para população de clostrídeos, não reflete às significâncias entre tratamentos obtidas para produção de ácido butírico, principal produto de fermentação de clostrídeos (Tabela 6). O que sugere ter havido possivelmente, em algum momento, durante o período de estocagem crescimento de clostrídeos, principalmente nas silagens dos tratamentos Controle e

LB. Os demais tratamentos não variaram entre si, sendo que o LBNit e Combo foram os que apresentaram menores valores de ácido butírico. Desse modo pode-se afirmar que as contagens de clostrídeos realizadas em laboratório, muitas vezes não equivalem as atividades desses microrganismos no silo. Tal fato é suportado por Moraes (2016) que encontrou contagens de clostrídeos e teores de ácido butírico igualmente discrepantes. Nesse processo, entretanto, não se pode descartar a contaminação ambiental por época de manipulação das amostras.

Quanto às perdas fermentativas (Tabela 4), pode-se afirmar que a silagem de grãos de sorgo reconstituído é uma técnica eficaz de armazenamento e processamento do grão, prova disso são as baixas perdas de MS alcançadas (0,2-1,4%) e os ótimos valores de degradabilidade potencial da MS obtidas nesse experimento, superiores estatisticamente em relação ao sorgo seco moído (Tabela 2). O aditivo benzoato de sódio foi eficiente em conservar os grãos com menos perdas, embora sem inferir em melhoras em seu valor nutritivo, quando comparado aos outros tratamentos. Silagens inoculadas exclusivamente com *L. buchneri*, apresentaram maiores perdas em comparação aos outros aditivos, seguido pelo tratamento Combo. Observa-se efeito interessante do nitrito de sódio na conservação das silagens (LBNit), com perdas de 0,52%. Diante desse resultado, pode-se afirmar que esse aditivo inibiu os efeitos típicos do *L. buchneri* aplicado exclusivamente, de onde se esperava maior perda de MS em comparação ao uso de aditivos químicos.

O fato de bactérias heteroláticas, tal como o *L. buchneri* resulta em maior perda de MS em relação aos outros aditivos é suportada pelo seu metabolismo fermentativo. O processo de fermentação realizado no silo, desencadeado pelas bactérias heteroláticas presentes no silo, fermentam e utilizam os açúcares presentes na massa ensilada produzindo principalmente ácido acético. Nesse processo envolve a liberação de CO₂ para o ambiente (SALMINEN; WRIGHT; OUWEHAND, 2004), que está relacionado com a ocorrência de perda de MS ensilada.

Os dados de estabilidade aeróbia e perda de MS durante exposição ao ar estão apresentados na Tabela 5. Silagens inoculadas com *L. buchneri* exclusivamente ou associada a outros aditivos (Combo e LBNit) não apresentaram quebra de estabilidade após 10 dias de exposição ao ar. Silagens tratadas com benzoato de sódio (BZ) também apresentaram o mesmo comportamento de

estabilidade. O aditivo *L. plantarum* reduziu a estabilidade aeróbia em relação ao tratamento Controle, apesar de não ter apresentado diferença quanto a população de fungos, leveduras e teor de ácido láctico (Tabelas 4 e 6). As perdas de MS ao final do ensaio de estabilidade (10 d), comprovam a eficiência dos tratamentos LB, Combo, LBNit e BZ na proteção das silagens expostas ao ar.

É notória a eficiência dos tratamentos à base de *L. buchneri* exclusivamente ou associado com aditivo químico ou microbiano (Combo e LBNit) e benzoato de sódio no controle de perdas durante o processo de fermentação e no pós abertura do silo. Dessa forma, é justificável o uso desses aditivos em silagens de grãos de sorgo reconstituído, como forma de proteção do silo, principalmente no pós abertura, o qual muitas vezes fica com sua face exposta.

Tabela 5 - Estabilidade aeróbia das silagens de grãos de sorgo reconstituído tratadas com diferentes aditivos

Item	Tratamentos						EPM	P-valor
	Controle	LB	LP	Combo	LBNit	BZ		
EA, h	38,5 ^b	240 ^a	36,33 ^c	240 ^a	240 ^a	240 ^a	0,39	<0,01
Ac 5 d, °C	46,52 ^a	0,0 ^b	45,93 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	1,16	<0,01
Ac 10 d, °C	102,3 ^a	1,33 ^b	95,0 ^a	0,0 ^b	0,60 ^b	0,5 ^b	2,7	<0,01
Perda MSEA, %	28,46 ^a	2,35 ^b	27,43 ^a	2,34 ^b	1,92 ^b	2,19 ^b	3,11	<0,01

EA: estabilidade aeróbia; Ac 5 e 10 d: temperatura acumulada em 5 e 10 d; Perda MSEA: perdas de matéria seca no ensaio de estabilidade aeróbia; Controle: tratamento sem aditivo; LB: *L. buchneri*; LP: *L. plantarum*; Combo: LB+LP; LBNit: *L. buchneri* + nitrito de sódio; BZ: benzoato de sódio. Médias seguidas de mesma letra na linha, são semelhantes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Os dados da análise de produtos de fermentação encontram-se disponíveis na Tabela 6. Esses resultados comprovam o padrão de fermentação das bactérias homofermentativas (*L. plantarum*), com maiores valores significativos para ácido láctico e menores para acético. Da mesma forma, os padrões para bactérias heterofermentativas foram mantidos (LB isolado e Combo) com maiores teores de ácido acético em relação aos demais tratamentos. Dados superiores de ácido láctico para Controle, LP e LBNit explicam os menores valores de pH encontrados nessas silagens. Porém, para o tratamento BZ apesar do teor de ácido láctico ter sido semelhante à esses tratamentos, não foi alcançada a mesma resposta em relação ao pH, podendo ser explicada por uma possível ação do ácido benzóico, o que apresenta pKa de 4,19 (BAIRD-PARKER, 1980).

As silagens tratadas com benzoato de sódio propiciaram um perfil controlado de produtos de fermentação. Esse resultado é esperado, visto que, por se tratar de

um aditivo químico com propriedades antimicrobianas, ocorre a inibição e controle da fermentação. Em revisão de literatura, Chipley (2005) relata que o ácido benzóico, princípio ativo do benzoato de sódio, atua na membrana celular dos microrganismos, modificando sua permeabilidade e afetando o mecanismo de troca de íons, dessa forma, desestabiliza o meio interno da célula. Além disso, atua na inibição do metabolismo de ácido acético (CHIPLEY, 2005), o que explica os baixos valores encontrados nesse experimento.

Os produtos de fermentação do tratamento LBNit, mostram diferença considerável em relação aos tratamentos LB e Combo, principalmente quanto aos dados de ácido láctico e acético. Moraes (2016) em experimento conduzido com os mesmos tratamentos, porém com silagens de grãos de milho reconstituído, encontrou comportamento semelhante. Segundo a autora, o nitrito de sódio presente naquele tratamento estimulou o crescimento de microrganismos homofermentativos na massa ou inibiu a rota de assimilação do ácido láctico pelo *L. buchneri*.

Embora os dados de contagem de leveduras tenham sido baixos para os tratamentos LB e Combo (Tabela 4), os valores de etanol (Tabela 6), principal produto do metabolismo de leveduras, foram considerados intermediários (0,3% MSc). LBNit e BZ apresentaram valores de contagem de leveduras semelhantes à esses tratamentos (Tabela 4), porém a porcentagem de etanol (Tabela 6) foi menor em comparação a todos os outros tratamentos (0,1 e 0,05%, respectivamente). Dessa forma, maior efetividade no controle de leveduras durante todo o processo de ensilagem pode ser atribuído aos aditivos químicos testados.

Moraes (2016) obteve valores de etanol semelhantes entre os tratamentos LB e LP (0,43 e 0,44 % MSc, respectivamente), atribuindo esse resultado ao metabolismo heterofermentativo excepcional do *L. buchneri* que pode preferencialmente também produzir etanol. Quanto ao comportamento dos aditivos químicos, a autora observou resultados semelhantes ao presente experimento, com menor produção de etanol e maior controle no crescimento de leveduras.

Os dados de ácido propiônico, 1,2-propanodiol e 1-propanol foram maiores ($p < 0,01$) para os tratamentos LB e Combo em relação aos demais. Esses resultados apontam que houve metabolização e assimilação do ácido láctico à partir do metabolismo de *L. buchneri*. Os resultados obtidos nesse experimento comportaram-se, de forma similar aos relatos de Moraes (2016) com a ensilagem de grãos reconstituídos de milho. Essa assimilação pode ter ocorrido de forma secundária,

juntamente com a produção de etanol, após a fermentação dos carboidratos solúveis presentes no grão (MORAIS, 2016). A produção de 1,2-propanodiol além de poder estar associada a atividade de *L. buchneri*, pode também decorrer da ação de outras bactérias heterofermentativas, tal como *L. brevis* (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; SPOELSTRA, 1999).

Driehuis, Elferink e Spoelstra (1999) em experimento com *L. buchneri*, constataram maior produção de 1-propanol em doses superiores à 10^4 ufc g⁻¹ e diminuição na concentração de ácido láctico. Da mesma forma, Oude Elferink et al. (2001) em experimento com *L. buchneri*, obtiveram para cada mol de ácido láctico, 0,5 mol de ácido acético, 0,5 mol de 1,2-propanodiol e traços de etanol. Em revisão de literatura, Kleinshimit e Kung (2006) relataram incremento potencial na produção de etanol, ácido acético e propiônico em silagens tratadas com *L. buchneri* ($>10^1$ ufc g⁻¹) em relação às silagens controle.

O tratamento LBNit foi eficiente em reduzir a concentração de ácido fórmico, seguido pelo LP e Controle. Pahlow et al. (2003) relacionam produção desse composto com a atividade de algumas bactérias anaeróbicas facultativas, tais como as enterobactérias, as quais fermentam glicose a uma mistura de ácidos, acético e fórmico, mais etanol e 2,3-butanodiol. Por outro lado, o 2,3-butanodiol pode estar relacionado a atividade de clostrídeos (SIEMERINK et al., 2011). Os dados obtidos de 2,3-butanodiol nesse experimento confirmam esses resultados, maiores valores desse composto foram obtidos no tratamento LB, seguido pelo Controle e Combo, os aditivos químicos LBNit e BZ foram mais eficientes em reduzir o teor de 2,3-butanodiol.

Os valores de acetato de propila foram maiores para os tratamentos LB e Combo, resultado do metabolismo do *L. buchneri*. O acetato de propila é característico do metabolismo de bactérias heteroláticas, tendo alta correlação com o principal produto de fermentação de *L. buchneri*, o ácido acético (KRISTENSEN et al., 2010). Já em silagens tratadas com *L. plantarum* e Controle, houve incremento nos valores de lactato de etila, resultante dos maiores valores de ácido láctico, superiores em ambos os tratamentos. Maiores valores de acetato de etila foram obtidos nos tratamentos LB e Combo. De acordo com Hangx et al. (2001) a produção do acetato de etila está associado a presença de etanol e ácido acético em meio ácido, o que explica os resultados obtidos para esses dois tratamentos.

Os maiores níveis de acetona encontrados para os tratamentos LP e Combo evidenciaram a possibilidade de ocorrência de clostrídeos nessas silagens. Entretanto, essa afirmação se contrapõe aos baixos teores observados para ácido butírico, em particular para o tratamento Combo. A acetona, assim como o ácido butírico, são produtos de fermentação de clostrídeos (ROOKE; HATFIELD, 2003). Maiores teores ($p<0,01$) de ácido valérico e iso-valérico foram também obtidos nas silagens tratadas com *L. buchneri*, esses compostos estão associados à degradação de proteína (LEEK, 2006), o que explica os maiores valores de N-NH₃ obtidos para esse tratamento. Em relação ao álcool iso-propílico, maiores valores foram obtidos para o tratamento Combo, seguido de LBNit.

Tabela 6 - Produtos de fermentação obtidos de silagens de grãos de sorgo reconstituído tratados com diferentes aditivos químicos e microbianos

Item	Tratamentos						EPM	P-valor
	Controle	LB	LP	Combo	LBNit	BZ		
Ácido láctico, % MS _C	1,6a	0,5b	1,4a	0,2c	1,4a	1,5a	0,1	<0,01
Ácido acético, % MS _C	0,3c	1,7a	0,2c	1,8a	0,8b	0,2c	0,1	<0,01
Ácido propiônico, mg kg ⁻¹ MS _C	42,3c	272,6a	32,5c	124,6b	28,5c	59,3bc	14,8	<0,01
Ácido butírico, mg kg ⁻¹ MS _C	7,5a	6,9a	5,7ab	3,7b	3,2b	6,0ab	0,6	<0,01
Etanol, % MS _C	0,5a	0,3b	0,5a	0,3b	0,1c	0,05c	0,1	<0,01
1,2-Propanodiol, % MS _C	0,03d	1,9b	0,01d	2,1a	0,9c	0,03d	0,1	<0,01
1-Propanol, mg kg ⁻¹ MS _C	1,4c	387,5a	0,0c	142,9b	7,4c	0,0c	14,7	<0,01
Ácido iso-butírico, mg kg ⁻¹ MS _C	6,4b	37,7a	6,1b	36,8a	11,2b	14,2b	2,1	<0,01
Ácido iso-valérico, mg kg ⁻¹ MS _C	4,9ab	7,9a	3,8ab	2,9b	3,0b	3,9ab	0,9	0,01
Ácido valérico, mg kg ⁻¹ MS _C	3,7ab	6,5a	2,3b	2,7b	2,1b	2,2b	0,6	<0,01
Ácido fórmico, mg kg ⁻¹ MS _C	49,0abc	82,2a	38abc	54,8ab	13,9c	83,4a	8,4	<0,01
Acetona, mg kg ⁻¹ MS _C	16,3ab	14,9b	25,5a	25,1a	16,5ab	16,9ab	2,2	<0,01
Acetato de etila, mg kg ⁻¹ MS _C	36,6b	195,8a	29,9b	166,7a	8,9b	5,4b	13,1	<0,01
Lactato de etila, mg kg ⁻¹ MS _C	114,1a	14,2b	105,1a	13,7b	13,6b	16,7b	3,4	<0,01
Acetato de propila, mg kg ⁻¹ MS _C	0,0c	33,3a	0,0c	9,0b	0,0c	0,0c	1,8	<0,01
2,3-Butanodiol, mg kg ⁻¹ MS _C	372,1b	551,3a	256,0c	330,1bc	48,6d	58,5d	24,3	<0,01
Metanol, mg kg ⁻¹ MS _C	22,14	25,64	22,34	26,67	21,36	21,62	2,1	0,32
2-Butanol, mg kg ⁻¹ MS _C	0,45	0,56	0,0	0,16	0,0	0,0	0,1	0,02
Álcool iso-propílico, mg kg ⁻¹ MS _C	0,9b	1,2b	0,7b	2,2a	1,3ab	0,5b	0,2	<0,01

Controle: tratamento sem aditivo; LB: *L. buchneri*; LP: *L. plantarum*; Combo: LB+LP; LBNit: *L. buchneri* + nitrito de sódio; BZ: benzoato de sódio. Médias seguidas de mesma letra na linha, são semelhantes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

3.4 Conclusões

Os tratamentos contendo *L. buchneri* e benzoato de sódio mostraram-se eficientes em preservar a massa ensilada durante o período de estocagem e após a abertura dos silos, com eficiente controle sobre as leveduras. Tratamentos com aditivos microbianos, especialmente *L. buchneri* propiciou maior degradação da matriz proteica. Por outro lado, o benzoato de sódio, foi menos eficiente, resultando em maiores teores de N aderido à fibra (NIDN) porém sem afetar a fração C desse tratamento. Esse fato encontrado para o tratamento benzoato de sódio, pode ser um atrativo para a nutrição animal, haja visto que reduzir a fração solúvel de grãos pode propiciar menores riscos de acidose ruminal, contudo sem afetar sua extensão de degradação.

Por fim, os aditivos que obtiveram resultados satisfatórios e equilibrados foram o *L. buchneri* exclusivo e benzoato de sódio. Sendo aditivos que podem ser empregados em silagens de grãos de sorgo reconstituídos.

Referências

AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL. Technical Committee on Responses to Nutritives. Nutritive requirements of ruminant animals: protein. (Report, 9). **Nutrition Abstracts and Reviews**, Serie B, Amsterdam, v. 62, p. 787-835, 1992.

ARRIGONI, M.D.; VIEIRA, P.; SILVEIRA, A.; FURLAN, L.; COSTA, C.; CHARDULO, A.; CURI, P. Estudos dos efeitos da restrição alimentar no desempenho de bovinos jovens confinados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, p. 987-992, 1998.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International**. 17th ed. Gaithersburg, 2000.

_____. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International**. 16th ed. Washington, 1997.

BAIRD-PARKER, A.C. Organic acids. In: SILLIKER, J.H. (Ed.). **Microbial ecology of foods**. New York: Academic Press, 1980. v. 1.

BENTON, J.R.; KLOPFENSTEIN, T.J.; ERICKSON, G.R. Effects of corn moisture and length of ensiling on dry matter digestibility and rumen degradable protein. **Nebraska Beef Cattle Reports**, Lincoln, v. 151, p. 31-33, 2005.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, p. 248-259, 1976.

CARVALHO, P.A. **Influência de genótipo e maturidade na diversidade microbiológica em milho grão para silagem**. 2014. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

CHIPLEY, J.R. **Antimicrobials in food**. 3rd ed. New York: Taylor e Francis, 2005. 689 p.

COSTA, C.; ARRIGONI, M.B.; SILVEIRA, A.C.; CHARDULO, L.A.L. Silagem de grãos úmidos. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 7., 1999, Piracicaba. **Anais...**, 1999. p. 69-87.

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**, Lancaster, v. 85, p. 3008-3012, 2002.

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

FERNANDES, J. **Influência de genótipo, maturidade e tempo de armazenamento na qualidade de silagens de grãos de milho com alta umidade**. 2014. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

HALL, M.B. **Neutral detergent-soluble carbohydrates nutritional relevance and analysis**. Gainesville: University of Florida, 2000. 42 p. (Bulletin, 339).

HANGX, G.; KWANT, G.; MAESSEN, H.; MARKUSSE, P.; URSEANU, I. **Reaction kinetics of the esterification acid towards ethyl acetate**: technical report on the European Commission. Dortmund: INTINT, 2001. 5 p. (Deliverable, 22).

JONSSON, A. Enumeration and confirmation of *Clostridium tyrobutyricum* in silages using neutral red, d-cycloserine, and lactate dehydrogenase activity. **Journal of dairy Science**, Champaign, v. 73, p. 719-725, 1990.

JUNGES, D.; MORAIS, G.; DANIEL, J.L.P. ; SPOTTO, M.H.F. ; NUSSIO, L.G. Contribution of proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 17., 2015, Piracicaba. **Proceedings...** Rio das Pedras: Gráfica Riopedrense, 2015. p. 566-567.

KLEINSHMIT, D.H.; KUNG, L. JR. A meta analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability de corn and grass and small grain silages. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, p. 4005-4013, 2006.

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

KRISTENSEN, N.B.; SLOTH, K.H.; HOJBERG, O.; SPLIID, N.H.; JENSEN, C.; THOGERSEN, R. Effects of microbial inoculants on corn silage fermentation, microbial contents, aerobic stability, and milk production under field conditions. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, p. 3764-3774, 2010.

LADELY, S.R.; STOCK, R.A.; GOEDEKEN, F.K.; HUFFMAN, R.P.; Effect of corn hybrid and grain processing method on rate of starch disappearance and performance of finishing cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.73, p. 360-364, 1995.

LEEK, B.F. Digestão no estômago do ruminante. In: REECE, W.O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 404-437.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. São Paulo: Sarvier, 2013. 1273 p.

LITHERLAND, N.B. Adequacy of processing adjustment factors (PAF's) and intake discounts for dairy cows. In: OKLAHOMA CATTLE GRAIN PROCESSING SYMPOSIUM, nº1, 2006, Oklahoma. **Proceedings...** Oklahoma: Oklahoma State University, 2006. p. 110-116.

MAGALHÃES, P.C.; RODRIGUES, W.A.; DURÃES, F.O.M. **Tanino no grão de sorgo: bases fisiológicas e métodos de determinação**. Sete Lagoas: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, 2000. 13 p. (Circular Técnica, 27).

McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2nd ed. Lincoln: Chalcombe Publ., 1991. 340 p.

MORAIS, G. **A fermentação de grãos de milho reidratados influenciada pela aplicação de aditivos: aspectos da conservação e do valor nutritivo para vacas leiteiras**. 2016. 111 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

NAKAMURA, Y.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Analysis of proanthocyanidins in grape seed extracts, health foods and grape seed oils. **Journal of Health Science**, Osaka, v. 29, p. 24-54, 2003.

NELLIS, S.E.; HOFFMAN, P.C.; SHAVER, R.D. A modified method to quantify prolamin proteins in dry and high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 96, p. 4647-4652, 2013.

OGDEN, R.K.; COBLENTZ, W.K.; COFFEY, K.P.; TURNER, J.E.; SCARBROUGH, D.A.; JENNINGS, J.A.; RICHARDSON, M.D. Ruminant in situ disappearance kinetics of dry matter and fiber in growing steers for common crabgrass forages sampled on

seven dates in northern Arkansas. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, p. 1142-1152, 2005.

ORSKOV, E.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 92, n. 2, p. 499-503, 1979.

OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; KROONEMAN, J.; GOTTSCHAL, J.C.; SPOELSTRA, S.F.; FABER, F.; DRIEHUIS, F. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2 propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, p. 125-132, 2001.

PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; SPOELSTRA, S.F. Microbiology of ensiling. In: **SILAGE: SCIENCE AND TECHNOLOGY**, 1., 2003, Madison. **Proceedings...** Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 1-927.

PASSINI, R.; SILVEIRA, A.C.; RODRIGUES, P.H.; CASTRO, A.L.; TITTO, E.; ARRIGONI, M.; COSTA, C. Digestibilidade de dietas a base de grão úmido de milho ou de sorgo ensilados. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.24, p.1147-1154, 2002.

PFLUGFELDER, R.L.; ROONEY, L.W. The role of germination in sorghum reconstitution. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 14, p. 243–254, 1986.

PRYCE, J.D. A modification of Barker-Summerson method for determination of lactic acid. **Analyst**, Cambridge, v. 94, p. 1151-1152, 1969.

ROOKE, J.A.; HATFIELD, R.D. Biochemistry of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America, 2003. p. 251-304.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 2004. 633 p.

SIEMERINK, M.A.J.; KUIT, W.; LOPEZ CONTRERAS, A.M.; EGGINK, G.; VAN DER OOST, J.; KENGEN, S.W.M.D. 2,3-butanediol production due to heterologous expression of an acetoin reductase in *Clostridium acetobutylicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 2, p. 2582-2588, 2011.

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**, Lancaster, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

WEISS, B. When to consider silage additives. In: TRI-STATE DAIRY NUTRITION CONFERENCE, nº 1, 1996, Fort Wayne. **Proceedings...** Indiana, 1996. p. 125-138.

WOOLFORD, M.K. Microbial screening of food preservatives, cold sterilants and specific antimicrobial agents as potential silage additives. **Journal of Science of Food and Agriculture**, Malden, v. 26, p. 229-237, 1975.

ZANOTTO, D.L.; BELLAYER, C. **Método de determinação da granulometria de ingredientes para uso em rações de suínos e aves**. Concórdia: EMBRAPA Suínos e Aves, 1996. 5 p. (Comunicado Técnico, 215).

4 USO DE *L. buchneri* E BENZOATO DE SÓDIO EM SILAGENS DE GRÃOS DE SORGO RECONSTITUÍDOS PARA VACAS LEITEIRAS

Resumo

A ensilagem de grãos de sorgo reconstituídos é realizada com o intuito de aumentar seu valor nutritivo, o qual é inferior ao milho. Entretanto, ainda são poucos os dados disponíveis quanto ao uso dessa técnica. Os objetivos desse estudo foi avaliar o efeito de *L. buchneri* e benzoato de sódio no processo de fermentação de silagens de grãos de sorgo reconstituído e seus efeitos sob o desempenho de vacas leiteiras. As vacas foram alocadas em cinco quadrados latinos e quatro tratamentos: (i) silagem sem aditivo (Controle); (ii) silagem inoculada com *L. buchneri* (5×10^5 ufc g^{-1} MN) (LB); (iii) silagem tratada com benzoato de sódio ($2,0 g kg^{-1}$ MN) (Benz) e (iv) sorgo grão moído fino (SGM). Os resultados evidenciaram maior solubilização da matriz proteica em ambos os tratamentos ensilados. As taxas de degradabilidade da MS foram maiores para Controle, LB e BZ. Obteve-se maior CMS para o SGM enquanto a produção de leite foi semelhante entre os tratamentos. A digestibilidade da dieta foi maior para os tratamentos Controle, LB e BZ comparado ao SGM. Os animais que receberam o tratamento SGM apresentaram maior tempo de ingestão e mastigação, reflexo do maior CMS. A técnica de ensilagem de grãos de sorgo reconstituídos se mostrou eficiente tanto na qualidade do alimento após o processo fermentativo, quanto no aumento da eficiência alimentar por parte dos animais.

Palavras-chave: Aditivos; Prolaminas; Amido; Processamento; Eficiência alimentar; Fermentação ruminal

Abstract

The reconstituted sorghum grain silage is a type of processing, which aims to increase the nutritional value of the grain, which it's lower compared to the corn. However, there are few reports available on the use of this technique. The aim of this study was to evaluate the effect of *L. buchneri* and sodium benzoate in the fermentation process of reconstituted sorghum grain silage and its effects on the performance of dairy cows. The cows were allocated in one of five Latin squares and four treatments: (i) silage without additive (Control); (ii) silage inoculated with *L. buchneri* (5×10^5 cfu g^{-1} FM) (LB); (iii) silage treated with sodium benzoate ($2.0 g kg^{-1}$ FM) (Benz) and (iv) finely ground grain sorghum (SGM). The results showed increased solubilization of the protein matrix in Control, LB and BZ. The DM degradability rates were higher for Control, LB and BZ. The DMI was higher for SGM, while milk production was similar between treatments. The digestibility of the diet was higher for treatments Control, LB and BZ compared to the SGM. Animals which received the treatment SGM showed higher time consuming and chewing, reflection of the increased of DMI. The reconstituted sorghum grain silage was efficient to improve nutritive value after the ensiling and increased feed efficiency.

Keywords: Additives; Prolamines; Starch; Processing; Feed efficiency; Ruminal fermentation

4.1 Introdução

A digestibilidade do amido presente nos grãos de cereais é afetada por sua composição, interações com a matriz proteica, integridade celular, fatores antinutricionais e tipo de endosperma (duro ou macio) (ROONEY; PFLUGFELDER, 1986). No caso de grãos de sorgo, a composição de taninos pode afetar a utilização ruminal do amido, por reduzir a digestão da proteína presente no grão (HAHN et al., 1984). Já em relação às características do endosperma dos grãos de sorgo, os mesmos em comparação ao milho apresentam um endosperma periférico extremamente denso, duro e resistente a penetração de água e enzimas para digestão (ROONEY; PFLUGFELDER, 1986). Nessa região há uma maior concentração de proteína, a qual resiste a degradação física e enzimática, o que faz com o que o sorgo tenha um menor valor nutritivo quando comparado ao milho e outros cereais.

O processamento de grãos pode aumentar a digestibilidade ruminal e no trato total do amido, por romper a matriz proteica que reveste os grânulos de amido. Rooney e Pflugfelder (1986) em sua revisão sobre processamento de grãos de sorgo e milho, sugerem valores nutricionais do sorgo processado (principalmente floculação) de 93 a 96% do valor nutricional do milho. Esses valores mostram um potencial nutritivo do sorgo para ruminantes, desde que o mesmo seja processado e a matriz proteica rompida.

Uma alternativa de processamento em substituição à floculação (técnica não muito utilizada no Brasil) é a ensilagem de grãos úmidos e/ou reconstituídos, a qual tem mostrado bons resultados de desempenho com vacas leiteiras, principalmente com grãos de milho (MORAIS, 2016). A utilização de grãos úmidos em dietas para vacas leiteiras revelam ganhos significativos em eficiência produtiva, pelo fato de promover menor consumo de MS e manter a produção de leite (FERRARETTO; CRUMP; SHAVER, 2013). Porém, esse efeito não é fixo, Moraes (2016) em experimento com grãos úmidos de milho tratados ou não com benzoato de sódio para vacas leiteiras, não obteve diferença no consumo de MS entre os tratamentos com milho moído e silagem de grãos reconstituídos, logo não houve diferença quanto a eficiência alimentar.

O uso de aditivos na ensilagem tem sido empregado com o intuito de melhorar o processo de fermentação e obter uma massa mais estável após a

abertura do silo. No caso de silagens de grãos de milho, alguns aditivos tem mostrado eficiência na degradação da matriz proteica e com isso maior disponibilidade do amido (KUNG Jr.; WINDLE; WALKER, 2014; FERRARETTO; FREDIN; SHAVER, 2015; MORAIS, 2016). Já para silagens de grãos de sorgo, não foi encontrado trabalhos mostrando efeitos de aditivos no desempenho de vacas leiteiras.

Dada a inconsistência de dados disponíveis na literatura e a carência de estudos com aditivos em silagens de grãos de sorgo para vacas leiteiras, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de *L. buchneri* e benzoato de sódio na qualidade de silagens de grãos de sorgo reconstituído e no valor nutritivo para vacas leiteiras.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Local, ensilagem e tratamentos

O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, campus da Universidade de São Paulo, situada em Piracicaba, SP. Os grãos de sorgo (cultivar BM 737, Biomatrix®) foram semeados nos dias 03 e 04 de março de 2015, em sistema de plantio direto sob palha de milho e espaçamento entre linhas de 0,5 m. O solo foi caracterizado como um latossolo vermelho escuro argiloso, corrigido com calcário calcítico a cada três anos. A adubação de semeadura foi feita com 25 kg ha⁻¹ de N, 50 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 25 kg ha⁻¹ de K₂O. Quando a planta apresentou 20 cm de altura aplicou-se 75 kg ha⁻¹ de N e 25 kg ha⁻¹ de K₂O. Os tratos culturais foram feitos com Glifosato e Triazina juntamente com óleo mineral. A colheita iniciou na última quinzena de junho de 2015, os grãos foram colhidos com aproximadamente 17% de teor de umidade com o auxílio de máquina colhedora, secos em secador e estocados até sua moagem (Tabela 7).

Tabela 7 - Características agrônômicas do híbrido de sorgo colhidos no ponto de colheita para grãos

Item	
Ciclo de crescimento	Precoce
Altura da planta, cm	107
Peso da planta, g	86,3
População de plantas, ha ⁻¹	254000
Teor de umidade do grão na colheita, %	17,2
Rendimento grãos, MN kg ha ⁻¹	3700
Rendimento MS kg ha ⁻¹	3063,6

MS: matéria seca; MN: matéria natural

A moagem foi realizada na fábrica de rações do departamento de zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (FZEA - USP) em moinho de martelo com peneira nº 2. A composição químico-bromatológica inicial pode ser visualizada na Tabela 8. Após a moagem determinou-se o tamanho médio de partículas através da agitação das amostras sobre um conjunto de peneiras com malhas de 4,0; 1,7; 1,18; 0,6; 0,42; 0,345; 0,105 mm e fundo (Adaptado de ZANOTTO; BELLAVER, 1996) (Figura 3). O tamanho médio de partículas dos grãos de sorgo moídos para esse experimento foi de 1,04 mm, classificado como sorgo moído fino, de acordo com a classificação de Litherland (2006).

Os grãos moídos foram ensacados e transportados até o departamento de zootecnia da ESALQ/USP, onde procedeu-se a ensilagem. O teor de umidade contida no grão era em média 10%, com isso calculou-se a quantidade de água necessária para elevar a umidade até 35%, conforme a equação abaixo (1).

$$(1) \quad \text{Quantidade L/tonelada} = 1000 - \left(\frac{(100 - y) * 1000}{(10 - x)} \right)$$

Onde: y= matéria seca desejada (%)

x= matéria seca inicial (%)

No momento da ensilagem três tratamentos foram impostos: (1) Silagem de grãos de sorgo reconstituído sem adição de aditivo (Controle); (2) Silagem de grãos de sorgo com a adição de *L. buchneri* na dose de 5×10^5 ufc g⁻¹ na MN (LB) (cepa CNCM I - 4323- Lallemand Animal Nutrition) e (3) benzoato de sódio na dose de 2,0 g kg⁻¹ MN (BZ) (Pureza de 99%).

Figura 3 - Distribuição de partículas do sorgo moído utilizado nas silagens experimentais

A quantidade de sorgo a ser reidratado, juntamente com a água e aditivos foram homogeneizados dentro de um vagão misturador (modelo: VM4, DeLaval®) durante 15 min, para as silagens sem inclusão de aditivo foi adicionado somente água. Como silos experimentais utilizou-se tambores plásticos com capacidade para 200 L, revestidos com sacos de polietileno e tampas para vedação. O conjunto tambor plástico, saco plástico, tampa e lacre foram pesados para a obtenção da tara. Os tambores foram compactados por meio de pisoteio humano até seu completo enchimento. Após, foram lacradas e pesadas para obtenção do peso inicial e assim ser possível calcular as perdas fermentativas e por gases ao fim do período de estocagem.

Confeccionou-se silagem o suficiente para alimentar os animais durante 84 d, correspondente a duração do experimento. A produção de silagem de sorgo foi escalonada, ou seja, a cada 21 d (duração teórica de um período experimental) com o objetivo de fornecer silagens, em cada período, com o mesmo tempo de fermentação (± 60 d). Após 60 d, os tambores referentes ao primeiro período foram abertos e deu-se início ao experimento de desempenho com vacas leiteiras.

Tabela 8 - Composição químico-bromatológica, caracterização física dos grãos e perfil microbiano dos grãos de sorgo secos e moídos utilizados na confecção das silagens

Item	Média e Desvio Padrão
Composição química	
Matéria seca, %	91,93 ± 0,12
Proteína Bruta, % MS	11,54 ± 0,13
Nitrogênio solúvel, % N total	3,78 ± 1,08
Nitrogênio ligado à FDN, % N total	23,14 ± 1,12
N-NH ₃ , % N total	0,40 ± 0,08
Fibra em detergente neutro, % MS	10,98 ± 1,28
Fibra em detergente neutro indigestível, % MS	0,84 ± 0,02
Matéria mineral, % MS	1,30 ± 0,78
Extrato etéreo, % MS	4,28 ± 0,74
Carboidrato não fibroso, % MS	72,63 ± 1,52
Prolaminas, % MS	7,84 ± 1,14
Carboidrato Solúvel, % MS	6,34 ± 0,33
Ácido láctico, % MS	0,24 ± 0,05
Teor de taninos totais, % da amostra <i>in-natura</i>	0,468 ± 0,20
Caracterização física do grão	
Peso 100 grãos, g	2,5 ± 0,07
Tamanho médio de partículas, mm	1,04 ± 0,03
Perfil Microbiano	
BAL, log ufc g ⁻¹	3,05 ± 0,61
Fungos, log ufc g ⁻¹	3,29 ± 0,13
Leveduras, log ufc g ⁻¹	4,00 ± 1,02

MS: matéria seca; log: base logarítmica; ufc: unidade formadora de colônias; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro

4.2.2 Avaliações nos grãos antes e após o processo fermentativo

Amostras de grãos de sorgo moídos antes da ensilagem e das silagens foram coletadas para determinação da composição químico-bromatológica. As amostras foram pesadas e secas em estufa de circulação forçada a 55°C por 72 horas para determinação da MS em estufa. Após secagem, o material foi moído em moinho de facas tipo Willey com peneira de 1,0 mm. A determinação do teor de matéria seca foi feita por secagem em estufa a 105°C durante 12 h (AOAC, 2000). As cinzas foram obtidas por combustão das amostras a 600°C durante 4 h (AOAC, 1997). A análise de proteína bruta (PB) foi realizada pelo método de combustão de Dumas (Leco 2000, Leco Instruments Inc). O extrato etéreo (EE), determinado pelo método de extração Soxhlet segundo AOAC (1997). A fibra em detergente neutro (FDN) e a fibra em detergente ácido (FDA) foi obtida segundo Van Soest et al. (1991), utilizando-se sulfito de sódio e α -amilase. A análise de carboidratos solúveis em etanol foi realizada conforme metodologia descrita por Hall (2000) utilizando glicose como padrão. A análise de amido dos ingredientes e das silagens de sorgo foi

realizado pela técnica de espectroscopia de refletância do infravermelho próximo (BERZAHÍ; COZZI; ANDRIGHETTO, 1997; COZZOLINO; ACOSTA; GARCIA, 2001).

A extração e quantificação das proteínas de reservas (prolamina) foram feitas conforme metodologia proposta por Nellis (2013), a concentração de proteína prolamina foi quantificada utilizando o kit da Bio-Rad, de acordo com a metodologia de Bradford (1976), utilizou-se a zeína como padrão (Zeín, Sigma Aldrich®). A curva padrão foi preparada com concentrações crescentes de zeína, as amostras e os padrões foram lidos em espectrofotômetro à 595 nm.

Para análise dos taninos totais, foram tomadas 5 g de amostra *in natura* dos grãos de sorgo moídos e ensilados, acondicionados em tubos tipo falcon, congeladas e enviadas para o laboratório de análise de alimentos da ESALQ/USP. A metodologia utilizada é a da vanilina, de acordo com Nakamura et al. (2003) com leitura em espectrofotômetro, sendo os valores expressos em taninos totais % da amostra *in natura*. Com base nos resultados, pode-se afirmar que os grãos de sorgo utilizados nesse experimento, são de baixo teor de taninos totais. Magalhães et al. (2000) relata que percentuais abaixo de 0,70% são decorrentes de outros fenóis mas que não são capazes de prejudicar o desempenho animal.

As frações nitrogenadas das silagens foram decompostas pelo método Macro Kjeldhal (AOAC, 1990). A proteína solúvel (PB-Solúvel) foi determinada por meio da adição de 500 mg de amostra em 5 mL de solução de álcool butílico terciário e 50 mL de solução de borato-fosfato (KRISHNAMOORTHY et al., 1982). O nitrogênio indisponível em detergente neutro (NIDN) e em detergente ácido (NIDA) foram obtidos através da filtragem do resíduo do FDN e FDA conforme a metodologia de Van Soest (1991) em papéis de filtro Whatman 541, com amilase termoestável e sem o uso de sulfito de sódio. A fração de N-NH₃ foi obtido pela destilação (Macro-Kjeldhal) de 1g de amostra fresca juntamente com 2 g de MgO e antiespumante.

Para avaliação do perfil microbiano, preparou-se um extrato aquoso por meio da adição de 225 g de água deionizada estéril em 25 g de amostra fresca, a qual foi homogeneizada durante 4 min. em homogeneizador de alimentos (Nova Ética® Vargem Grande Paulista, Brasil). Foram realizadas diluições decimais sequenciais (10^{-1} a 10^{-6}), procedendo-se plaqueamento em triplicata. Como meio de cultura utilizou-se: ágar Malt para contagem de leveduras e fungos, acrescido de ácido láctico a 0,5% e MRS ágar para contagem de bactérias ácido lácticas, acrescido de antifúngico Natamax® na dose de 0,25 g L⁻¹ (Natamicina).

Os teores de etanol, ácido acético, propiônico, butírico e demais produtos de fermentação foram determinados no extrato aquoso após filtragem e centrifugação, por meio de cromatografia gasosa com detector de massas (GC-MS) (GCMS QP 2010 plus, Shimadzu®, Kyoto, Japan), utilizando coluna capilar (Stabilwax, Restek®, Bellefonte, USA; 60 m, 0,25 mm Ø, 0,25 µm crossbond carbowax polyethylene glycol). O teor de ácido láctico foi determinado pelo método colorimétrico (PRYCE, 1969). O pH determinado no extrato aquoso em pHmetro digital marca Digimed DM-22®.

Para o cálculo de matéria seca em estufa 55 °C, corrigida para produtos voláteis, utilizou-se a fórmula proposta por Weissbach (2009) (2), onde ácidos graxos voláteis incluem: ácido acético, propiônico, iso-butírico, butírico, iso-valérico e valérico.

$$(2) \text{ MS corrigida (\%MV)} = \text{MS estufa (\%MV)} + 0,08 \times \text{ácido láctico (\%MV)} + 0,77 \times \text{1,2-propanodiol (\%MV)} + 0,87 \times \text{2,3-butanodiol (\%MV)} + 0,95 \times \text{ácidos graxos voláteis* (\%MV)} + \text{lactato de etila (\%MV)} + \text{1-propanol (\%MV)} + \text{2-butanol (\%MV)} + \text{acetato de propila (\%MV)} + \text{etanol (\%MV)} + \text{álcool iso-propílico (\%MV)} + \text{acetato de etila (\%MV)} + \text{acetona (\%MV)}.$$

A estabilidade aeróbia das silagens de sorgo foram realizadas em cada período de coleta. Para isso, 3,0 kg de silagem de cada unidade experimental foram dispostas sem compactação em baldes plásticos abertos e mantidos em sala climatizada a 25 ± 1 °C por 240 h. As temperaturas foram mensuradas a cada 15 min. com o uso de data loggers (modelo: *Novus tagtemp*®), os quais foram inseridos no centro geométrico da massa. Definiu-se que a quebra da estabilidade seria o tempo (h) necessário para elevação da temperatura da massa em 2 °C em relação à temperatura ambiente. Outras variáveis avaliadas foram: temperatura máxima alcançada pela massa (TMax), tempo necessário para a massa atingir a temperatura máxima (HTmax), acúmulo de temperatura em 5 d (AC5d) e 10 d (AC10d) de exposição aeróbia.

Realizou-se ensaio de degradabilidade *in situ* da MS nos grãos secos moídos *in natura* e as silagens de sorgo reconstituídos dos quatro períodos. Utilizou-se duas vacas holandesas em lactação com cânula ruminal, mantidas em baias individuais do tipo *tie-stall*, equipadas com bebedouro e cochos individuais. Foram pesadas 5 g

de amostras e acondicionadas em sacos de náilon (20cm por 10cm, com porosidade de 30 μm), após, os sacos foram selados e amarrados com a utilização de borracha de látex. Os mesmos foram mantidos sob refrigeração e retirados somente 2 h antes da incubação, os tempos de incubação foram: 0, 12, 24 e 48 h. Após a remoção dos sacos do rúmen, os mesmos foram imersos em gelo e posteriormente lavados juntamente com os sacos referentes ao tempo zero (AFRC, 1992). Após a lavagem, os sacos com as amostras foram levados até estufa de circulação de ar e mantidas durante 72 h à 55° C, após esse período tiveram novamente seu peso quantificado e por diferença calculou-se a degradação de MS em % para cada tempo de incubação.

Para obtenção dos parâmetros de degradabilidade, foi utilizado o modelo proposto por Orskov e McDonald (1979) (3).

$$(3) \ Y(t) = a + b(1 - e^{-k_d \cdot t}) \geq t;$$

Sendo:

$Y(t)$ = degradabilidade potencial estimada;

$a + b$ = fração potencialmente degradável;

e = número neperiano (2,7182);

k_d = taxa de degradação (h^{-1});

t = tempo de incubação (h).

A partir dos dados de degradação para cada tempo, obteve-se as frações solúvel (A) = 100% (massa inicial) – resíduo do tempo zero (massa final); fração insolúvel (C) = resíduo do tempo 48h; fração potencialmente degradável (B): 100 – (A + C);

A degradabilidade potencial (%) = 100 – C e degradabilidade efetiva = $A + B [k_d / (k_d + k_p)]$ foram calculados de acordo com Ogden et al. (2005).

4.2.3 Ensaio de lactação

Vinte vacas holandesas, sendo treze primíparas e sete multíparas ($618,1 \pm 85,7$ P.V; $31,5 \pm 5,8$ kg leite d⁻¹ e 92 ± 75 DEL) foram alocadas aleatoriamente em cinco quadrados latinos 4 x 4, com quatro períodos de 21 d, sendo 14 d para adaptação e sete para coleta de dados. Os animais foram alojados em confinamento do tipo *free-stall*, com sistema de ventilação, bebedouro e cochos individuais com controle eletrônico de acesso (Intergado®, Contagem-MG, Brasil), o qual permitiu o controle do consumo individual. A ordenha e a alimentação dos animais foi realizada duas vezes ao dia (06:00h e 18:00h). Após cada ordenha, os animais eram conduzidos até a instalação para alimentação.

Antes de dar início ao experimento de desempenho, procedeu-se a adaptação das vacas ao sorgo moído e ensilado, pois até então as mesmas recebiam uma dieta com milho moído, como principal fonte de concentrado energético. Desse modo, 14 d antes do início do experimento os animais foram adaptados a uma dieta com metade da inclusão de sorgo em substituição ao milho moído (45% silagem de milho planta inteira; 8% de pré-secado de Jiggs (*Cynodon dactylon* cv. Jiggs); 10% de caroço de algodão; 4% de polpa cítrica; 17,5% de farelo de soja; 7% de milho seco moído; 6,0% de sorgo seco moído e 2,5% de premix mineral vitamínico). Sete d antes do início do experimento retirou-se totalmente o milho seco e substituiu-se por silagem de grãos de sorgo.

Com as vacas adaptadas ao sorgo na dieta, as mesmas foram alocadas aos tratamentos e receberam a seguinte composição dietética (% MS): 38% de silagem de milho (planta inteira); 9% de pré-secado de Jiggs (*Cynodon dactylon* cv. Jiggs); 17,5% de farelo de soja; 10% de caroço de algodão; 2,5% premix mineral vitamínico e 23% de uma das seguintes fontes de sorgo grão. Assim foi constituído os tratamentos: (i) silagem de sorgo grão reconstituído sem aditivo (Cont.); (ii) silagem de sorgo grão reconstituído com *L. buchneri* 5×10^5 (LB), (iii) silagem de sorgo grão reconstituído com benzoato de sódio (BZ) e (iv) sorgo grão seco moído (SGM). A composição química dos ingredientes estão apresentadas na Tabela 9. A composição das dietas consumidas pelos animais, juntamente com o tamanho de partículas encontram-se na Tabela 10.

Tabela 9 - Composição química e desvio padrão dos alimentos utilizados nas dietas experimentais

Item	Silagem de milho planta inteira	Pré-secado	Farelo de soja	Caroço algodão	Sorgo moído
MS, %	26,96 ± 1,4	42,32 ± 2,1	85,62 ± 1,1	92,52 ± 0,6	84,08 ± 0,5
PB, % MS	9,54 ± 1,8	11,76 ± 1,9	50,34 ± 0,7	24,84 ± 0,2	10,92 ± 0,4
FDN, % MS	49,54 ± 2,1	72,26 ± 0,9	11,99 ± 1,29	44,12 ± 0,01	10,98 ± 1,2
FDNi, % MS	11,62 ± 0,6	29,03 ± 0,5	0,45 ± 0,01	23,27 ± 1,7	0,77 ± 0,01
FDA, % MS	30,34 ± 1,0	38,58 ± 0,8	7,44 ± 1,0	---	3,33 ± 0,6
EE, %MS	3,61 ± 0,32	1,72 ± 0,3	2,42 ± 0,6	22,12 ± 0,01	4,28 ± 0,7
MM, % MS	3,96 ± 0,2	6,72 ± 0,6	6,5 ± 0,4	4,04 ± 0,01	1,3 ± 0,01
CNF, % MS	33,72 ± 2,4	8,21 ± 2,8	29,17 ± 1,7	5,03 ± 0,2	72,63 ± 1,5

MS: matéria seca; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDNi: fibra em detergente neutro indigestível; EE: extrato etéreo; MM: matéria mineral; FDA: fibra em detergente ácido; CNF: carboidratos não fibrosos; MN: matéria natural; ---: não analisado

Duas vezes ao dia os ingredientes para cada tratamento foram misturados por 10 min. em vagão vertical tracionado a trator, equipado com conjunto de facas para corte (modelo: VM4 DeLaval®). A dieta total foi pesada e fornecida individualmente em cada cocho. Para o tratamento SGM adicionou-se a quantidade necessária de água para elevar a umidade desse tratamento, desfavorecido pela inclusão de sorgo seco moído, com isso equalizar o teor de umidade da dieta com os outros tratamentos. As rações foram fornecidas *ad libitum*, durante cada período de ordenha (06:00 h e 18:00 h), permitiu-se sobras de 10% do fornecido.

Entre os dias 15 e 21 de cada período experimental foram registrados o consumo de matéria seca (CMS) e a produção de leite. O CMS foi calculado por diferença entre a quantidade de MS fornecida e as sobras, as quais foram coletadas e congeladas a -20 °C, juntamente com os ingredientes que compunham a ração para avaliação da composição química. Duas amostras de leite de quatro ordenhas consecutivas foram coletadas, conservadas em bromopol e enviadas para a Clínica do Leite do departamento de zootecnia da USP/ESALQ em Piracicaba – SP, onde foram analisados os teores de proteína, gordura, lactose, sólidos totais, nitrogênio ureico e contagem de células somáticas. A formula utilizada para determinar a excreção de energia líquida no leite (ELL leite, Mcal/kg) (4) foi a recomendada pelo NRC (2001).

$$(4) \text{ ELI leite (Mcal kg}^{-1}\text{)} = 0,0929 * \% \text{gordura} + 0,0547 * \% \text{proteína} + 0,0395 * \% \text{lactose}$$

Tabela 10 - Composição química e tamanho de partículas das dietas experimentais consumidas pelos animais durante o período experimental

	Tratamentos			
	Controle	LB	BZ	SGM
Composição química				
MS, %	42,7 ± 0,01	42,6 ± 0,01	42,6 ± 0,01	43,2 ± 0,01
PB, % MS	18,1 ± 0,01	18,5 ± 0,01	18,0 ± 0,0	18,6 ± 0,01
FDN, % MS	33,5 ± 0,01	33,2 ± 0,01	33,4 ± 0,01	33,9 ± 0,01
FDNi, % MS	9,7 ± 0,01	9,6 ± 0,01	9,9 ± 0,01	9,6 ± 0,01
EE, % MS	5,2 ± 0,01	5,1 ± 0,01	4,9 ± 0,01	5,3 ± 0,01
MM, % MS	6,4 ± 0,01	6,4 ± 0,01	6,4 ± 0,01	6,4 ± 0,01
CNF, % MS	36,8 ± 0,01	36,8 ± 0,01	37,3 ± 0,01	35,8 ± 0,01
Tamanho de partículas				
< 38 e > 19 mm, % MN	13,18 ± 4,6	11,49 ± 2,9	11,73 ± 4,0	11,28 ± 1,9
>8 e < 19 mm, % MN	30,22 ± 2,5	30,96 ± 2,5	30,37 ± 3,3	30,08 ± 3,3
< 8 mm, % MN, % MN	56,58 ± 3,5	57,46 ± 1,5	57,81 ± 4,0	58,60 ± 2,2

MS: matéria seca; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDNi: fibra em detergente neutro indigestível; EE: extrato etéreo; MM: matéria mineral; CNF: carboidrato não fibroso. Controle: dieta com silagem de sorgo controle sem aditivo; LB: dieta com silagem de grãos de sorgo com *L. buchneri* na dose 5×10^5 ufc g⁻¹; BZ: dieta com silagem de grãos de sorgo com benzoato de sódio e SGM: dieta com sorgo grão moído seco

Amostras das rações totais e sobras foram coletadas para avaliação quanto ao tamanho de partículas, pelo método do “*Penn State Particle Size Separator*” (LAMMERS; BUCKMASTER; HEINRICHS, 1996) (Tabela 10). Com isso obteve-se a quantidade de material retido com diâmetro superior a 19 mm, entre 19 e 8 mm e inferior a 8 mm. O índice de seleção de partículas foi calculado como o consumo observado de cada fração retida em cada peneira expresso como porcentagem do consumo predito (% da MN). Com base nos valores obtidos indicou-se recusa (<100%), ingestão preferencial (>100%) ou ausência de seleção (=100%) (LEONARDI; ARMENTANO, 2003).

Amostras de fezes e urina foram coletadas nos dias 17, 18 e 19 (coleta *spot*) de cada período, em horários diferentes: 05:30 h, 11:00 h e 20:00 h e imediatamente congeladas. As amostras de fezes foram descongeladas e homogeneizadas, obtendo uma amostra composta para análise químico-bromatológica. Amostras de urina foram enviadas para o laboratório de nutrição animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP. As análises das concentrações dos parâmetros de creatinina e ácido úrico foram realizados pelos kits comerciais (Bioclin®) que utilizam método enzimático colorimétrico de ponto final e cinético, sendo a leitura realizada em analisador automático de bioquímica (Sistema de Bioquímica Automático SBA-200 - CELM®). A análise das concentrações do parâmetro alantoína foi realizada por meio de metodologia descrita por Young e Conway (1942), citada por Chen e Gomes (1992).

Amostras das silagens de sorgo foram coletadas para análise da estabilidade aeróbia e microbiologia, conforme descrito no item 4.2.2. Adicionalmente, avaliou-se o comportamento ingestivo dos animais em intervalos de 10 min. e interpolação dos dados no período intermediário, computando atividades de número de ingestões, tempo de ingestão, ruminação, ócio e ingestão de água (MAEKAWA et al., 2002). Antes do início do experimento, ao final e início de cada período realizou-se a pesagem dos animais, para avaliação do peso vivo (PV, kg) e a variação em kg do PV.

As amostras de sobras, ingredientes e fezes coletadas, foram analisadas no laboratório de bromatologia do departamento de zootecnia da ESALQ/USP. As amostras foram desidratadas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 h para determinação da primeira MS. Após a moagem em moinho tipo Willey com peneira de 1,0 mm, determinou-se MS (105°C), MM, EE, PB e FDN conforme descrito no item 4.2.2. O teor de matéria orgânica (MO) foi obtido através do desconto do valor de MM do teor de MS. O teor de carboidratos não fibrosos (CNF) foi calculado segundo o NRC (2001) $CNF = 100 - MM - PB - FDN - EE$.

No 20º e 21º d de cada período amostras de sangue foram coletadas por meio da punção dos vasos coccígeos medianos, quatro e dez h após a alimentação da manhã (aproximadamente 09:00h e 18:00h). A primeira coleta da manhã (quatro horas depois do trato) foi realizada em tubos à vácuo de sorologia com gel para análise de insulina e ácido graxo não esterificado (AGNE). Dez horas após o primeiro trato, procedeu-se a coleta para avaliação de lactato sanguíneo, realizada nos tubos com EDTA e fluoreto. Ambos os tubos, após a coleta, eram imediatamente levados para o laboratório onde o plasma ou soro era separado por centrifugação (2.000 × g por 20 min.). As amostras foram congeladas em eppendorfs até o momento de sua análise. Para determinação da concentração plasmática de AGNE, utilizou-se o kit Randox – NEFA, que se baseia no método enzimático e leitura por colorimetria, com comprimento de onda de 550 nm. A determinação de lactato total foi feita com base no kit Lactato Enzimático, que tem por finalidade a determinação quantitativa do lactato no plasma, por meio de um sistema enzimático e leitura por colorimetria à 550 nm. Amostras para análise de insulina foram enviadas para o laboratório do Prof. Milo Wiltbank (Madison, EUA). A análise de insulina foi feita pela técnica de radioimunoensaio usando o kit PI-12K Porcine

Insulin (EMD Millipore Billerica, MA) com especificidade de 90% para a insulina bovina, a sensibilidade do kit foi de $1,611 \text{ ml}^{-1} \text{ uUI}$ e o CV 8,34%.

No último dia de cada período e em aproximadamente dez horas após o trato da manhã, amostras de fluido ruminal foram tomadas, através de sonda esofágica flexível, conectada a uma bomba de vácuo. Como pode haver contaminação de saliva na amostra, descartava-se os três primeiros jatos e então aproximadamente 200 mL eram coletados e avaliados quanto ao pH e congeladas imediatamente com nitrogênio líquido e mantidas a -20°C , para posterior análise dos produtos de fermentação ruminal (acetato, propionato, butirato, isobutirato, isovalerato e valerato) utilizando-se cromatógrafo gasoso com detector de massas (GCMS QP 2010 plus, Shimadzu®, Kyoto, Japan), usando coluna capilar (Stabilwax, Restek®, Bellefonte, USA, 60 m, 0,25 mm Ø, 0,25 μm crossbond carbowax polyethlylene glycol) e parâmetros analíticos conforme recomendação do fabricante.

A digestibilidade aparente das rações no trato total ($n = 20$) foi determinada por meio de marcador interno FDN indigestível (FDNi) (HUHTANEN; KAUSTELL; JAAKKOLA, 1994). Amostras de cada ingrediente e das fezes já secas e moídas à 1 mm foram pesadas em sacos tipo ANKOM® Fiber Analyser (previamente limpos com acetona e deixados em estufa), selados e incubados durante 288 h, em uma vaca em lactação provida de cânula ruminal e recebendo a mesma composição dietética do experimento. Após o período necessário, os sacos foram retirados, lavados e encaminhados ao laboratório onde foram submetidos a análise de FDN, seguindo recomendações propostas pela ANKOM® FiberAnalyser (ANKOM Technology Corporation, Faipor, NY), sendo utilizado sulfato de sódio e amilase termoestável. De posse das digestibilidades aparentes dos nutrientes (CNF, FDN, PB, EE) calculou-se o NDT e as concentrações de energia das rações (NRC, 2001):

- (5) Energia digestível (Mcal kg^{-1}) = $(\% \text{CNF digestível}/100) * 4,2 + (\% \text{FDN digestível}/100) * 4,2 + (\% \text{PB digestível}/100) * 5,6 + (\% \text{EE digestível}/100) * 9,4 - 0,3$
- (6) Energia metabolizável (Mcal kg^{-1}) = $1,01 * \text{ED (Mcal/kg)} - 0,45$
- (7) Energia líquida de lactação (Mcal kg^{-1}) = $0,703 * \text{EM (Mcal/kg)} - 0,19$

4.2.4 Análises estatísticas

Todos os dados foram analisados com o procedimento Mixed do SAS (v. 9.3). As variáveis de desempenho, composição do leite e digestibilidade dos nutrientes foram comparadas utilizando-se o seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + Q_i + V_{j(i)} + P_k + A_l + \varepsilon_{ijkl}$$

Onde:

μ = Média geral;

Q_i = Efeito fixo de quadrado ($i = 1$ a 5);

$V_{j(i)}$ = Efeito aleatório de vaca dentro de quadrado ($j = 1$ a 20);

P_k = Efeito fixo de período ($k = 1$ a 4);

A_l = Efeito fixo de tratamento ($l = \text{SGM, Controle, LB, BZ}$);

ε_{ijkl} = resíduo.

Os graus de liberdade para tratamento foram divididos em três contrastes ortogonais com o objetivo de avaliar o efeito de ensilagem do sorgo [SGM vs. (Controle+BZ+LB)], o efeito do uso de aditivo [Controle vs. (BZ+LB)] e o efeito do tipo de aditivo [BZ vs. LB].

A composição das silagens foi analisada utilizando-se modelo que incluiu efeito fixo de tratamento e efeito aleatório de período. O ensaio de degradação *in situ* das silagens foram avaliados por delineamento em blocos casualizados. O modelo incluiu efeito fixo de tratamento, efeito fixo de vaca (A ou B), efeito fixo de período. A interação vaca $\times$ tratamento foi definida como termo de erro. Quatro estruturas de covariância foram testadas (VC, CS, AR(1) e UN), tendo sido escolhida a estrutura com menor valor do critério de informação de Akaike. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Aspectos da conservação das silagens de grãos de sorgo reconstituído

A composição química das silagens de grãos de sorgo estão apresentadas na Tabela 11. Os teores de MS (estufa, total e corrigida) não variaram entre os tratamentos, o que comprova que houve correto processo de reidratação dos grãos no momento da ensilagem. Quanto aos valores de MM, EE, NIDA, FDN, FDNi, FDA, CS e CNF não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. Houve tendência ($p=0,06$) em aumento de PB para o tratamento LB em contraste com BZ (10,22 vs. 9,72), provavelmente por conta da redução, ainda que não significativa, do teor de CS para LB, aumentando a contribuição dos outros nutrientes.

Quanto aos valores de prolamina não houve diferença significativa entre os tratamentos. Os valores de prolamina obtidos para os grãos de sorgo moídos seco, utilizados na confecção das silagens apresentaram inicialmente 7,68%. Dessa forma, ao comparar com os valores obtidos nas silagens (2,60; 3,68 e 3,74 para Controle, BZ e LB, respectivamente), nota-se que houve uma intensa degradação da matriz proteica em todas as silagens, não havendo efeito de aditivo sob a degradação da matriz proteica. Esses resultados corroboram aos encontrados por Hoffman et al. (2011), os quais não tiveram efeito da inoculação de *L. buchneri* sobre o decréscimo de prolamina em grãos úmidos de milho. Apesar da maior contribuição no processo de proteólise ser de origem microbiana (JUNGES et al., 2015), os dados mostraram que o benzoato de sódio, apesar do seu efeito inibidor, não interferiu no processo de degradação da matriz proteica. Esse comportamento pode ser explicado pela moagem fina dos grãos (1,04 mm) utilizada na confecção das silagens, a qual pode ter exposto total e/ou parcialmente o endosperma, facilitando a fermentação do grão.

Os valores de N solúvel apresentaram comportamento semelhante para o contraste Controle vs. LB+BZ. Já para o comparação entre LB e BZ, houve uma tendência ($p=0,08$) em aumentar o teor de N solúvel para as silagens inoculadas com *L. buchneri*. O N solúvel é uma das formas de avaliação da degradação da matriz protéica, tal diferença entre os tratamentos LB e BZ pode explicar uma possível influência do LB sobre a degradação da matriz proteica, não encontrada na análise de prolamina. Nesse sentido, esses resultados vão contra aos encontrados por Hoffman et al (2011), conforme comentado anteriormente.

Fernandes (2014) em trabalho com grãos úmidos e reconstituídos de milho observou aumento no N solúvel ao longo do período de armazenamento, os quais apresentaram interação ($p < 0,01$) entre híbrido, maturidade e armazenamento. Dados obtidos de N solúvel por essa autora, foram de 40,4% e 41,4% para seco reconstituído e grão úmido, respectivamente. Os menores valores obtidos para sorgo nesse experimento, relatam a maior dificuldade em solubilização da matriz proteica para esse tipo de grão. Influenciado pelas características físicas dos grãos de sorgo, os quais diferem totalmente em relação ao milho, principalmente na distribuição e concentração da proteína (prolamina) presente no grão, a qual concentra-se distribuída mais na camada periférica do endosperma, o qual é extremamente denso, espesso e duro (ROONEY; PFLUGFELDER, 1986), bem como, do tempo de armazenamento adotado (60 d).

Assim como o N solúvel, o teor de N-NH_3 está positivamente correlacionado com a digestibilidade do amido (WINDLE, 2013). Os dados de N-NH_3 obtidos nesse experimento, apresentaram o mesmo comportamento do N solúvel com maiores valores ($p < 0,01$) para LB em comparação com BZ e em relação ao controle ($p = 0,07$). Com o avanço do tempo de ensilagem, os teores de N solúvel e N-NH_3 tendem a aumentar, concomitantemente com a redução nos teores de prolamina. Isso acontece, pois essa proteína (prolamina) são solubilizadas e deaminadas no decorrer do processo fermentativo (HOFFMAN et al., 2011; KUNG Jr.; WINDLE; WALKER, 2014). Desse modo, o aumento nas concentrações de N solúvel e N-NH_3 são ótimos indicadores de atividade proteolítica em silagens (DER BEDROSIAN; NESTOR; KUNG, 2012).

Tabela 11 - Composição química bromatológica das silagens de grãos de sorgo reconstituído controle e tratada com benzoato de sódio e *L. buchneri*

Item	Tratamentos			EPM	P-valor	
	Controle	BZ	LB		C x (L+B)	L x B
MS, % MN	66,47	66,42	65,86	0,63	0,68	0,56
MS total, %	60,58	60,16	59,49	0,79	0,46	0,57
MSc, %	67,70	67,53	66,65	0,56	0,40	0,31
MM, % MS	1,23	1,33	1,35	0,03	0,02	0,73
EE, % MS	3,53	3,38	3,36	0,20	0,55	0,93
PB, % MS	9,87	9,72	10,22	0,15	0,61	0,06
Prolamina, %MS	2,60	3,68	3,74	0,53	0,14	0,93
N-Solúvel, % N total	24,36	22,84	26,51	1,23	0,84	0,08
NIDN, % N total	17,08	17,58	15,03	0,97	0,53	0,11
NIDA, % N total	22,14	23,44	22,65	0,88	0,43	0,55
N-NH ₃ , % N total	4,34	3,30	4,61	0,14	0,07	<0,01
FDN, % MS	7,43	7,12	7,19	0,37	0,57	0,89
FDNi, % MS	0,95	0,94	0,88	0,08	0,69	0,63
FDA, % MS	2,72	2,63	2,65	0,20	0,75	0,95
CS, % MS	3,73	4,77	3,88	0,46	0,33	0,22
CNF, % MS	78,02	78,59	77,93	0,43	0,67	0,33

Controle: silagem de sorgo grão sem aditivo; BZ: silagem com benzoato de sódio; LB: silagem inoculada com *L. buchneri*; MS: matéria seca; MSc: matéria seca corrida; MM: matéria mineral; EE: extrato etéreo; PB: proteína bruta; NIDN: nitrogênio indisponível em detergente neutro; NIDA: nitrogênio indisponível em detergente ácido; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; N-NH₃: nitrogênio amoniacal; FDNi: fibra em detergente neutro indigestível; CS: carboidrato solúvel; CNF: carboidrato não fibroso

Os dados de características fermentativas e estabilidade aeróbia das silagens e dietas totais estão apresentados na Tabela 12. Não houve diferença estatística quanto aos valores de MS corrigida para voláteis e pH das silagens de grãos de sorgo reconstituído. As contagens de BAL foram maiores para o tratamento LB em relação ao BZ e semelhante ao Controle. Esse comportamento é esperado, visto que, essas silagens foram inoculadas com bactérias heteroláticas, resultado semelhante ao obtido no capítulo 2 dessa dissertação.

Ao contrário dos resultados obtidos no experimento com mini-silos (capítulo 2 dessa dissertação), os dados de contagem de fungos e leveduras foram menores ($p<0,01$) para as silagens inoculadas ou tratadas com aditivos, estocadas em silos de larga escala. O aditivo químico benzoato de sódio foi mais eficiente no controle de leveduras quando comparado ao *L. buchneri*. No caso da contagem de fungos, os dois aditivos não diferiram entre si, o que mostra a ação antifúngica proporcionada pelo BZ e LB, através de seus principais produtos de fermentação,

ácido benzoico e acético, respectivamente (CHIPLEY, 2005; McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Tabela 12 - Características fermentativas e estabilidade aeróbia de silagens de grãos de sorgo reconstituído e das dietas experimentais

Item	Tratamentos				EPM	P-valor		
	Controle	BZ	LB	SGM		C x (L+B)	L x B	S x E
Características fermentativas								
MS _c , %	67,70	67,53	66,65	-	0,56	0,40	0,31	-
pH	3,71	3,75	3,70	-	0,03	0,75	0,25	-
BAL, log ufc g ⁻¹	4,91	3,92	5,27	-	0,21	0,28	<0,01	-
Fungos, log ufc g ⁻¹	4,81	0,99	1,68	-	0,80	0,01	0,57	-
Leveduras, log ufc g ⁻¹	4,73	1,89	3,43	-	0,44	<0,01	0,04	-
Perdas MS, %	4,76	3,80	4,93	-	0,54	0,56	0,19	-
Perdas por gás, %	1,21	0,67	0,93	-	0,06	<0,01	0,02	-
Estabilidade aeróbia das silagens								
EA, h	44,55	146,06	37,25	-	0,89	<0,01	<0,01	-
Ac 5 dias, °C	35,14	1,12	38,59	-	1,42	<0,01	<0,01	-
Ac 10 dias, °C	137,73	34,70	139,37	-	0,84	<0,01	<0,01	-
T. Máx, °C	51,57	49,31	37,82	-	0,29	<0,01	<0,01	-
Estabilidade aeróbia das dietas experimentais								
EA, h	26,00	33,50	27,87	18,50	1,60	0,04	0,03	<0,01
Ac 5 dias, °C	62,01	56,04	61,29	66,96	1,09	0,03	<0,01	<0,01
Ac 10 dias, °C	118,27	124,33	131,5	108,42	2,73	0,01	0,09	<0,01
T. Máx, °C	50,25	51,27	47,25	51,07	0,88	0,34	<0,01	0,14

Controle: silagem de sorgo grão sem aditivo; BZ: silagem com benzoato de sódio; LB: silagem inoculada com *L. buchneri*; SGM: tratamento sorgo grão moído nas dietas experimentais; C x (L + B): contraste para tratamento controle vs. *L. buchneri* + benzoato de sódio; L x B: contraste *L. buchneri* vs. benzoato de sódio; S x E: contraste para sorgo moído seco vs. ensilados (C + L + B)

Quanto as perdas fermentativas, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 12). Já as perdas por gases foi maior para o Controle (1,21%) em comparação aos tratamentos com aditivos. No contraste LB vs. BZ, mesmo baixas, foram obtidas maiores perdas por gás ($p=0,02$) para o LB (0,93% e 0,67%, respectivamente). De maneira geral, a técnica de reconstituição de grãos de sorgo, propicia baixas perdas de MS e gases. Entretanto, é preciso atentar para algumas premissas básicas do processo de ensilagem, como teor adequado de umidade, compactação e vedação. Processos esses, que foram seguidos rigorosamente na condução desse estudo.

No que se refere à estabilidade aeróbia das dietas fornecidas aos animais, as silagens de sorgo grãos tratadas, propiciaram melhorias na estabilidade (Tabela 12).

O tratamento BZ foi superior (33,5 h), seguido pelo LB (27,8 h) e Controle (26,0 h). As dietas que continham sorgo grão moído (SGM) foram as menos estáveis no ambiente, com quebra de estabilidade às 18,5 h de exposição. Mensurar a estabilidade aeróbia da dieta é importante, visto que é um indicativo da manutenção da qualidade da dieta que estará disponível para o consumo dos animais.

Em relação à estabilidade das silagens, o tratamento BZ foi superior em relação ao Controle e LB, com quebra da estabilidade à partir de 146 h (Tabela 12). A quebra da estabilidade aeróbia foi definida em tempo (h) necessário para elevar em 2 °C a temperatura da massa em relação ao ambiente (TAYLOR; KUNG Jr., 2002). O tratamento LB apresentou estabilidade inferior ao Controle, com quebra em 37,2 e 44,5 h, respectivamente.

Embora esse comportamento não seja esperado, teoricamente, silagens inoculadas com *L. buchneri* apresentam maior estabilidade aeróbia (KLEINSCHMIT; KUNG Jr., 2006; KRISTENSEN et al., 2010; KLEINSHMITT, 2015). Algumas causas podem ser apontadas: uma delas é a concentração de ácido acético obtidas nessas silagens (0,32% MSc) (Tabela 13), a qual foi semelhante entre os tratamentos Controle e BZ. Essa concentração de ácido acético, não foi suficiente em controlar o crescimento de fungos e leveduras em aerobiose, diminuindo sua estabilidade. Esses valores de ácido acético encontrados foram inferiores aos obtidos no capítulo 2 dessa dissertação, onde para o tratamento LB a concentração foi de 1,7% (Tabela 6), nesse caso, os efeitos de aumento na estabilidade aeróbia foram pronunciados. Outro fator é a concentração de ácido láctico obtida nas silagens com *L. buchneri* (3,22% MSc) (Tabela 13) estatisticamente ($p=0,04$) superior ao BZ. Weinberg e Muck (1996) relatam que silagens com altos teores de ácido láctico são mais susceptíveis à deterioração aeróbia, através da atividade de leveduras que utilizam o ácido láctico como substrato para o seu crescimento, reflexo disso foram os maiores valores de etanol encontrados em relação ao BZ (0,45 e 0,17 % MSc, respectivamente) (Tabela 13).

Quanto aos teores de ácido propiônico, butírico, iso-butírico, iso-valérico e valérico não foram encontrados diferenças entre os tratamentos. Da mesma forma, 1,2-propanodiol, 1-propanol, acetona, acetato de etila, acetato de propila, 2,3-butanodiol, metanol, 2-butanol e álcool iso-propílico também não tiveram diferenças significativas (Tabela 13).

Em relação aos resultados obtidos para ácido fórmico, o tratamento controle foi inferior ($p=0,02$) em relação aos tratados com aditivos. O ácido fórmico, segundo Pahlow et al. (2003) é um produto de fermentação de algumas bactérias anaeróbicas facultativas, tais como as enterobactérias, que fermentam glicose a ácido acético e fórmico, bem como, etanol e 2,3-butanodiol. Supostamente, os tratamentos com aditivos foram menos eficientes em controlar o crescimento inicial das enterobactérias. Quanto aos teores de lactato de etila, houve tendência ($p=0,06$) de aumento para o tratamento Controle vs. LB+BZ, da mesma forma no contraste LB vs. BZ, onde LB foi superior. Esse comportamento reflete à atividade de bactérias homofermentativas no Controle e LB, acompanhada pela maior produção de ácido láctico, mesmo com a inoculação de bactérias heterofermentativas.

Tabela 13 - Produtos de fermentação obtidos de silagens de grãos de sorgo reconstituídos controle e tratada com benzoato de sódio e *L. buchneri*

Item	Tratamentos			EPM	P-valor	
	Controle	BZ	LB		C x (L+B)	L x B
Ácido láctico, % MS _C	2,89	1,95	3,22	0,35	0,50	0,04
Ácido acético, % MS _C	0,36	0,38	0,32	0,04	0,86	0,43
Ácido propiônico, mg kg ⁻¹ MS _C	72,14	78,73	69,54	8,43	0,85	0,47
Ácido butírico, mg kg ⁻¹ MS _C	18,02	22,42	18,81	2,43	0,41	0,33
Etanol, % MS _C	0,48	0,17	0,45	0,06	0,06	0,01
1,2-Propanodiol, % MS _C	124,3	268,1	694,1	272,2	0,32	0,31
1-Propanol, mg kg ⁻¹ MS _C	18,66	2,06	14,39	6,43	0,23	0,22
Ácido isobutírico, mg kg ⁻¹ MS _C	7,63	6,37	4,15	1,29	0,18	0,26
Ácido iso-valérico, mg kg ⁻¹ MS _C	11,54	10,36	8,12	1,95	0,37	0,44
Ácido valérico, mg kg ⁻¹ MS _C	4,10	4,60	3,90	1,02	0,89	0,66
Ácido fórmico, mg kg ⁻¹ MS _C	71,75	130,9	111,7	13,0	0,02	0,33
Acetona, mg kg ⁻¹ MS _C	8,46	10,42	8,14	0,91	0,49	0,13
Acetato de etila, mg kg ⁻¹ MS _C	19,02	4,99	12,68	5,30	0,16	0,34
Lactato de etila, mg kg ⁻¹ MS _C	167,1	76,72	148,5	19,70	0,06	0,04
Acetato de propila, mg kg ⁻¹ MS _C	0,72	0,59	0,57	0,12	0,40	0,92
2,3-Butanodiol, mg kg ⁻¹ MSC	63,21	55,05	75,39	8,95	0,86	0,15
Metanol, mg kg ⁻¹ MS _C	12,14	11,39	11,05	1,42	0,61	0,87
2-Butanol, mg kg ⁻¹ MS _C	1,08	0,49	1,10	0,51	0,67	0,43
Álcool iso-propílico, mg kg ⁻¹ MS _C	0,85	0,87	0,82	0,12	0,95	0,81

Controle: silagem de sorgo grão sem aditivo; BZ: silagem com benzoato de sódio; LB: silagem inoculada com *L. buchneri*; SGM: tratamento sorgo grão moído nas dietas experimentais; C x (L + B): contraste para tratamento controle vs. *L. buchneri* + benzoato de sódio; L x B: contraste *L. buchneri* vs. benzoato de sódio

4.3.2 Degradabilidade *in situ* da MS de silagens de grãos de sorgo

Ao contrário dos resultados obtidos para benzoato de sódio no experimento anterior (capítulo 2 dessa dissertação) onde a fração A foi inferior e a B superior, explicado pelos menores valores de N solúvel e menor solubilidade da matriz proteica. Nesse segundo experimento o tratamento BZ apresentou maior fração A da MS em comparação ao tratamento Controle e foi semelhante estatisticamente ao LB (Tabela 14). Da mesma forma, os ensilados apresentaram efeito positivo sobre a fração solúvel da MS em comparação ao não ensilado (SGM). Não houve diferença estatística entre os tratamentos ensilados para a fração B, apenas em comparação ao tratamento seco moído, resultado dos valores de N solúvel e prolamina obtidos, os quais foram semelhantes estatisticamente (Tabela 11). Os tratamentos LB e Controle apresentaram valores de fração indigestível (C) semelhantes, porém inferiores ($p<0,01$) ao SGM. Já para o tratamento BZ o mesmo foi eficiente em reduzir a fração C da MS, sendo inferior ($p<0,01$) em comparação aos outros tratamentos.

Embora os resultados apontam efeito superior para o tratamento BZ, quando observa-se os dados de degradabilidade potencial da MS, o efeito positivo desse aditivo nos outros atributos (A, B e C) é mascarado. Não houve diferença entre os ensilados para a degradabilidade total (DEG_{pot} , %) da MS em 48 h de avaliação, apenas dos ensilados vs. seco. Ao contrário, se observarmos as taxas de degradação (K_d , % h^{-1}), o tratamento BZ foi superior, com maior taxa de degradabilidade em comparação aos outros tratamentos, explicado pela maior participação da fração A nesse tratamento (Tabela 14).

As maiores taxas de degradação encontradas nesse experimento para o tratamento BZ são contrárias às obtidas no experimento anterior, onde observou-se que as silagens tratadas com *L. buchneri* exclusivo ou em associação com outros microrganismos (Combo) promoveram maiores taxas de degradação (Tabela 2). Diferente desse experimento, no experimento anterior os tratamentos com *L. buchneri* apresentaram maior fração A da MS. De maneira geral, é esperado maiores taxas de degradação da MS e de outros nutrientes em grãos processados. Em estudo com grãos úmidos de milho, Ladely et al. (1995) encontraram taxas de digestão do amido *in vitro* 76% mais rápida que o milho grão quebrado (9,7 vs. 5,5% h^{-1} , respectivamente).

Tabela 14 - Influência do sorgo grão moído seco, reconstituído e ensilado ou não com aditivos sobre a fração solúvel (A), fração potencialmente degradável (B), fração indigestível (C), taxa de degradação, degradação potencial (DEG_{pot}) da MS e degradabilidade efetiva (DEG_{Ef})

Variáveis	Tratamentos				EPM	P-valor
	Controle	BZ	LB	SGM		
A (%)	36,51b	42,81a	38,69ab	17,29c	1,07	<0,01
B (%)	51,37b	50,42b	49,44b	58,21a	3,68	<0,01
C (%)	12,10b	6,76c	11,85b	24,49a	3,06	<0,01
Kd (% h ⁻¹)	3,95b	4,59a	3,62b	2,76c	0,18	<0,01
DEG _{pot} (%)	87,99a	93,23a	88,14a	75,50b	3,06	<0,01
DEG _{Ef} , 2% h ⁻¹	70,18b	77,66a	70,53b	51,04c	1,85	<0,01
DEG _{Ef} , 5% h ⁻¹	58,79b	66,70a	59,53b	38,00c	1,18	<0,01
DEG _{Ef} , 8% h ⁻¹	53,19b	61,00a	54,19b	32,23c	0,95	<0,01

Controle: tratamento sem aditivo; BZ: benzoato de sódio; LB: *L. buchneri*; SGM: sorgo grão moído; A: fração solúvel; B: fração potencialmente digestível; C: fração indigestível; Kd: taxa de degradação; DEG_{pot}: (100 – C). DEGEf: estimada de acordo com a taxa de passagem para cada tratamento de acordo com a fórmula de Ogden et al. (2005). Médias seguidas de mesma letra na linha são semelhantes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Aguerre, Cajaville e Repetto (2015) em estudo com silagens de grãos de sorgo com seis diferentes tratamentos: grão moído não ensilado (i); hidratado por 24 h (ii); germinado por 5 d (iii); germinação por 5 d e ensilado por 21 d (iv); grão inteiro ensilado por 21 d (v) e grão moído ensilado por 21 d (vi). Os autores observaram valores de degradabilidade da MS semelhantes entre os tratamentos iii e v. Os tratamentos iv e vi aumentaram a degradabilidade da MS no rúmen e trato total ($p < 0,05$). Grãos moídos ou hidratados por 24 h apresentaram resultados semelhantes para degradabilidade no trato total, no entanto, no rúmen, os grãos hidratados obtiveram maior degradabilidade.

Esses resultados obtidos por Aguerre, Cajaville, Repetto (2015) corroboram aos obtidos nesse estudo, onde os grãos moídos reidratados e ensilados foram superiores aos grãos não ensilados. Os autores compararam os dois métodos de ensilagem para grãos de sorgo reconstituídos (germinação ou moagem pré-reconstituição e ensilagem) e apontaram que os dois métodos são eficientes em aumentar a degradabilidade da MS de grãos de sorgo. No caso da germinação, esse resultado estaria atrelado à uma sinergia entre germinação e ensilagem, assim como, outros estudos disponíveis na literatura, tais como Pflugfelder e Rooney (1986). Por outro lado, a moagem do grão, seguido pela reconstituição está relacionado aos benefícios da exposição do endosperma ao processo fermentativo (AGUERRE; CAJARVILLE; REPETTO, 2015).

A degradabilidade efetiva da MS obtida através do modelo proposto por Orskov e McDonald (1979) mostrou superioridade para os tratamentos ensilados vs. sorgo moído seco, em todas as taxas de passagens (K_p) (2, 5 e 8% h^{-1}). O tratamento BZ obteve maior degradabilidade efetiva da MS em todas as taxas de passagens. Já para os tratamentos Controle e LB não obteve-se diferença significativa.

Passini et al. (2002) em experimento com grãos úmidos de milho e sorgo, encontraram degradabilidade efetiva de silagens de sorgo grão inferiores quando comparado ao sorgo moído fino ($p < 0,01$). Já quando testou-se a degradabilidade efetiva para grãos úmidos de milho, os resultados foram contrários, com maiores valores para o tratamento ensilado. Embora a técnica de processamento do grão, tal como a ensilagem, tem a capacidade de aumentar o valor nutritivo do sorgo (PFLUGFELDER e ROONEY, 1986), Passini et al. (2002) adotaram tamanho de partículas diferentes para o tratamento ensilado (5 mm) e moído fino (0,2 mm), atribuindo os resultados negativos para as silagens de sorgo à esse fator. Já para o milho grão, o qual apresenta um endosperma diferente do sorgo, com uma matriz proteica menos densa e compactada (PFLUGFELDER e ROONEY, 1986), este cereal pode ser mais responsivo a ensilagem, mesmo com tamanho de partículas maiores.

Diante desse aspecto, os resultados obtidos no experimento anterior e no presente estudo, apontam significativa melhora no aproveitamento da MS de grãos de sorgo, quando o mesmo é submetido à moagem, reidratação e ensilagem. Nesse sentido, o tempo de armazenamento dos grãos em anaerobiose adotado nesse estudo (60 d) foi eficiente em incrementar taxas de degradabilidade superiores quando comparado ao sorgo seco moído.

4.3.3 Desempenho dos animais

Os dados de produção e composição do leite não variaram estatisticamente em função dos diferentes tratamentos, exceto para a composição de gordura (%) e nitrogênio ureico no leite (Tabela 15). Apesar das diferenças não significativas na produção de leite, os animais alimentados com silagens provenientes dos tratamentos Controle e LB apresentaram produção superior em 0,69 e 0,4 $kg\ d^{-1}$, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Moraes (2016) em

experimento com silagem de milho grão reconstituído, onde obteve-se diferença numérica de produção de leite superior para os tratamentos ensilados. Embora nesse estudo a produção de leite para o tratamento BZ ter sido, em média menor que o SGM. Moraes (2016) obteve produções superiores para o tratamento BZ comparado ao milho seco em 1,6 kg d⁻¹.

Para a variável gordura (%) houve uma tendência ($p=0,07$) de diminuição na concentração de gordura em ocasião do uso de grãos de sorgo fermentados na dieta. O fato da concentração de gordura ter sido menor nos tratamentos ensilados se deve à uma possível acidose ruminal, ocasionada pelo maior aporte de amido fermentável nesses tratamentos, mesmo não afetando a produção de leite. Dados semelhantes foram obtidos por Bradford e Allen (2004) em experimento com grãos de milho ensilados e secos na dieta, onde houve uma redução no percentual de gordura no leite de 3,5% para o tratamento com grão moído seco vs. 3,2% para milho ensilado. Ferraretto, Krump e Shaver (2013) em revisão de trabalhos publicados com grãos de milho ensilado, seco e floculado, relatam redução ($p=0,01$) nos valores de gordura no leite (%) na faixa de 3,59 vs. 3,41 para grãos secos e ensilados, respectivamente. Da mesma forma, Bade et al. (1972) em trabalho com grãos de sorgo reconstituído obtiveram resultados semelhantes, redução ($p<0,05$) no percentual de gordura no leite de vacas alimentadas com sorgo ensilado (3,30%) vs. seco moído (3,63%).

O maior aporte ou consumo de amido fermentável pode reduzir o pH ruminal através da produção de ácido lático no rúmen e com isso reduzir o processo de bio-hidrogenação realizado pelas bactérias ruminais, o que muda o perfil de ácido graxo produzido. Dessa forma, há uma maior ação da enzima Δ^9 desaturase (BRADFORD; ALLEN, 2004), a qual está relacionada a diminuição da síntese de gordura na glândula mamaria. Embora não tenham sido realizadas as análises de perfis de ácidos graxos no leite nem da atividade dessa enzima (Δ^9 desaturase), os resultados obtidos nesse estudo podem ser suportados ou comparados ao trabalho de Bradford e Allen (2004).

Os dados de concentração de NUL no leite foram menores ($p<0,01$) para os tratamentos com sorgo ensilado. Esse comportamento é esperado, visto que, a maior eficiência no uso do N ingerido na dieta ocasionado pelo maior aporte de amido digestível nos tratamentos ensilados, o qual possivelmente foi utilizado para síntese de proteína microbiana, através da ação dos microrganismos presentes no

rúmen. Tais constatações podem ser visualizadas nas maiores relações alantoína: creatinina para os tratamentos BZ e LB, embora sem diferença estatística, possivelmente ocasionada pelo método de coleta de urina “spot” (Tabela 16). Houve uma pequena tendência ($p=0,12$) de maior produção de proteína microbiana para os tratamentos BZ e LB em contraste com Controle, além de uma diferença numérica para o SGM (Tabela 16), embora não tenha tido diferença na composição de proteína no leite. O fato dos valores de NUL obtidos nesse experimento serem superiores (média de $16,61 \text{ mg dL}^{-1}$ para os tratamentos ensilados e $17,67 \text{ mg dL}^{-1}$ para o SGM) a diversos experimentos com vacas leiteiras disponíveis na literatura (SORIANO et al., 2000; FERRARETTO et al., 2013; MORAIS, 2016) se dá pelo maior teor de PB na dieta ingerida pelos animais (média de $18,3 \pm 0,03\%$) obtidas nesse experimento.

Morais (2016) constatou menores teores de NUL nos tratamentos com milho grão ensilado vs. moído seco e uma maior relação alantoína: creatinina e alantoína + ácido úrico: creatinina nas dietas com silagem acrescida com benzoato de sódio, a qual segundo a autora, remete a uma maior eficiência de síntese microbiana para esse tratamento. É esperado o aumento dessas relações de derivados de purina em animais tratados com grãos úmidos ou reidratados, contudo sem alterar a constituição de proteína no leite (SAN EMETERIO et al., 2000; KRAUSE; COMBS; BEAUCHEMIN, 2002; MORAIS, 2016).

Os dados de eficiência energética alimentar (EL_L leite CMS^{-1} ; Leite kg de CMS^{-1}) foram superiores para os tratamentos ensilados (Controle, LB e BZ) em comparação ao SGM. Esse resultado é reflexo do menor CMS observado nos tratamentos ensilados (20,2; 20,3; 20,1; para Controle, BZ e LB vs. 21,3 kg d^{-1} SGM) e a manutenção na produção de leite. Bade et al. (1972) obtiveram valores de eficiência maiores ($p<0,05$) para kg leite CMS^{-1} de 2,06 em vacas alimentadas com sorgo reconstituído em contraste com sorgo seco (1,97). Diferente desses resultados Netemeyer et al. (1976), em experimento semelhante, não encontrou diferença nos valores de eficiência alimentar. Recentemente, em uma revisão de literatura Ferraretto, Krump e Shaver (2013) também não encontraram diferenças significativas na eficiência alimentar de vacas alimentadas a partir de diversos métodos de processamento de milho. Da mesma forma, Moraes (2016) em experimento sob condições brasileiras também não encontrou diferenças.

Tabela 15 - Variáveis de composição do leite e eficiência alimentar das vacas em lactação alimentadas com diferentes fontes de sorgo ensilado ou seco

Item	Tratamentos				EPM	P-valor		
	Controle	BZ	LB	SGM		S x E	C x (L+ B)	L x B
Composição do leite								
Leite, kg d ⁻¹	32,47	31,57	32,10	31,78	1,12	0,57	0,21	0,37
Leite 3,5%, kg d ⁻¹	31,84	31,30	31,27	32,04	1,23	0,33	0,37	0,96
Gordura, %	3,39	3,46	3,35	3,55	0,12	0,07	0,85	0,25
Gordura, kg	1,09	1,08	1,07	1,12	0,05	0,13	0,60	0,65
Proteína, %	3,11	3,13	3,10	3,08	0,05	0,25	0,98	0,42
Proteína, kg	1,00	0,97	0,98	0,96	0,02	0,18	0,21	0,58
Lactose, %	4,75	4,73	4,75	4,73	0,03	0,60	0,66	0,24
ST, g kg ⁻¹	12,24	12,31	12,20	12,36	0,15	0,22	0,86	0,36
ESD, %	8,84	8,84	8,85	8,81	0,07	0,45	0,97	0,92
CCS, x 100mL ⁻¹	83,74	74,04	76,86	76,91	15,5	0,88	0,37	0,79
NU, mg dL ⁻¹	16,63	16,81	16,40	17,67	0,35	<0,01	0,93	0,28
CAS, %	2,37	2,38	2,36	2,35	0,05	0,35	0,94	0,59
PCAS, kg	75,93	75,97	76,12	76,04	0,25	0,85	0,61	0,56
Dados de eficiência								
EL _L kg leite, Mcal kg ⁻¹	0,67	0,67	0,66	0,68	0,01	0,14	0,88	0,26
EL _L total, Mcal d ⁻¹	21,76	21,34	21,39	21,71	0,77	0,57	0,32	0,90
EL _L leite CMS ⁻¹	1,07	1,05	1,06	1,02	0,02	0,02	0,47	0,50
EL _L leite CMS dig ⁻¹ .	1,55	1,54	1,53	1,53	0,04	0,67	0,59	0,77
Leite kg CMS ⁻¹	1,61	1,56	1,60	1,49	0,05	<0,01	0,31	0,14
Leite 3,5% CMS ⁻¹	1,56	1,54	1,55	1,50	0,04	0,10	0,56	0,64
Controle: tratamento sem aditivo; BZ: tratamento com benzoato de sódio; LB: tratamento com <i>L. buchneri</i> ; SGM: sorgo grão moído fino; C x (L + B): contraste para tratamento controle vs. <i>L. buchneri</i> + benzoato de sódio; L x B: contraste <i>L. buchneri</i> vs. benzoato de sódio; S x E: contraste para sorgo moído seco vs. ensilados (C + L + B)								

O fato dos resultados de experimentos disponíveis na literatura com grãos de sorgo ensilado ou fornecido moído seco à vacas leiteiras serem contrários à esse experimento, se dá quanto a diferença no processamento dos grãos. Os experimentos citados (os quais são semelhantes a esse estudo), tal como Netemeyer et al. (1976), utilizaram a forma de ensilagem de grãos de sorgo inteiros (imersos em água durante 24 h e ensilados), diferente da técnica utilizada nesse experimento, onde os grãos foram finamente moídos e ensilados. Dessa forma, a moagem fina pode ter sido capaz de aumentar a saciedade do animal através da rápida fermentação ruminal e, com isso, propiciar maior aporte de energia digestível por kg de dieta consumida (Tabela 17), manter a produção de leite (Tabela 15) e diminuir o consumo (Tabela 17).

Tabela 16 - Variáveis metabólicas das vacas em lactação alimentadas com diferentes fontes de sorgo ensilado ou seco

Item	Tratamentos				EPM	P-valor		
	Controle	BZ	LB	SGM		S x E	C x (L+ B)	L x B
Variáveis medidas na urina								
Volume urina, L	21,14	21,50	21,83	19,96	3,14	0,62	0,87	0,93
PURtot, mmol d ⁻¹	284,59	327,39	326,6	295,22	22,5	0,49	0,12	0,98
AL: PURtot	92,51	93,76	93,35	93,23	0,54	0,96	0,10	0,58
Derivados purina	47,55	47,70	47,51	47,52	0,77	0,79	0,85	0,57
Purina absorvida	278,86	328,99	328,33	291,39	26,25	0,49	0,12	0,98
N microbiano	202,74	239,19	238,71	211,85	18,96	0,49	0,12	0,98
PBmic, g	1267,1	1494,9	1491,9	1324,1	118,7	0,49	0,12	0,98
AL: CRE	1,83	2,08	2,04	1,87	0,13	0,46	0,18	0,86
AcUR: CRE	0,12	0,12	0,14	0,12	0,01	0,43	0,51	0,26
AL+AcUR: CRE	1,96	2,20	2,19	1,98	0,14	0,44	0,19	0,95
PBmic kgNDT ⁻¹	88,48	101,1	101,1	87,03	8,20	0,29	0,20	0,99
Variáveis medidas no sangue								
AGL, mg dL ⁻¹	0,25	0,28	0,36	0,30	0,03	0,99	0,08	0,11
Lactato total	8,15	6,91	6,53	5,71	1,08	0,22	0,27	0,79
Insulina, µIU ml ⁻¹	16,26	14,02	13,33	13,49	1,41	0,46	0,09	0,67

PURtot: purina totais; PBmic: proteína bruta de origem microbiana; AL: CRE= relação alantoína creatinina; AcUR:CRE= relação ácido úrico creatinina; NDT: nutrientes digestíveis totais; Controle: tratamento sem aditivo; BZ: tratamento com benzoato de sódio; LB: tratamento com *L. buchneri*; SGM: sorgo grão moído fino; C x (L + B): contraste para tratamento controle vs. *L. buchneri* + benzoato de sódio; L x B: contraste *L. buchneri* vs. benzoato de sódio; S x E: contraste para sorgo moído seco vs. ensilados (C + L + B)

Em relação as variáveis sanguíneas AGL, Lactato total e Insulina (Tabela 16), as mesmas não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos. Para ácido graxo livre medidos no sangue, apresentou tendência leve ($p=0,08$) em diminuição para o tratamento Controle em contraste com os ensilados com aditivos. Embora não tenha tido diferença na variação de PV dos animais (Tabela 19). Já para insulina, o comportamento foi o contrário, com aumento ($p=0,09$) para o Controle em relação aos aditivos.

Quanto as variáveis comportamentais (Tabela 17), as vacas apresentaram maior CMS ($p<0,01$) para o tratamento SGM (21,3 kg dia⁻¹) comparado aos ensilados (20,2 para Controle; 20,3 BZ e 20,1 LB, kg dia⁻¹). O tempo gasto com ingestão e mastigação foi maior ($p<0,01$) para o tratamento SGM em contraste aos ensilados, o que justifica o maior CMS observado, sem afetar o número de refeições. Houve uma tendência ($p=0,09$) de aumento do número de refeições para o tratamento BZ em contraste com LB, porém resultado ainda não reportado na literatura.

Tabela 17 - Comportamento ingestivo e índice de seleção das vacas em lactação alimentadas com diferentes fontes de sorgo ensilado ou seco

Item	Tratamentos				EPM	P-valor		
	Controle	BZ	LB	SGM		S x E	C x (L + B)	L x B
CMS, kg d ⁻¹	20,20	20,33	20,10	21,32	0,47	<0,01	0,75	0,40
Nº Refeições	10	11	10	10	0,43	0,91	0,32	0,09
Ingestão, min d ⁻¹	208,8	221,9	205,1	253,1	11,10	<0,01	0,66	0,19
Ruminação, min d ⁻¹	559,1	569,1	574,2	566,1	14,01	0,92	0,39	0,77
Mastigação, min d ⁻¹	767,9	792,4	776,7	820,6	18,84	0,01	0,32	0,42
Mastigação CMS ⁻¹	37,98	38,64	38,78	38,48	1,18	0,98	0,47	0,90
IS peneira 19 mm, %	105,2	101,6	100,1	101,1	2,05	0,62	0,08	0,60
IS peneira 8 mm, %	96,88	96,77	97,35	96,25	0,63	0,29	0,81	0,50
IS fundo, %	100,1	101,3	101,4	101,7	0,52	0,17	0,05	0,94

CMS: consumo de matéria seca; IS: Índice de seleção; Controle: tratamento sem aditivo; BZ: tratamento com benzoato de sódio; LB: tratamento com *L. buchneri*; SGM: sorgo grão moído fino; C x (L + B): contraste para tratamento controle vs. *L. buchneri* + benzoato de sódio; L x B: contraste *L. buchneri* vs. benzoato de sódio; S x E: contraste para sorgo moído seco vs. ensilados (C + L + B)

O menor CMS obtido para os tratamentos ensilados é esperado, tendo em vista o maior aproveitamento do amido no trato total quando o grão é processado, dessa forma, a quantidade de alimento a ser ingerido para satisfazer as exigências do animal tende a ser menor. Essa evidência pode ser comprovada ao observar os valores de energia líquida da dieta (Mcal kg⁻¹) obtidas nesse experimento (Tabela 19), a qual foi maior ($p=0,01$) para os tratamentos ensilados vs. moído seco (1,55 vs. 1,49 Mcal kg⁻¹, respectivamente). Entretanto, em decorrência de um maior CMS para o tratamento SGM, o consumo de energia líquida diária foi semelhante (Tabela 19), o que explica a manutenção na produção de leite, estatisticamente iguais entre os tratamentos.

Ferraretto, Crump e Shaver (2013) em revisão de literatura com processamento de grãos de milho, observaram redução no CMS quando o grão é ensilado, comparado ao grão moído seco (22,4 vs. 23,6 kg d⁻¹). Oba e Allen (2003) em experimento com milho grão úmido e moído seco e dois níveis de amido na dieta (alto: 32% e baixo: 21%), obtiveram resultados de CMS diferentes ($p<0,01$) em dietas com alto amido (20,8 para grão úmido e 22,5 para moído seco, kg dia⁻¹), já para as dietas de baixo amido não constataram diferenças (média de 19,7 kg dia⁻¹). Contrário à esses resultados, Netemeyer et al. (1976) e Bush et al. (1979) em trabalho com grãos de sorgo reconstituído em comparação ao moído seco, não obtiveram diferença no CMS entre os tratamentos. Da mesma forma, Morais (2016) não encontrou diferença entre milho grão reconstituído ensilado em contraste com

grão moído seco, atribuindo esse resultado ao teor de amido da dieta (média de 26%).

Os teores de amido das dietas nesse experimento foram em média 25,8%, o qual foi calculado à partir dos resultados de amido de cada ingrediente em função da sua contribuição na dieta. Além da maior contribuição energética das rações com sorgo ensilado, outro fator que pode ter influenciado é o tamanho de partícula do sorgo (1,04 mm) utilizado nas ensilagens e para constituir o tratamento SGM. De acordo com os resultados de San Emeterio et al. (2000) a moagem fina do milho resulta em maior redução no CMS comparado ao moído grosseiramente, embora não houve diferença estatística. O sorgo por ter sido reidratado e ensilado, pode ter sido mais eficiente em regular o consumo dos animais, ocasionado por uma rápida fermentação no rúmen. Contudo, para o tratamento SGM, embora moído fino, foi menos eficiente no controle do consumo.

Em relação aos efeitos de tamanho de partículas da dieta, os animais demonstraram preferência por partículas maiores 19 mm e finas <8 mm. Houve uma tendência de seleção de partículas de 19 mm ($p=0,08$) para o tratamento Controle em comparação ao LB e BZ. Contrário à isso, os animais selecionaram mais partículas finas <8 mm para os tratamentos LB e BZ em comparação ao Controle.

A digestibilidade aparente da maioria dos nutrientes foram influenciadas pelos tratamentos, principalmente no contraste sorgo grão ensilado vs. moído seco. O tratamento LB obteve maiores valores de digestibilidade da MS, MO e PB (Tabela 18), sendo superior no contraste com BZ. Maiores digestibilidades do EE e CNF foram obtidas no Controle. Os animais alimentados com silagens do tratamento BZ obtiveram menores digestibilidades dos nutrientes, exceto amido, em comparação ao LB e Controle, mostrando uma possível influência do benzoato de sódio no processo fermentativo no silo e rúmen, entretanto esse tratamento foi superior ao SGM.

Por ser um aditivo utilizado no controle do crescimento de fungos, leveduras e bactérias, bem como, eficiente na redução do crescimento e morte celular (CHIPLEY, 2005), o benzoato de sódio precisa ser melhor estudado quanto ao seu efeito sobre os microrganismos ruminais. Os resultados nesse experimento mostram um efeito negativo no desempenho animal, através dos menores valores de digestibilidade encontrados.

Morais (2016) obteve valores de digestibilidade da MS e MO superiores a desse experimento (MS média de 72,65% para milho grão reconstituído e 69,1% moído seco e MO média de 76,05% ensilado e 73,2% moído seco; $p < 0,01$). Essa maior digestibilidade se dá pela utilização do milho na dieta, o qual tem valor nutritivo superior ao sorgo, mesmo processado (ROONEY; PFLUGFELDER, 1986). Dessa forma é esperado digestibilidades menores com o uso de sorgo na dieta.

Bush et al. (1979) obtiveram valores de digestibilidade aparente da MS e MO inferiores em dietas com sorgo seco moído e reconstituído (61,95% MS e 64,15% MO) não obtendo diferença entre os tratamentos. Da mesma forma, em experimento semelhante, Netemeyer et al. (1976) encontraram digestibilidade aparente de 64,15% para MS e 66,85% MO. Ambos trabalhos utilizaram sorgo grão reconstituído e ensilado após imersão do grão em água, com o objetivo de desencadear um processo germinativo. Contudo, com base nos resultados obtidos por esses autores, pode-se observar que essa técnica não foi eficiente em promover um aumento no seu aproveitamento na dieta total, dessa forma os resultados obtido nesse experimento são promissores quanto a técnica de moagem, reidratação e ensilagem do grão, haja visto do incremento em digestibilidade do mesmo, comparado aos poucos resultados disponíveis na literatura.

No tocante a digestibilidade do amido presente nas dietas experimentais (Tabela 18). Houve aumento ($p < 0,01$) na digestibilidade do amido em dietas com sorgo grão ensilado em comparação ao SGM, para essa variável não houve efeito de aditivo. A média de digestibilidade do amido para os tratamentos ensilados foi de 86,9% vs. 79,1% para SGM, ou seja, o processamento do sorgo através da ensilagem proporcionou aumentos de digestibilidade do amido em 9,86%.

Essa maior digestibilidade do amido encontrada nas dietas com sorgo ensilado, se deve à solubilização da matriz proteica presente no grão, a qual foi facilitada através da moagem, reidratação e ensilagem do grão. Os principais fatores para o aumento da disponibilidade do amido em silagens é explicada pela intensidade da fermentação através da degradação de proteínas e duração do período de estocagem (HOFFMAN et al., 2011), fatores que diminuem a presença de prolamina. Fernandes (2014) obteve interação ($p < 0,01$) entre híbrido, maturidade e armazenamento em relação a degradabilidade da fração A de amido. Adicionalmente, quando o grão é ensilado, independente da maturidade, as

diferenças no que se refere a vitreosidade do grão são extintas (FERNANDES, 2014).

Tabela 18 - Valores de digestibilidade aparente dos nutrientes, amido fecal e diferentes cálculos de digestibilidade do amido obtidas nas dietas com diferentes fontes de sorgo ensilado ou seco

Item	Tratamentos				EPM	P-valor		
	Controle	BZ	LB	SGM		S x E	C x (L+ B)	L x B
Digestibilidade dos nutrientes								
Dig. MS, %	69,00	68,08	69,49	66,75	0,55	<0,01	0,73	0,05
CMS dig, kg	14,01	13,85	13,97	14,24	0,35	0,15	0,66	0,63
Dig. MO, %	71,65	70,79	72,68	69,99	0,53	<0,01	0,89	0,01
Dig. PB, %	72,95	71,76	74,25	69,41	0,81	<0,01	0,95	0,03
Dig. FDN, %	41,76	42,05	43,29	43,80	1,00	0,15	0,39	0,31
Dig. EE, %	91,66	90,05	90,02	87,17	0,45	<0,01	<0,01	0,97
Dig. CNF, %	93,53	93,32	92,68	89,12	0,75	<0,01	0,56	0,55
NDT, %	72,36	71,78	72,52	70,11	0,51	<0,01	0,72	0,28
Dig. Amido, %	87,22	86,77	86,98	79,14	0,88	<0,01	0,73	0,86
Amido fecal, %	3,97	4,06	4,09	5,98	0,22	<0,01	0,67	0,90
Predições de digestibilidade aparente do amido								
Zinn et al. (2007) ¹	98,21	98,18	98,16	97,36	-	-	-	-
Owens; Hassen (2011) ²	95,43	95,33	95,30	93,15	-	-	-	-
Fredin et al. (2014) ³	95,03	94,92	94,88	92,52	-	-	-	-

Dig: Digestibilidade; MS: matéria seca; CMS: consumo de matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; EE: extrato etéreo; CNF: carboidrato não fibroso; NDT: nutrientes digestíveis totais; Controle: tratamento controle sem aditivo; BZ: tratamento com benzoato de sódio; LB: tratamento com *L. buchneri*; SGM: sorgo grão moído fino; C x (L + B): contraste para tratamento controle vs. *L. buchneri* + benzoato de sódio; L x B: contraste *L. buchneri* vs. benzoato de sódio; S x E: contraste para sorgo moído seco vs. ensilados (C + L + B).

¹Dig. Amido (%) = $99,9 - 0,413 \times \text{amido fecal} - 0,0104 \times \text{amido fecal}^2$;

²Dig. Amido (%) = $99,95 - 1,1367 \times (\text{amido fecal})$;

³Dig. Amido (%) = $100 - (1,25 \times \text{amido fecal})$.

A prolamina exerce grande influência na degradabilidade do amido, através da sua lenta degradação pelas bactérias no rúmen (HOFFMAN; SHAVER, 2011). Prova disso, foram as correlações negativas ($R^2=0,74$; $p<0,01$) entre fração A de amido e concentração de proteína (prolaminas) encontrada por Fernandes (2014), de forma que, quanto maior a quantidade de prolamina, menor a fração A de amido. Nesse experimento, fatores como a moagem fina e ensilagem do grão com umidade em torno de 33,75% facilitaram a degradação dessa prolamina, conforme citado anteriormente. Rompendo a matriz proteica, ocorre dissociação dos grânulos de amido, com isso a área superficial e a colonização das bactérias ruminais aumenta, por consequência a degradabilidade (HUNTINGTON; HARMON; RICHARDS, 2006).

Ainda na Tabela 18, estão apresentadas os valores de digestibilidade aparente do amido, estimados à partir das equações propostas por Fredin et al. (2014), Zinn et al. (2007) e Owens e Hassen (2011). Apesar de não ter sido realizado análise estatística para esses dados, nota-se a discrepância de valores estimados em comparação aos obtidos no experimento, variando em torno de 5-6 unidades percentuais. Embora essas equações superestimam os valores de digestibilidade do amido, estimar a digestibilidade da ração fornecida aos animais, durante a lactação é uma técnica importante, pois valores de digestibilidade de amido no trato total estão associados à produção de leite (FIRKINS et al., 2001).

A concentração de amido nas fezes tem mostrado e sido utilizado como ferramenta para avaliar o processamento de grãos (ZINN et al., 2007). No presente experimento, os teores de amido encontrados nas fezes de animais alimentados com silagem de grãos de sorgo reconstituído foram menores ($p<0,01$) às fezes de animais alimentados com sorgo moído seco. A dieta para esses animais foi formulada com inclusão de 23% de sorgo na dieta, com o intuito de testar o amido proveniente desse alimento, visto que, mais de 60% do amido total da dieta era oriunda do sorgo. As dietas com sorgo seco moído apresentaram amido fecal em torno de 5,9%, valor que, segundo Owens e Soderlund (2006) indica baixa digestão do amido. Esses autores consideram como baixa digestão do amido, valores de concentrações desse nutriente acima de 5% nas fezes. Nesse caso, os valores de amido nas fezes, obtidas para os tratamentos ensilados enquadraram-se como alta digestão do amido ($<5\%$).

Quanto as variáveis de medidas de peso e energia dos animais, não houve diferença quanto à variação do PV entre os tratamentos. Em relação à energia líquida da dieta (Mcal kg^{-1}), houve diferença ($p<0,01$) entre os tratamentos ensilados vs. moído fino, menor para o SGM. Esse fato é ocasionado, conforme dito anteriormente, pela menor disponibilidade do amido nesse tratamento, possivelmente relacionado ao tipo de processamento (moído). Contrário à isso, é esperado uma maior disponibilidade do amido nos tratamentos moídos e ensilados, o que justifica a maior energia líquida da dieta. Da mesma forma, Morais (2016) obteve resultados semelhantes com os animais, de modo geral, apresentaram variação de PV positiva (sem efeito entre tratamentos) e maiores teores de energia líquida para as dietas com milho ensilado ($p<0,01$).

Tabela 19 - Medidas de peso dos animais, variação do peso vido, teor e consumo de energia líquida na dieta, energia líquida de manutenção e balanço energético das vacas em lactação alimentadas com diferentes fontes de sorgo ensilado ou seco

Item	Tratamentos				EPM	P-valor		
	Controle	BZ	LB	SGM		S x E	C x (L + B)	L x B
PV inicial, kg	616,9	616,3	619,1	613,5	12,85	0,41	0,87	0,62
PV final, kg	616,4	619,2	615,9	615,8	13,53	0,77	0,80	0,56
Var. PV, kg dia ⁻¹	-0,02	0,13	-0,15	0,10	0,20	0,60	0,94	0,30
EL dieta, Mcal kg ⁻¹	1,56	1,54	1,57	1,49	0,01	<0,01	0,75	0,21
Cons. EL, Mcal d ⁻¹	31,85	31,50	31,70	32,00	0,82	0,55	0,65	0,74
ELm, Mcal d ⁻¹	9,88	9,89	9,89	9,86	0,15	0,54	0,84	0,94
Bal. Energia, Mcal d ⁻¹	0,21	0,25	0,42	0,42	0,71	0,80	0,82	0,80

Controle: tratamento sem aditivo; BZ: tratamento com benzoato de sódio; LB: tratamento com *L. buchneri*; SGM: sorgo grão moído fino; C x (L + B): contraste para tratamento controle vs. *L. buchneri* + benzoato de sódio; L x B: contraste *L. buchneri* vs. benzoato de sódio; S x E: contraste para sorgo moído seco vs. ensilados (C + L + B)

Os resultados de produtos de fermentação ruminal estão apresentadas na Tabela 20. Os dados de concentração de AGV encontrados não foram satisfatórios para comparação entre tratamentos, ocasionado por uma possível contaminação por saliva na amostra retirada através da técnica de sonda esofágica, mesmo com todos os cuidados quanto ao descarte das primeiras amostras coletadas. Diante disso, os dados que podem ser considerados para comparação entre tratamentos é a concentração absoluta na amostra (mol 100 mol⁻¹).

A concentração absoluta de acetato, propionato e isovalerato não foram afetadas no contraste sorgo grão ensilado vs. moído seco. Embora tenha tido uma tendência ($p=0,06$) de aumento na produção de acetato para os tratamentos ensilados. As concentrações que apresentaram diferença estatística ($p\leq 0,05$) no contraste ensilado vs. moído seco foram: isobutirato maior para SGM, butirato maior para LB e valerato maior para Controle. No contraste LB vs. BZ, obteve diferença estatística ($p<0,01$) na concentração de acetato menor para o LB e butirato e valerato maior para LB. Não houve diferença estatística ($p=0,58$) para a relação acetato: propionato, a qual foi em média 2,67: 1.

Bade et al. (1972) encontraram diferença ($p<0,05$) para a concentração molar de acetato em dietas com sorgo seco moído e ensilado, onde os valores foram menores para o sorgo ensilado reconstituído (66,1) em comparação ao seco moído (69,1). Quanto aos outros produtos de fermentação ruminal, os autores não encontraram diferença nesses tratamentos para propionato e butirico (médias de 17,7 e 11,3, respectivamente). Já para isovalerato e valerato os valores foram maiores ($p<0,05$) para o reconstituído (2,0 e 1,9) em relação ao seco (1,4 e 1,5),

respectivamente. Quanto a relação acetato: propionato os autores não encontraram diferença (média de 3,95). Já Netemeyer et al. (1976) em experimento semelhante, não encontraram diferenças estatísticas entre os tratamentos para produtos de fermentação ruminal. A média obtida para a relação acetato: propionato foi de 4,2 molar.

Os dados obtidos nesse experimento comprova eficiente participação da digestão dos carboidratos presentes nos ingredientes da dieta (principalmente sorgo), na modificação do perfil de ácidos graxos voláteis produzidos no rúmen, prova disso é o aumento na produção de propionato, reduzindo a relação acetato: propionato, a qual fechou em média 2,67: 1.

Tabela 20 - Produtos de fermentação e concentração ruminal de ácidos graxos voláteis de vacas leiteiras alimentadas com diferentes fontes de sorgo ensilado ou seco

Item	Tratamentos				EPM	P-valor		
	Controle	BZ	LB	SGM		S x E	C x (L+ B)	L x B
Concentração encontrada na amostra								
Acetato	17,51	23,36	12,31	16,23	2,05	0,46	0,88	<0,01
Propionato	6,41	9,20	5,55	5,47	0,90	0,13	0,38	0,01
Isobutirato	1,87	2,04	1,74	1,71	0,14	0,28	0,90	0,14
Butirato	5,63	6,43	5,17	4,70	0,44	0,05	0,75	0,06
Ivalerato	0,67	1,10	0,67	0,57	0,15	0,16	0,26	0,06
Valerato	1,84	2,02	1,63	1,39	0,14	0,01	0,95	0,08
AGV	33,98	44,16	26,76	30,39	3,75	0,25	0,73	<0,01
Concentração absoluta (mol/100 mol)								
Acetato	51,25	52,59	50,34	50,00	0,64	0,06	0,78	0,01
Propionato	18,89	19,63	19,25	18,95	0,45	0,55	0,34	0,57
Isobutirato	5,47	5,22	5,77	6,29	0,31	0,03	0,93	0,23
Butirato	16,84	15,63	17,35	17,29	0,34	0,02	0,28	<0,01
Isovalerato	2,03	2,21	2,15	2,12	0,11	0,94	0,29	0,73
Valerato	5,43	4,76	5,52	4,95	0,14	0,05	0,09	<0,01
Acetato:Propionato	2,71	2,66	2,63	2,64	0,08	0,58	0,67	0,50

AGV: ácidos graxos voláteis; Controle: tratamento sem aditivo; BZ: tratamento com benzoato de sódio; LB: tratamento com *L. buchneri*; SGM: sorgo grão moído fino; C x (L + B): contraste para tratamento controle vs. *L. buchneri* + benzoato de sódio; L x B: contraste *L. buchneri* vs. benzoato de sódio; S x E: contraste para sorgo moído seco vs. ensilados (C + L + B)

4.4 Conclusão

As silagens de grãos de sorgo reconstituídos apresentaram resultados satisfatórios na melhoria do aproveitamento do grão pelo animal. Os tratamentos ensilados propiciaram maiores degradabilidades da MS em comparação ao sorgo

moído. O tratamento com benzoato de sódio foi eficiente no controle de leveduras e na estabilidade aeróbia em silagens de sorgo grão. O tratamento com *L. buchneri* promoveu maior degradação da matriz proteica, embora essas melhorias não tenham influenciado no desempenho dos animais.

Os grãos fermentados de sorgo, incluído em 23% da dieta total não foi capaz de aumentar a produção de leite. No entanto, diminuiu o CMS e aumentou a eficiência alimentar. As dietas que receberam sorgo grão ensilado aumentaram a digestibilidade aparente da maioria dos nutrientes (MS, MO, PB, EE, CNF e amido). Alimentar vacas leiteiras com sorgo grão reconstituído ensilado pode aumentar 9,68% a digestibilidade aparente do amido, o suficiente para tornar a produção leiteira eficiente.

Referências

AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL. Technical Committee on Responses to Nutritives. Nutritive requirements of ruminant animals: protein. (Report, 9). **Nutrition Abstracts and Reviews**, Serie B, v. 62, p. 787-835, 1992.

AGUERRE, M.; CAJARVILLE, C.; REPETTO, J.L Impact of water addition, germination, ensiling and their association on sorghum grain nutritive value. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 205, p. 75–81, 2015.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington, 1990. v. 1, 1117 p.

_____. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International**. 16th ed. Washington, 1997.

_____. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International**. 17th ed. Gaithersburg, 2000.

BADE, D.H.; LANE, G.T.; LEIGHTON, R.E.; DRIEDGER, A. Acetic acid treatment of reconstituted sorghum grain for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 56, p. 124-128, 1972.

BERZAGHI, P.; COZZI, G.; ANDRIGHETTO, I. The use of near infrared analysis for in situ studies. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 80, n. 12, p. 3263-3270, 1997.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, p. 248-259, 1976.

BRADFORD, B.J.; ALLEN, M.S. Milk fat responses to a change in diet fermentability vary by production level in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, p. 3800–3807, 2004.

BUSH, L.J.; NETEMYER, D. T.; ADAMS, G. D. Reconstituted sorghum grain for lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 62, p. 1094-1097, 1979.

CHEN, X.B.; GOMES, M.J. **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of technical details**. Bucksburnd; Aberdeen: Rowett Research Institute, 1992. 21 p.

CHIPLEY, J.R. **Antimicrobials in food**. 3rd ed. New York: Taylor e Francis, 2005. 689 p.

COZZOLINO, D.; ACOSTA, Y.; GARCIA, J. Application of near infrared reflectancy spectroscopy (NIRS) to forage evaluation in Uruguay. In: INTERNATIONAL GRASSLANDS CONGRESS, 19., 2001, São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 370.

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

FERNANDES, J. **Influência de genótipo, maturidade e tempo de armazenamento na qualidade de silagens de grãos de milho com alta umidade**. 2014. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

FERRARETTO, L.F.; CRUMP, P.M.; SHAVER, R.D. 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**, Champaign, v. 96, p. 533–550, 2013.

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**, Champaign, v. 98, p. 7318-7327, 2015.

FIRKINS, J.L.; EASTRIDGE, M.L.; ST-PIERRE, N.R.; NOFTSGER, S.M. Effects of grain variability and processing on starch utilization by lactating dairy cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, E. suppl., p. 218–238, 2001.

FREDIN, S.M.; FERRARETTO, L.F.; AKINS, M.S.; HOFFMAN, P.C.; SHAVER, R.D. Fecal starch as an indicator of total-tract starch digestibility by lactating dairy cows, **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, p. 1862–1871, 2014.

HALL, M.B. **Neutral detergent-soluble carbohydrates nutritional relevance and analysis**. Gainesville: University of Florida, 2000. 42 p. (Bulletin, 339).

HAHN, D.H.; FAUBION, J.M.; RING, S.H.; DOHERTY, C.A.; ROONEY, L.W. Semi automated in vitro analysis of sorghum protein availability via pronase hydrolysis. **Cereal Chemistry**, Amsterdam, v. 59, p. 132, 1982.

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

HOFFMAN, P.C.; SHAVER, R.D. Grain quality: a dairy cow's perspective. In: WISCONSIN CROP MANAGEMENT CONFERENCE, 5., 2011, Madison. **Proceedings...** Madison: University of Wisconsin, 2011. p. 51-73.

HUNTINGTON, G.B.; HARMON, D.L.; RICHARDS, C.J. Sites, rates, and limits of starch digestion and glucose metabolism in growing cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 14-24, 2006.

JUNGES, D.; MORAIS, G.; DANIEL, J.L.P. ; SPOTTO, M.H.F. ; NUSSIO, L.G. Contribution of proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 17., 2015, Piracicaba. **Proceedings...** Rio das Pedras: Gráfica Riopedrense, 2015. p. 566-567.

KLEINSHMIT, D.H.; KUNG, L. JR. A meta analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability de corn and grass and small grain silages. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, p. 4005-4013, 2006.

KLEINSHIMIT, C. **Taxas de inoculação com *Lactobacillus buchneri* no valor nutritivo de silagem de milho como volumoso exclusivo para vacas leiteiras.** 2015. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

KRAUSE, K.M.; COMBS, D.K.; BEAUCHEMIN, K.A. Effects of forage particle size and grain fermentability in midlactation cows. I. Milk production and diet digestibility. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 85, p. 1936–1946, 2002.

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

KRISTENSEN, N.B.; SLOTH, K.H.; HOJBERG, O.; SPLIID, N.H.; JENSEN, C.; THOGERSEN, R. Effects of microbial inoculants on corn silage fermentation, microbial contents, aerobic stability, and milk production under field conditions. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, p. 3764–3774, 2010.

HUHTANEN, P.; KAUSTELL, K.; JAAKKOLA, S. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. **Animal Feed Science and Technology**, Philadelphia, v. 48, p. 211-227, 1994.

KUNG, L. Jr.; WINDLE, M.C.; WALKER, N. The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, p. 1–6, 2014.

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**, Champaign, v. 79, p. 922–928, 1996.

LADELY, S.R.; STOCK, R.A.; GOEDEKEN, F.K.; HUFFMAN, R.P.; Effect of corn hybrid and grain processing method on rate of starch disappearance and performance of finishing cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.73, p. 360-364, 1995.

LEONARDI, C.; ARMENTANO, L.E. Effect of quantity, quality, and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 557-564, 2003.

LITHERLAND, N.B. Adequacy of processing adjustment factors (PAF's) and intake discounts for dairy cows. Invited Presentation. In: OKLAHOMA CATTLE GRAIN PROCESSING SYMPOSIUM, 2006. Oklahoma, **Proceedings...** Oklahoma, 2006. p. 110-116.

MAGALHÃES, P.C.; RODRIGUES, W.A.; DURÃES, F.O.M. **Tanino no grão de sorgo: bases fisiológicas e métodos de determinação**. Sete Lagoas: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, 2000. 13 p. (Circular Técnica, 27).

MAEKAWA, M.; BEAUCHEMIN, K.A.; CHRISTENSEN, D.A. Chewing activity, saliva production and ruminal pH of primiparous and multiparous lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, p. 1176-1182, 2002.

MORAIS, G. **A fermentação de grãos de milho reidratados influenciada pela aplicação de aditivos: aspectos da conservação e do valor nutritivo para vacas leiteiras**. 2016. 111 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2nd ed. Lincoln: Chalcombe Publ., 1991. 340 p.

NAKAMURA, Y.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Analysis of proanthocyanidins in grape seed extracts, health foods and grape seed oils. **Journal of Health Science**, Osaka, v. 29, p. 24-54, 2003.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7thed. Washington: National Academic Press, 2001. 381 p.

NELLIS, S.E.; HOFFMAN, P.C.; SHAVER, R.D. A modified method to quantify prolamin proteins in dry and high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 96, p. 4647-4652, 2013.

NETEMYER, D. T.; BUSH, L.J.; ADAMS, G.D. Feeding value of reconstituted and finely ground sorghum grain for dairy cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 60, p. 748-751, 1976

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**, Champaign, v. 86, p. 174-183, 2003.

OGDEN, R.K.; COBLENTZ, W.K.; COFFEY, K.P.; TURNER, J.E.; SCARBROUGH, D.A.; JENNINGS, J.A.; RICHARDSON, M.D. Ruminant in situ disappearance kinetics of dry matter and fiber in growing steers for common crabgrass forages sampled on seven dates in northern Arkansas. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, p. 1142-1152, 2005.

ORSKOV, E.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 92, n. 2, p. 499-503, 1979.

OWENS, F.N.; SODERLUND, S. Ruminant and postruminal starch digestion by cattle. In: CATTLE GRAIN PROCESSING SYMPOSIUM, nº 1, 2006, Stillwater.

Proceedings... Stillwater, 2006. Disponível em:

<http://beefextension.com/proceedings/cattle_grains06/06-17.pdf>. Acesso: 11 maio 2014.

OWENS, F.N.; HASSEN, A.T. Calculating starch digestibility by lactating dairy cows from starch concentrations in feed and feces. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.89, E suppl. 2, p. 26, 2011.

PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; SPOELSTRA, S.F. Microbiology of ensiling. In: SILAGE: SCIENCE AND TECHNOLOGY, 1., 2003, Madison. **Proceedings...** Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 1-927.

PASSINI, R.; SILVEIRA, A.C.; RODRIGUES, P.H.; CASTRO, A.L.; TITTO, E.; ARRIGONI, M.; COSTA, C. Digestibilidade de dietas a base de grão úmido de milho ou de sorgo ensilados. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.24, p.1147-1154, 2002.

PFLUGFELDER, R.L.; ROONEY, L.W. The role of germination in sorghum reconstitution. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 14, p. 243–254, 1986.

PRYCE, J.D. A modification of Barker-Summerson method for determination of lactic acid. **Analyst**, Cambridge, v. 94, p. 1151-1152, 1969.

ROONEY, L.W.; PFLUGFELDER, R.L. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 63, p. 1607-1623, 1986.

SAN EMETERIO, F.; REIS, R.B; CAMPOS, W.E.; SATTER; L.D. Effect of coarse or fine grinding on utilization of dry or ensiled corn by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, p. 2839–2848, 2000.

SORIANO, F.D.; POLAN, C.E.; MILLER, C.N. Milk production and composition, rumen fermentation parameters and grazing behavior of dairy cows supplemented with different forms and amounts of corn grain. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, p. 1520-1529, 2000.

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

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**, Lancaster, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

WEINBERG, Z.G.; MUCK, R.E. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 19, p. 53-68, 1996.

WINDLE, M.C. **The effects of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of corn silage and high moisture corn**. 2013. 131 p. Thesis (Doctor in Philosophy in Animal Science) – University of Delaware, Newark, 2013.

ZANOTTO, D.L.; BELLAVER, C. **Método de determinação da granulometria de ingredientes para uso em rações de suínos e aves**. Concórdia: EMBRAPA Suínos e Aves, 1996. 5 p.

ZINN, R.A.; BARRERAS, A.; CORONA, L.; OWENS, F.N.; WARE, R.A. Starch digestion by feedlot cattle: Predictions from analysis of feed and fecal starch and nitrogen. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, p. 1727–1730, 2007.