

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DESEMPENHO DE NOVILHAS LEITEIRAS ALIMENTADAS
COM SILAGEM DE MILHO TRATADA COM
BENZOHIDRAZIDA

Autor(a): Kachire Zoz
Orientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel

MARINGÁ
Estado do Paraná
Março – 2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DESEMPENHO DE NOVILHAS LEITEIRAS ALIMENTADAS
COM SILAGEM DE MILHO TRATADA COM
BENZOHIDRAZIDA

Autor(a): Kachire Zoz

Orientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel

Dissertação apresentada, como parte
das exigências para obtenção do
título de MESTRE EM
ZOOTECNIA, no Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia da
Universidade Estadual de Maringá -
Área de Concentração: Produção
Animal

MARINGÁ
Estado do Paraná
Março – 2025

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

Z91d

Zoz, Kachire

Desempenho de novilhas leiteiras alimentadas com silagem de milho tratada com benzohidrazida / Kachire Zoz. -- Maringá, PR, 2025.
59 f. : il., tabs.

Orientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2025.

1. Nutrição de ruminantes. 2. Lignina. 3. Digestibilidade. 4. Fibra. 5. Inibidores enzimáticos. I. Daniel, João Luiz Pratti, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 23.ed. 636.2085



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DESEMPENHO DE NOVILHAS LEITEIRAS ALIMENTADAS
COM SILAGEM DE MILHO TRATADA COM
BENZOHIDRAZIDA

Autora: Kachire Zoz

Orientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 19 de março de 2025.

Prof. Dr. Luiz Gustavo Nussio

Dr. Gustavo Gonçalves de Souza
Salvati

Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel
Orientador

*“Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho
mais certo de vencer é tentar mais uma vez.”*

Thomas Edison

*Dedico este trabalho com todo o amor aos meus pais,
Marcos e Fábíia.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, Fábiana Calgaro Zoz e Marcos Luiz Zoz e minha irmã Kailane Zoz, por serem minha motivação diária de continuar a ser uma pessoa melhor, pelo apoio, confiança, incentivo, inspiração, e por todas as orações. Eu amo vocês!

Aos meu namorado Saulo dos Reis Aguiar, por todo companheirismo, cuidado, amor e carinho, e principalmente por toda paciência nessa etapa de minha vida.

À Universidade Estadual de Maringá e o Programa de Pós-graduação, por ter me dado oportunidade de realizar este trabalho e por viabilizar a realização deste projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Professor Dr. João Luiz Pratti Daniel, pelos ensinamentos, oportunidades, conselhos, seu apoio e dedicação durante esse período, sempre acreditando no meu potencial e sendo um guia para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Silagem e Feno (GESF), em especial a Dr^a Janaina Macieiro Bragatto, por sua paciência e dedicação em dividir todo o seu conhecimento para que eu tivesse boa condução no experimento e nas análises laboratoriais. Obrigada por sua amizade e companheirismo, deixou essa etapa mais leve.

Ao professor Dr. Wanderley Dantas dos Santos e ao Dr. Wagner Mansano Cavalini e ao departamento de Bioquímica da UEM (DBQ) pela parceria no desenvolvimento do projeto.

Aos funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), Airton, Célio, Cleomar, Valdecir (Du) e Wilmar (Alemão), por terem sido essencial na realização deste trabalho a nível de campo.

Aos funcionários do Laboratório de Análise de Alimentos e Nutrição Animal (LANA), Ulisses, Osvaldo e Augusto, pela ajuda e apoio na condução das análises químicas.

E a todos os demais que de certa maneira fizeram parte desse momento.

Obrigada!

BIOGRAFIA

KACHIRE ZOZ, filha de Fábila Calgato Zoz e Marcos Luiz Zoz, nasceu na cidade de Palotina, Paraná, no dia 27 de fevereiro de 1999. Em março de 2017, iniciou no curso de graduação em Zootecnia, pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE. Em setembro de 2022, obteve o título de “Zootecnista” pela mesma instituição. Em março de 2023 iniciou no curso de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, em nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, realizando estudos sobre Nutrição de Ruminantes. Em março de 2025, submeteu-se à banca examinadora para defesa da dissertação.

ÍNDICE

Página

RESUMO	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO.....	13
1.0 REVISÃO DE LITERATURA	14
1.1 Silagem de milho como fonte de fibra em dietas para ruminantes.....	14
<i>A importância da digestibilidade da fibra para o desempenho animal</i>	16
1.2 Parede celular vegetal.....	17
<i>Celulose</i>	18
<i>Hemicelulose</i>	19
<i>Proteínas</i>	20
1.3 Lignina.....	20
1.4 Degradação ruminal da fibra	23
1.5 Estratégias para melhorar a digestibilidade da fibra da silagem de milho	26
1.6 Uso de inibidores de lignina como estratégia para melhorar a digestão da fibra da silagem de milho.....	28
REFERÊNCIAS	30
II. Desempenho de novilhas leiteiras alimentadas com silagem de milho tratada com benzohidrazida.....	39
RESUMO	40
INTRODUÇÃO.....	41
MATERIAL E MÉTODOS.....	42
Cultura do milho, ensilagem e tratamentos	42

Animais e dieta	43
Coleta de dados e amostragem	43
Análises laboratoriais	45
Análise estatística	47
RESULTADOS	47
DISCUSSÃO	48
CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS	51

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Composição nutricional das dietas experimentais. 55

Tabela 2. Características das silagens de milho experimentais. 56

Tabela 3. Consumo e comportamento ingestivo em novilhas leiteiras alimentadas com silagem de milho tratada com benzohidrazida. 57

Tabela 4. Desempenho de novilhas leiteiras alimentadas com silagem de milho tratada com benzohidrazida. 58

Tabela 5. Digestibilidade aparente de nutrientes no trato total, energia da dieta e da silagem e parâmetros sanguíneos de novilhas leiteiras alimentadas com silagem de milho tratada com benzohidrazida. 59

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho de novilhas leiteiras alimentadas com silagem de planta inteira de milho tratada com benzohidrazida (BZD). Vinte e quatro novilhas holandesas (333 kg de peso corporal médio) foram alocadas em 12 blocos ao acaso com base no peso corporal e alojadas em baias individuais. Os animais permaneceram confinados durante período de 67 d, sendo 7 d de adaptação às instalações e 60 d para comparação das dietas experimentais. O consumo de MS foi medido diariamente, enquanto a altura de cernelha e de garupa foram medidas no início e no final do período experimental. A digestibilidade de nutrientes no trato total foi determinada nos dias 18 a 22 e 39 a 43. O teor de lignina brometo de acetila foi similar entre tratamentos, mas a silagem de milho tratada com BZD apresentou menores valores de lignina em detergente ácido. Os consumos de MS e FDN foram menores nos animais alimentados com a dieta contendo silagem tratada com o BZD, mas o ganho de peso diário foi similar entre tratamentos. A utilização de BZD induziu aumento na digestibilidade aparente no trato total das frações FDN (+10,3%) e carboidratos não fibrosos (+2,2%), resultando em aumento na digestibilidade da MS (+6,0%) da dieta. Assim, a eficiência alimentar das novilhas recebendo silagem de milho tratada com BZD foi 11% superior ao tratamento controle. Em conclusão, a aplicação de BZD à cultura do milho aumentou a digestibilidade *in vivo* de fibra e carboidratos não fibrosos, o que resultou em maior valor alimentício da silagem de milho para novilhas leiteiras em crescimento.

Palavras-chave: digestibilidade, consumo de matéria seca, inibidor enzimático, lignina

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the performance of dairy heifers that were fed with whole corn plant silage treated with benzohydrazide (BZD). Twenty-four Holstein heifers (333 kg average BW) were randomly allocated in twelve blocks based on initial BW and housed in individual pens. The feeding period lasted 67 d, with 7 d for adaptation and 60 d for comparison of experimental diets. The DM intake was measured daily, while withers and rump height were measured at the beginning and end of the experimental period. Total-tract apparent digestibility was determined on d 18 to 22 and d 39 to 43. The DM and NDF intake were reduced in animals fed with the diet containing BZD-treated corn silage, but the average daily gain was similar between treatments. The BZD application enhanced total-tract digestibility of NDF (+10.3%) and non-fiber carbohydrates (+2.2%), resulting in greater digestibility of diet DM (+6.0%). Then, BZD-treated corn silage increased the feed efficiency of heifers by 11% compared with the control. In conclusion, BZD application to corn crop increased in vivo digestibility of fiber and non-fiber carbohydrates, which resulted in higher feeding value of corn silage for growing dairy heifers.

Keywords: digestibility, dry matter intake, enzyme inhibitor, lignin

INTRODUÇÃO

O milho é, cada vez mais, recomendado entre as várias plantas aptas à produção de silagem (sorgo, girassol, aveia, azevém, milheto), sendo a cultura de maior expressão no Brasil (Oliveira *et al.*, 2007). Assim, a silagem de milho continua destacando-se por apresentar uma produção elevada de massa por unidade de área, alta produtividade de MS digestível, bom equilíbrio entre amido e fibra, facilidade de fermentação no silo e boa aceitação por parte dos bovinos (Restle *et al.*, 2006). Além de ser uma cultura de fácil mecanização e que permite a aplicação de diversas tecnologias.

Os carboidratos fibrosos, como a celulose, hemicelulose (presentes na parede das células vegetais), apesar de serem caracterizados pela difícil digestão, são fontes de energia para ruminantes (Oliveira *et al.*, 2016). A degradação e o metabolismo desses carboidratos fibrosos são realizados pelas atividades síncronas dos complexos enzimáticos produzidos pela microbiota ruminal (Clauss e Hummel, 2017). Por outro lado, a insolubilidade, a complexidade estrutural e o acesso dos microrganismos às fibras vegetais, muitas vezes, limitam o processo fermentativo no rúmen (Ferreira *et al.*, 2017).

A lignina é reconhecida como o principal impedimento à digestão de fibra (Van Soest, 1994). A lignina é um composto fenólico que atua como barreira física contra o ataque dos microrganismos sobre a parede celular vegetal. Sua ligação, principalmente com os polissacarídeos da parede celular (Halpin, 2019), os deixa indisponíveis para degradação ruminal (Raffrenato *et al.* 2017). A lignina é formada pela ligação covalente de hidroxicinamil álcoois (monolignóis): p-cumaril, coniferil e sinapil, correspondendo às unidades monoméricas H, G e S, respectivamente, formados na via dos fenilpropenoides. Ela envolve as microfibrilas celulósicas, conferindo proteção à degradação, e pode formar ligações covalentes com a hemicelulose (Chiang, 2006).

Algumas estratégias podem ser adotadas para melhorar a digestibilidade da fibra da silagem de milho. Uma delas é a escolha de híbridos de milho com maior digestibilidade da fibra (Paziani *et al.*, 2009). O uso de tratamento físico, que envolve a redução do tamanho das partículas, expõe novas superfícies para a colonização microbiana e aumenta a área disponível para a ação enzimática (Neumann *et al.*, 2007). O tratamento químico também pode ser utilizado, pois contribui para a solubilização de certos componentes da parede celular ou para a quebra de complexos entre lignina e carboidratos (Rosa e Fadel, 2001). E a utilização de enzimas exógenas como as enzimas fibrolíticas, que podem melhorar a digestibilidade, pois ajudam a quebrar as fibras em menores partículas, facilitando a ação dos microrganismos ruminais e a absorção de nutrientes (Hristov e McAllister, 2002).

Uma das estratégias com potencial para reduzir o impacto negativo da lignina na digestibilidade da fibra de forragens é a aplicação de inibidores enzimáticos da via dos fenilpropanoides, como a benzohidrazida (BZD). A BZD pode regular a biossíntese dos monômeros de lignina e modificar a estrutura deste polímero presente na parede celular das plantas de milho para ensilagem, facilitando o ataque de hidrolases microbianas no rúmen. Estudos realizados com a BZD aplicada por aspersão foliar em plantas jovens de milho cultivadas em laboratório, demonstraram resultados positivos para o aumento da sacarificação da biomassa (Martarello *et al.*, 2023).

Diante disso, o objetivo deste estudo é verificar se as aplicações de BZD nas plantas de milho jovem alteram a deposição da lignina, já que este composto atua na regulação da biossíntese dos monômeros de lignina, alterando a estrutura desse polímero. Consequentemente aumentando a digestibilidade da fibra da silagem de milho e melhorando o desempenho dos animais.

1.0 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Silagem de milho como fonte de fibra em dietas para ruminantes

O milho é a forrageira tradicionalmente utilizada para a produção de silagem, por apresentar características essenciais à ensilagem, produz grandes quantidades de MS por unidade de área, possui tradição de cultivo e grande variedade de genótipos encontra-se disponível. Além disso, a disponibilidade de tecnologias desde o plantio até a colheita reduz os custos com mão de obra e aumenta a eficiência na produção de alimento. (Allen

et al., 2003; Klopfenstein *et al.*, 2013). Possui perto de 32 – 35 % de MS no momento da colheita, facilitando a compactação sem perdas significativas por efluentes, tem elevada concentração de carboidratos solúveis que são utilizados pelos microrganismos responsáveis por fermentar a massa ensilada e baixo poder tampão, que permite queda rápida do pH (Johnson *et al.*, 2002).

A silagem de milho é ótima opção de alimento conservado, rico em nutrientes digestíveis, ideal para dietas de animais de alta produtividade. Sua principal vantagem é fornecer, ao mesmo tempo, quantidades elevadas de energia, originadas principalmente do amido presente nos grãos, e uma fonte de fibra de qualidade, que estimula a mastigação, favorece o funcionamento do rúmen e auxilia na redução do risco de doenças metabólicas relacionadas ao consumo excessivo de alimentos concentrados (Ferraretto *et al.*, 2018; Wilkinson e Rinne, 2017).

A silagem de milho destaca-se ainda pela capacidade de possuir altos teores de amido, sendo uma das fontes de forragem mais densas em energia utilizada nas dietas de ruminantes (Bernardes e Do Rêgo, 2014; Wilkinson e Rinne, 2017). Além do amido, o conteúdo de FDN presente na silagem de milho representa uma fonte de fibra de alta qualidade que auxilia na manutenção da saúde ruminal e influencia na ingestão de MS pelos animais (Mertens, 1987; Ferraretto *et al.*, 2018).

A fibra, no contexto nutricional está diretamente relacionada ao método analítico utilizado para medi-la. Quimicamente, a fibra não é uma substância única, mas sim um agregado de polímeros de carboidratos (celulose, hemicelulose) e a lignina. Assim, a composição química varia, dependendo da fonte alimentar e da metodologia para a determinação laboratorial (Mertens, 1997).

A fibra é essencial para os ruminantes e ainda que seja fornecida em pequenas quantidades na dieta animal, esse teor tem importância no que se refere à microbiota ruminal e os processos fermentativos. Segundo Van Soest (1994) a quantidade mínima de fibra é necessária para ter concentrações adequadas de microrganismos no rúmen a fim de promover o processo da fermentação, produção de saliva e movimentos ruminais.

O aumento na quantidade de fibra na dieta de ruminantes estimula atividade de mastigação reduzindo a produção de substâncias ácidas, porém, quando o teor de fibra é deficiente, a mastigação é reduzida, ocasionando menor secreção salivar tampão, o que reflete em menor pH, alteração da fermentação ruminal, baixa produção de ácidos graxos voláteis, além de alterar o metabolismo dos animais (Mertens, 1997).

Diversos fatores impactam a qualidade da silagem de milho, incluindo o momento da colheita (Hunt *et al.*, 1992), as condições climáticas e o manejo (Almeida Filho *et al.*, 1999) durante o processo de ensilagem. A escolha do híbrido de milho é um aspecto crítico (Nussio *et al.*, 2001), pois híbridos com menor teor de lignina e maior digestibilidade da fibra têm sido associados a melhores resultados produtivos. Além disso, práticas agronômicas, como o manejo adequado da adubação (Basi *et al.*, 2011) e o controle de pragas, afetam diretamente a composição química e a qualidade final da silagem. Durante o armazenamento, a presença de oxigênio e a temperatura podem alterar a fermentação, resultando em perdas de nutrientes e formação de compostos indesejáveis (Ashbell *et al.*, 2002).

Outro fator determinante para a qualidade da silagem é o ponto ideal de colheita, geralmente quando o teor de matéria seca está entre 30% e 40%. Nesse estágio, há equilíbrio entre a concentração de nutrientes e a capacidade de fermentação da planta, garantindo uma silagem de alta qualidade (Nussio *et al.*, 2001).

A importância da digestibilidade da fibra para o desempenho animal

A digestibilidade da fibra (FDN) é fator crucial para a nutrição de ruminantes, pois está relacionada à capacidade do animal em aproveitar o alimento e influencia diretamente o consumo de matéria seca. Logo, a digestibilidade da FDN pode influenciar o desempenho, a eficiência alimentar e a saúde do animal (Allen e Oba, 1996).

Segundo Salazar (2009), a digestibilidade do alimento representa a capacidade de permitir que o animal utilize seus nutrientes em maior ou menor escala. Essa capacidade é expressa pelo coeficiente de digestibilidade do nutriente, sendo uma característica do alimento e não do animal. Portanto, isso depende de características físicas e químicas do alimento. As principais características químicas relacionadas à digestibilidade da fibra são a composição e a relação entre os carboidratos fibrosos e concentração de lignina. As características físicas, como a capacidade de troca de cátions, hidratação das partículas, densidade e poder tampão estão relacionadas ao tempo de colonização das partículas pelos microrganismos do TGI (*lag time*) e a taxa de digestão (Nussio, 2001).

A digestibilidade de fibra é importante fator limitante do desempenho animal, já que o espaço ocupado pelos materiais volumosos e o tempo de permanência destes materiais no rúmen são aumentados com a maturação da planta, podendo alterar a

dinâmica da fermentação animal, como também a velocidade de passagem do alimento por este compartimento (Ribeiro *et al.*, 2001; Ataíde Júnior *et al.*, 2001).

Há relação entre digestibilidade da silagem e o desempenho animal, indicando que híbridos de milho mais digestíveis resultam em melhora na eficiência da alimentação e, consequentemente, em melhor desempenho dos animais (Barrierre *et al.*, 1995; Hunt *et al.*, 1992). Ou seja, o desempenho animal está relacionado diretamente com a digestibilidade de fibra, aumentando ou diminuindo de forma conjunta.

Oba e Allen (1999) verificaram que a digestibilidade da FDN *in vitro* ou *in situ* é o melhor indicador de consumo comparado a digestibilidade da FDN *in vivo*, devido às forragens com FDN altamente digestível *in vitro* ou *in situ* terem menor tempo de retenção, permitindo maior CMS. De acordo com esses mesmos autores, após realizarem análises da digestibilidade *in vitro* e *in situ* de forragens, descobriram que cada aumento de uma unidade percentual na digestibilidade da FDN pode aumentar o consumo de matéria seca em 0,17 kg/d e a produção de leite corrigida para gordura em 0,25 kg/dia.

1.2 Parede celular vegetal

A parede celular vegetal é uma estrutura complexa que envolve uma membrana plasmática e desempenha funções essenciais como proteção, suporte mecânico e regulação de trocas entre células. É composta por uma mistura de polissacarídeos, proteínas, compostos fenólicos e sais minerais (Taiz e Zieger, 2002).

Os polissacarídeos representam cerca de 90% do peso seco da parede e consistem em celulose, que compõe de 20 a 40% da parede celular, hemiceluloses (15-25%) e pectinas (~30%). Essa matriz é altamente ordenada e dinâmica podendo tornar-se mais rígida ou mais frouxa conforme as necessidades da planta (Buckeridge, 2010). Além dos polissacarídeos, a parede celular é também impregnada pela lignina, um polímero aromático que fornece proteção e rigidez a planta.

A parede celular vegetal é classificada em: parede celular primária e secundária. A parede primária é depositada durante o crescimento celular, e deve ser ao mesmo tempo mecanicamente estável e suficientemente flexível para permitir a expansão das células, evitando a ruptura. As paredes celulares primárias consistem principalmente de polissacarídeos como celulose, hemiceluloses e pectinas. Já a parede celular secundária é depositada, após cessar o crescimento celular e confere estabilidade mecânica a planta. A parede secundária apresenta compostos de celulose e hemicelulose, e são muitas vezes

impregnados de lignina. Além dos polissacarídeos, a parede das células vegetais contém centenas de diferentes proteínas (Taiz e Zieger, 2002).

A composição da parede celular varia consideravelmente entre diferentes partes da planta de milho, influenciando a qualidade da silagem e a digestibilidade da fibra. O colmo do milho apresenta a maior concentração de lignina, reduzindo a digestibilidade em comparação às folhas e aos grãos (Cabral *et al.*, 2002). As folhas, por outro lado, possuem menor proporção de lignina e maior concentração de hemicelulose, o que as torna mais facilmente degradáveis.

A estrutura da parede celular exerce influência direta na digestibilidade da fibra em ruminantes, pois determina a acessibilidade das enzimas microbianas aos carboidratos estruturais. A celulose, quando isolada, é altamente digestível, entretanto, a associação com a hemicelulose e a lignina na parede celular reduz significativamente a degradação no rúmen. Essa interação dificulta o rompimento das microfibrilas de celulose e, conseqüentemente, a liberação de açúcares fermentáveis pelos microrganismos ruminais (Silva, 2023).

Celulose

A celulose é o principal componente da parede vegetal, um homopolissacarídeo não ramificado constituído unicamente por moléculas de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -1,4. Duas unidades de glicose adjacentes formam uma ligação glicosídica através da eliminação de uma molécula de água. Devido à configuração espacial alternada das ligações glicosídicas, a unidade de repetição da celulose é a celobiose, um dissacarídeo (Taiz e Zieger, 2002).

A estrutura da celulose apresenta regiões cristalinas altamente ordenadas, estabilizadas por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e regiões menos ordenadas ou amorfas e as cadeias apresentam uma orientação randomizada. As pontes de hidrogênio intra e intermoleculares formadas entre as longas cadeias de celulose originam as microfibrilas de celulose, que formam um conjunto de agregados insolúveis em água (Fengel *et al.*, 1989).

As microfibrilas podem variar em comprimento, largura e grau de ordenação, nas plantas terrestres apresentam entre 5 e 12 nm de largura. As microfibrilas podem ser longas o suficiente para apresentar regiões cristalinas e amorfas (Taiz e Zieger, 2002). As microfibrilas de celulose, sendo que o grau de cristalinidade destas fibrilas ou a presença

de outros polímeros associados à matriz celulósica são de especial importância na avaliação de forragens, pois esta interação pode influenciar a suscetibilidade da molécula de celulose à hidrólise enzimática microbiana (Van Soest, 1994).

Para ocorrer a síntese de celulose, são utilizados resíduos de glicose de um doador de açúcar de nucleotídeo, chamada de uridina difosfato glicose (UDP-glicose). A fotossíntese fixa carbonos que por sua vez sofrem diversas transformações no citosol até chegar à UDP-glicose. A glicose usada para síntese de celulose pode ser proveniente da sacarose (glicose + frutose), pela ação da enzima sacarose sintase, que faz a transferência da glicose (via UDP-glicose), proveniente da sacarose, para a cadeia de celulose em desenvolvimento (Verbancic *et al.*, 2018).

A sacarose intracelular pode ser catabolizada pela sacarose sintase, produz UDP-glicose, a qual é substrato para a síntese de celulose e a grande maioria dos precursores de açúcares de nucleotídeos necessários para a síntese de hemicelulose e pectina. Entretanto, hemiceluloses e pectina necessitam de diversos outros açúcares para serem sintetizadas (Verbancic *et al.*, 2018).

As enzimas celulose sintase, nos complexos proteicos da membrana plasmática, desempenham papel importante na síntese das microfibrilas de celulose. As microfibrilas possuem papel de rigidez na parede e proporcionam direção de crescimento (Braybrook e Jonsson, 2016).

Hemicelulose

A hemicelulose, ao contrário da celulose, possui maior solubilidade e pode ser mais facilmente degradada por enzimas microbianas no rúmen, são heteropolissacarídeos formados por vários resíduos de açúcares pentoses, as xiloses e arabinoses, e as hexoses como a glicose, manose e galactose, ácidos urônicos e grupos acetila. Esses açúcares estão ligados entre si, principalmente por ligações glicosídicas β -1,4, formando uma estrutura principal composta por um tipo específico de resíduo, a partir da qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros compostos (Farinas, 2011).

As hemiceluloses são classificadas de acordo com o açúcar predominante na cadeia principal e na ramificação lateral. As principais hemiceluloses encontradas em plantas são os xiloglucanos (XyG), os glucuronoarabinoxilanos (GAX) e os mananos (MN). Em todos os casos, há uma cadeia principal de monossacarídeos de glicose, xilose e manose, respectivamente, que pode ser ramificada com diferentes monossacarídeos. Os

XyG são os mais abundantes, encontrados na maioria das eudicotiledôneas. Os GAXs ocorrem em maior proporção em paredes celulares de gramíneas (família Poaceae) e os MN são de ampla ocorrência, mas geralmente aparecem em baixa proporção (Buckeridge, 2010).

Em células maduras, as hemiceluloses encontram-se mais associadas à lignina por ligações covalentes do que os outros polissacarídeos, tornando-se indisponíveis à solubilização (Van Soest, 1994).

Proteínas

Existem três grandes grupos de proteínas que fazem parte da parede celular, como as extensinas com função estrutural, as proteínas ricas em glicina (GRPs) associadas à lignificação e as proteínas ricas em prolina (PRPs) que atuam na formação dos nódulos radiculares em leguminosas. Há também outros grupos menos expressivos, mas que exercem funções essenciais ao desenvolvimento celular (Neumann, 2002).

Parte destas proteínas são solubilizadas na determinação da fibra, outra porção, permanece como constituinte da mesma, sendo corrigida com a determinação do nitrogênio na parede celular (NIDA ou CIDA), no entanto, alguns autores mencionam que esta proteína não deve ser corrigida, pois encontra-se indisponível à digestão e absorção pelo trato gastrointestinal do animal (Giger-Reverdin, 1995).

1.3 Lignina

A lignina é um polímero orgânico de grande importância na estrutura vegetal, desempenhando funções fundamentais na planta e exercendo influência significativa na digestibilidade da fibra em ruminantes. Sua composição complexa e a interação com outros componentes da parede celular, como celulose e hemicelulose, fazem da lignina um elemento essencial para a análise da qualidade da silagem de milho (De Menezes *et al.*, 2021).

Outra definição de lignina foi proposta por Lapierre (1993) utilizada nos estudos de nutrição animal, classificando-a como core ou não core, segundo a susceptibilidade à hidrólise e o material residual. A lignina não core é liberada da parede celular por hidrólise e formada por compostos fenólicos de baixo peso molecular que estão unidos aos polímeros da parede celular por ligações covalentes. Já a lignina core, é resistente à

hidrólise e formada por compostos fenilpropanoides condensados que realizam ligações éster-inter-resistentes. Esses compostos são divididos em três unidades básicas, p-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S). Essas unidades básicas constituem os três principais monômeros da lignina core e são chamados de monolignóis. Percebe-se então que a lignina não core é mais suscetível às enzimas, então apresenta algum potencial de degradação (Saliba *et al.*, 2001). Por isso, a definição de lignina core ou não core torna-se indicada para comparar o valor nutricional de forragens por considerar as características moleculares de estrutura, a composição química e os tipos de ligações existentes. Logo, os esforços para melhoria da digestibilidade de alimentos lignificados se concentram em reduzir a quantidade de lignina core e/ou modificar a sua composição de modo a deixá-la mais susceptível à hidrólise.

A formação inicia com o espessamento da parede celular secundária, dessa forma, o conteúdo aumenta, conforme acompanha o desenvolvimento do vegetal. É considerada uma macromolécula amorfa, resultado da condensação de unidades de fenilpropanoides, álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool p-cumarílico, derivadas do aminoácido fenilalanina, e representa um dos maiores grupos de constituintes orgânicos da parede celular nas plantas (Gallego-Giraldo *et al.*, 2016). Esses álcoois que dão origem à lignina diferem entre si pelo grau de metoxilação. Quando são incorporados ao polímero de lignina, produzem, respectivamente, as unidades p-hidroxifenil que possui radical metoxi (OCH₃), guaiacil, que possui 1 radical metoxi e siringil, que possui 2 radicais metoxi (Boerjan *et al.*, 2003).

A principal função da lignina na planta é conferir rigidez estrutural, proporcionando suporte mecânico aos tecidos vegetais. Ela está presente em maior concentração nas paredes secundárias das células, especialmente em tecidos como xilema e esclerênquima, que necessitam de maior resistência para suportar o transporte de água e nutrientes. Essa rigidez estrutural é essencial para que a planta mantenha a postura ereta e resista às condições ambientais adversas, como ventos fortes e chuvas intensas e ocorre a acentuação na ação, à medida que o vegetal amadurece (Fukushima *et al.*, 2000).

O processo de lignificação inicia na lamela média e estende-se para a parede primária, sequencialmente, atinge a parede secundária com maior intensidade e ocorre pela combinação dos monolignóis (álcoois p-coumaril, coniferil e sinapil). Neste processo há uma mediação realizada por oxidases da parede celular, que transformam os monolignóis em radicais livres (Jung e Deetz, 1993).

Este processo é o principal limitador de degradação dos polissacarídeos por meio de três principais mecanismos, o efeito tóxico dos constituintes da lignina, como o ácido coumárico, p-cumarico pelos microrganismos do rúmen. A barreira física causada pela ligação lignina-hemicelulose-celulose que dificulta o acesso das enzimas fibrolíticas ao sítio de ação do carboidrato e a limitação da ação de enzimas hidrofílicas causada pela hidrofobicidade dos polímeros da lignina (Van Soest, 1994).

Além disso, a lignina atua como barreira física e química contra pragas e patógenos, dificultando a penetração e a ação de microrganismos que poderiam comprometer a integridade dos tecidos vegetais. A impermeabilidade também ajuda a reduzir a perda de água, contribuindo para a tolerância da planta a condições de estresse hídrico. Dessa forma, a lignina desempenha papel crucial na sobrevivência e no desenvolvimento das plantas, especialmente em ambientes com alta variabilidade climática (Saliba *et al.*, 2001).

A biossíntese da lignina na célula vegetal avança em sentido topoquímico radial e pode ser dividida em duas fases. A primeira é chamada de fase enzimática ou oxidação horizontal, caracterizada pela ação de diversas enzimas para a formação dos precursores intermediários e finais da lignina no citosol. A segunda fase é chamada de semienzimática ou oxidação vertical, caracterizada pela menor ação de enzimas, pela oxidação desidrogenativa dos monômeros e sua polimerização na parede celular (De Menezes *et al.*, 2021).

A biossíntese é um processo complexo que envolve diversas enzimas e vias metabólicas interconectadas. Ela inicia na via dos ácidos fenólicos, que converte o fenilalanina em compostos precursores, como o ácido p-cumárico, o ácido ferúlico e o ácido sinápico. Esses compostos são posteriormente polimerizados para formar os monômeros de lignina: p-hidroxifenil, guaiacil e siringil. Entre as principais enzimas envolvidas nesse processo, destacam-se a fenilalanina amônia-liase (PAL), que catalisa a primeira etapa da biossíntese, e a peroxidase e lacase, responsáveis pela polimerização dos monômeros de lignina. Essas enzimas atuam de maneira coordenada, regulando a quantidade e a composição da lignina depositada na parede celular. A variação na proporção dos monômeros de lignina influencia diretamente a estrutura e a funcionalidade do polímero, afetando a interação com outros componentes da parede celular (Rippert *et al.*, 2009).

A regulação da biossíntese da lignina é um ponto chave para o melhoramento da qualidade da fibra. Estudos têm demonstrado que modificações genéticas em genes

relacionados às enzimas da biossíntese podem reduzir o teor de lignina e aumentar a digestibilidade da fibra sem comprometer a resistência estrutural da planta (Getachew *et al.*, 2018). Essas estratégias são promissoras para melhorar a eficiência alimentar e reduzir os custos de produção em sistemas que utilizam silagem de milho.

O impacto mais relevante da lignina na nutrição de ruminantes está relacionado à capacidade de formar ligações cruzadas com celulose e hemicelulose, componentes estruturais da parede celular (Vanholme *et al.*, 2019). Essas ligações dificultam o acesso das enzimas microbianas aos carboidratos fermentáveis, reduzindo a taxa de digestão e o aproveitamento energético da fibra. Como resultado, a presença de lignina na parede celular limita a quantidade de energia disponível para os ruminantes, comprometendo o desempenho produtivo e a eficiência alimentar.

A extensão do impacto da lignina na digestibilidade depende da concentração e composição química. Plantas com alto teor de monômeros guaiacil apresentam menor digestibilidade, pois essas unidades formam ligações mais estáveis com os carboidratos estruturais. Por outro lado, plantas com maior proporção de monômeros siringil tendem a ter lignina mais facilmente degradável, e pode melhorar a digestibilidade da fibra (Taiz *et al.*, 2017).

Além disso, a maturidade da planta no momento da colheita influencia significativamente o teor de lignina. Plantas colhidas em estágios mais avançados de desenvolvimento apresentam maior deposição de lignina, reduzindo a qualidade da silagem. Portanto, o manejo adequado do ponto de colheita é uma prática essencial para maximizar a digestibilidade da fibra e garantir uma alimentação eficiente para os ruminantes (Pinto, 2022).

A determinação da lignina é feita a partir da análise de FDA (Silva e Queiroz, 2002). Existem diferentes métodos na literatura empregados na avaliação de lignina, entre eles, método da hidrólise ácida, adotada como padrão, lignina com permanganato de potássio, lignina Klason e lignina brometo de acetila (Hindrichsen *et al.*, 2006). De acordo Detmann *et al.* (2012), há divergências significativas nos resultados obtidos em laboratórios para todos os métodos aplicados.

1.4 Degradação ruminal da fibra

A fibra desempenha papel essencial na alimentação de ruminantes, fornecendo energia e promovendo a saúde ruminal (Van Soest, 1994). A degradação no rúmen é um

processo microbiológico complexo, que depende de fatores como a composição química dos alimentos, a interação entre microrganismos, o ambiente ruminal e o estágio de maturidade (Hoover e Miller, 1996). A eficiência desse processo é importante para o desempenho animal, especialmente em dietas ricas em silagem de milho, que combinam alta densidade energética com uma fração de fibra estrutural.

No rúmen, a fibra é fermentada por microrganismos celulolíticos, que degradam carboidratos estruturais, como celulose e hemicelulose, em ácidos graxos voláteis (AGVs), principalmente acetato, propionato e butirato. Esses AGVs são absorvidos pelo epitélio ruminal e utilizados pelos ruminantes como fonte de energia para manutenção, crescimento e produção. Além disso, a fibra promove a mastigação e a salivação, fundamentais para a regulação do pH ruminal (Van Soest, 1994).

Os principais microrganismos envolvidos nesse processo são as bactérias, protozoários e os fungos (Delfosse-Debusscher *et al.* 1979; Cheng, 2000). As bactérias são responsáveis por quebrar a celulose e hemicelulose, principais componentes das fibras vegetais (Hungate, 1966). As fibrobactérias como *fibrobacter succinogenes* são especializadas na degradação da celulose, produzindo enzimas que rompem as ligações β -1,4-glicosídicas entre os monômeros de glicose, liberando glicose que pode ser fermentada (Montgomery *et al.* 1988).

Embora seja capaz de hidrolisar celulose e uma variedade de hemiceluloses, apenas os produtos hidrolíticos da celulose sustentam o crescimento, levando à especulação de que a hidrólise da hemicelulose por esta espécie serve apenas como um meio de aumentar o acesso à celulose dentro da matriz da parede celular da planta (Suen *et al.*, 2011). A adesão à celulose é mediada por proteínas de limo (“fibro-limo”) e pilinas que permitem contato incomumente próximo com a celulose (Burnet *et al.*, 2015).

Os ruminococos, como *ruminococcus albus* e *ruminococcus flavefaciens* são hidrolisadores ativos de celulose e várias hemiceluloses. Ao contrário de *F. succinogenes*, esses ruminococos podem fermentar vários tipos de hemicelulose, incluindo xilanos, glucomanano e liquena, mas não arabinogalactanos ou glucanos de armazenamento, como β -1,3-glucano, laminarina ou amidos (Christopherson *et al.*, 2014). E as bactérias *bacteroides*, que são especializadas na quebra da hemicelulose, outro componente importante das fibras.

O rúmen contém uma gama diversificada de protistas anaeróbicos, os protozoários. Os membros do grupo têm funções bem estabelecidas na predação de bactérias, ou no engolfo, sequestro e fermentação do amido. Eles também têm papel na

degradação de fibras, embora o estudo dessa capacidade seja complicado pela dificuldade de manter protistas ruminais em cultura (Williams e Coleman, 1992; Dehority, 2008), e pela possível presença de bactérias endossimbióticas, algumas das quais podem potencialmente degradar a celulose (Morais e Mizrahi, 2019). Além disso, produzem ácidos graxos voláteis que influenciam o pH ruminal e a atividade microbiana.

Os fungos são menos abundantes que as bactérias, mas ainda assim importantes, especialmente nas primeiras etapas da degradação da fibra. Os fungos ruminais como *neocallimastigomycota* quebram a celulose e a hemicelulose de forma mais eficaz do que as bactérias, utilizando enzimas especializadas, como as celulasas. A essencialidade da adesão à fibra é demonstrada pelo fato de que a metilcelulose inibe simultaneamente a adesão e a degradação da celulose (Cheng *et al.*, 1991). Além disso, o tratamento com metilcelulose de culturas que crescem em celulose separa as células das fibras e interrompe a degradação da celulose.

Os micélios de *neocallimastigomycota* produzem uma série de enzimas fibrolíticas, incluindo celulasas que são organizadas em organelas semelhantes a celulosomos na superfície celular. Metabolicamente, os fungos ruminais assemelham-se a alguns dos protistas ciliados ruminais, pois são estritamente anaeróbicos e têm metabolismo energético fermentativo, e são difíceis de manterem cultura (Vinzelj *et al.*, 2022). Os balanços de fermentação revelam uma série de produtos, incluindo acetato, formato, etanol, lactato (isômeros D e L), succinato, H₂ e CO₂ (Borneman *et al.*, 1989).

A fermentação da fibra no rúmen é um processo altamente dependente do ambiente ruminal. Fatores como pH, temperatura e tempo de retenção da digesta influenciam a atividade microbiana e, conseqüentemente, a taxa de degradação da fibra (Lima *et al.* 2008). Um pH adequado, geralmente entre 6,0 e 6,8, é crucial para a sobrevivência e proliferação dos microrganismos celulolíticos, enquanto condições adversas, como acidose ruminal, podem comprometer significativamente a digestão da fibra e a saúde animal. A eficiência da fermentação é diretamente influenciada pela composição química da fibra.

Componentes como a celulose e hemicelulose são altamente fermentáveis, enquanto a lignina, um polímero estrutural presente na parede celular, atua como barreira física e química, dificultando o acesso das enzimas microbianas (De Menezes *et al.*, 2021). A fração de fibra em detergente neutro digestível (FDN digestível) é um indicador importante da qualidade da fibra em dietas de ruminantes. Essa fração representa a porção da fibra que pode ser efetivamente fermentada no rúmen e convertida em energia. A

quantidade de FDN digestível varia entre os diferentes alimentos, sendo maior em forragens com baixo teor de lignina e fibra mais solúveis.

A fração indigestível da FDN é a que mais afeta a utilização da fibra, podendo ser exceder a metade da FDN total no rúmen. Khalili e Huhtanen (1991) demonstraram relação negativa entre a digestibilidade *in vivo* da FDN e a quantidade de FDN total no rúmen. Como a digestibilidade da FDN no rúmen aumenta com o passar do tempo, a quantidade de FDN total e de FDN digestível diminui numa taxa similar, mas a fração de FDN indigestível diminui mais lentamente. Então, os fatores da dieta que afetam o ambiente ruminal diminuindo a degradação da FDN, aumenta a quantidade (pool) de FDN, especialmente da fração digestível. A diminuição na digestibilidade da fibra pode reduzir o consumo de fibra quando o enchimento ruminal é o fator limitante.

1.5 Estratégias para melhorar a digestibilidade da fibra da silagem de milho

A digestibilidade da fibra é um dos principais fatores que determinam a qualidade da silagem de milho e a eficiência como alimento para ruminantes. Melhorar a digestibilidade da fibra contribui para otimizar a fermentação ruminal, aumentar o consumo de matéria seca e melhorar o desempenho produtivo dos animais (Gado *et al.*, 2009). Diversas estratégias podem ser empregadas para alcançar esse objetivo, como a seleção de híbridos de milho com características favoráveis, a adoção de práticas agrônômicas específicas e o uso de aditivos na ensilagem.

A escolha do híbrido de milho é uma das estratégias mais importantes para melhorar a digestibilidade da fibra. Híbridos com menor teor de lignina apresentam maior digestibilidade, pois a lignina é um dos principais fatores que limitam a degradação da fibra no rúmen (Grant e Ferrareto, 2018). Estudos têm demonstrado que híbridos conhecidos como *brown midrib* (BMR) possuem alterações genéticas que reduzem a síntese de lignina, resultando em maior digestibilidade da fibra e melhor eficiência alimentar (Sattler *et al.*, 2010). Apesar da maior digestibilidade da fibra, as plantas com menor teor de lignina frequentemente apresentam menor produtividade de MS, maior risco de tombamento e maior susceptibilidade a doenças.

Além da lignina, a composição dos monômeros que formam a lignina também influencia a digestibilidade. Híbridos com maior proporção de monômeros de siringil em relação a guaiacil apresentam lignina mais facilmente degradável, o que contribui para

melhor digestão da fibra. Assim, a seleção de híbridos com características favoráveis deve considerar tanto o teor de lignina quanto a composição química (De Menezes *et al.*, 2021).

As práticas agronômicas desempenham papel crucial na qualidade da silagem e na digestibilidade da fibra. Um dos fatores mais importantes é o ponto de colheita, que deve ser realizado quando o teor de matéria seca da planta está entre 30% e 35%. Nesse estágio, a planta apresenta um equilíbrio ideal entre teor de fibra e concentração de nutrientes, garantindo uma silagem de alta qualidade e boa digestibilidade (Lauer, 1996).

O manejo de fertilização também impacta diretamente a qualidade da forragem. A aplicação adequada de nutrientes, como nitrogênio, fósforo e potássio, promove o desenvolvimento saudável da planta e pode influenciar a composição da fibra (Farias *et al.*, 2015). No entanto, o excesso de fertilizantes, especialmente o nitrogênio, pode aumentar a deposição de lignina nos tecidos vegetais, reduzindo a digestibilidade da fibra. Portanto, é fundamental equilibrar a fertilização para maximizar o rendimento sem comprometer a qualidade da silagem.

O uso de aditivos durante o processo de ensilagem é outra estratégia eficiente para melhorar a digestibilidade da fibra e a qualidade geral da silagem. Inoculantes biológicos, compostos por bactérias lácticas, são amplamente utilizados para acelerar o processo de fermentação e reduzir as perdas de nutrientes durante o armazenamento. Essas bactérias convertem açúcares em ácido lático, diminuindo rapidamente o pH da silagem e inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis, como fungos e leveduras (Silva *et al.*, 2023).

Além dos inoculantes biológicos, tratamentos químicos, como o uso de ureia e ácidos orgânicos, podem ser aplicados para melhorar a fermentação e aumentar a digestibilidade da fibra. A ureia, por exemplo, atua como fonte de nitrogênio não proteico para os microrganismos ruminais, promovendo a síntese de proteínas microbianas e potencializando a degradação da fibra. Já os ácidos orgânicos, como o ácido propiônico, ajudam a controlar a proliferação de microrganismos indesejáveis, garantindo maior estabilidade e qualidade da silagem (Neumann *et al.*, 2011). Outra abordagem é o uso de aditivos enzimáticos, como celulasas e hemicelulasas, que atuam diretamente na quebra dos carboidratos estruturais, aumentando a disponibilidade de açúcares para a fermentação ruminal (Jung e Deetz, 1993).

Uma técnica que pode melhorar a digestibilidade, mas não está relacionada com a composição química da forragem é o processamento físico ou mecânico, que tem o propósito de reduzir as dimensões das partículas da forragem, diminuindo o enchimento

do trato digestório e, conseqüentemente, aumento de consumo. Esta técnica resulta em ampliação da área superficial disponível para a colonização microbiana, favorecendo potencialmente o aumento na utilização da fibra (Humer *et al.*, 2017). Apesar das partículas mais longas de forragem beneficiarem a formação do *mat* ruminal e estimularem a atividade mastigatória, essas partículas, quando em excesso, podem limitar a ingestão através da redução da taxa de passagem ruminal e aumento do enchimento (Mertens, 1987).

Outra possibilidade é a utilização de moduladores das vias de deposição de lignina, como o ácido piperonílico, que é um inibidor *quasi-irreversível* da cinamato 4-hidroxilase que catalisa o segundo passo da via dos fenilpropanoides, responsável pela produção de lignina e outros compostos fenólicos (Chen *et al.*, 2011). E a benzohidrazida que é uma molécula inibidora da via dos fenilpropanoides, com o objetivo de regular a biossíntese dos monômeros de lignina e assim modificar a estrutura deste polímero presente na parede celular das plantas de milho para ensilagem.

1.6 Uso de inibidores de lignina como estratégia para melhorar a digestão da fibra da silagem de milho

A lignina é um dos principais componentes que limitam a digestibilidade da fibra em ruminantes (Van Soest, 1994), por limitar a digestibilidade dos carboidratos estruturais, como celulose e hemicelulose. Isso ocorre porque a lignina forma ligações cruzadas com esses carboidratos, dificultando a ação microbiana e enzimática dos microrganismos no rúmen. Para contornar essa barreira, o uso de inibidores de lignina tem se mostrado uma estratégia promissora, pois interfere diretamente no processo de biossíntese desse composto.

Nomeados como inibidores da via dos fenilpropanoides, responsável pela produção de compostos fenólicos da parede celular (lignina e ácidos hidroxicinâmicos) que interferem na digestibilidade enzimática da biomassa lignocelulósica. Os ácidos metilenodioxicinâmico (MDCA), piperolínico (PIP) e daidzina (DNZ) agem em enzimas específicas da via, modelando a arquitetura da parede celular o que facilita a liberação de açúcares fermentáveis a partir de celulose e hemiceluloses. A aplicação desses inibidores no milho promoveram o aumento da digestibilidade das plantas colhidas ao ponto de silagem (De Freitas, 2018).

Estudos têm mostrado que a redução no conteúdo de lignina afeta diretamente a sacarificação, aumentando a liberação de açúcares fermentáveis (Chang *et al.* 2000; Draude *et al.* 2001; Yang *et al.* 2004). A lignina interfere adsorvendo as hidrolases inibindo a ação sobre a celulose (Chernoglazov *et al.* 1998) e ainda, evita que as fibras de celulose entumeçam, diminuindo a área de ação das celulasas (Mooney *et al.* 1998).

Outro composto também estudado como inibidor de lignina é a Benzohidrazida, que faz parte dos compostos orgânicos importantes na química medicinal por causa da alta bioatividade (Sampiron *et al.* 2019). No entanto há poucos estudos disponíveis sobre os efeitos nas plantas (Tsukamoto *et al.* 2005). Esses compostos podem ser sintetizados a partir de precursores aromáticos para produzir compostos benzoicos análogos aos metabólitos da via dos fenilpropanoides (Machineni *et al.*, 2020) que são capazes de alterar a via da lignina.

A rota dos fenilpropanoides é encarregada da produção de ácidos fenólicos e monolignóis e é uma via exclusiva das plantas que resulta em compostos com estruturas e funções altamente variadas (Dixon e Paiva, 1995). Está envolvido na formação de biopolímeros de grande importância quantitativa, como a lignina e suberina. A parte inicial do metabolismo dos fenilpropanoides que parte da rota do ácido chiquimato ao nível do L-Fenilalanina, compreende um conjunto de três etapas enzimáticas que conduzem ao 4-cumaril CoA.

Este conjunto de três reações, muitas vezes chamado de reação geral via fenilpropanoide, controla o fluxo de metabólitos para todas as famílias de compostos derivados do esqueleto C6-C3 da fenilalanina. Os compostos que possuem uma estrutura de C6-C1 não são exclusivamente fenilpropanoides, mas têm a origem a partir de L-Fenilalanina. Eles surgem dos intermediários da via central, como o ácido cinâmico ou o ácido 4-cumárico (Yalpani *et al.*, 1993). Moléculas que se enquadram nessa estrutura C6-C1 incluem ácidos benzoico e salicílico, assim como substâncias de grande importância econômica, como a vanilina.

Na sequência da rota central dos fenilpropanoides, o passo seguinte envolve a hidroxilação do ácido transcinâmico para formar o ácido 4-cumárico. Essa transformação é realizada pela enzima C4H, pertencente a superfamília de proteínas hemetiolato Cyt P450. As P450 são monooxigenases que catalisam a oxidação de uma vasta gama de substâncias químicas, tanto endógenas quanto exógenas, em diversos organismos. Nas plantas, essas enzimas desempenham funções cruciais em diversas vias biossintéticas, abrangendo desde esteróis, isoprenoides, alcaloides, ácidos graxos oxigenados e até

fenilpropanoides (Bolwell *et al.*, 1994). Além disso, elas têm participação no metabolismo e, por vezes, na ativação de muitos herbicidas, inseticidas e outros compostos xenobióticos.

Estudos conduzidos por Martarello (2023), demonstrou que o composto benzohidrazida apresentou atividade biológica no milho e foi capaz de aumentar a sacarificação da lignocelulose, ou seja, ele aumentou a sacarificação sem afetar o crescimento da planta em testes de sala de crescimento. Esse mesmo autor em experimentos a campo a benzohidrazida aumentou a sacarificação das folhas e caules do milho, independentemente de sua lignocelulose foi submetida a deslignificação pós-colheita com HPAC.

Segundo esse mesmo autor, a benzohidrazida não promoveu efeitos colaterais na avaliação biométrica e bioquímica realizada. De modo geral, o composto benzohidrazida poderia ser usado como um princípio ativo para a formulação de agroquímicos para melhorar a sacarificação em culturas forrageiras e agro energéticas.

REFERÊNCIAS

Allen, M., Oba, M. 1996. Fiber digestibility of foragens. In 57^a Conferência de Nutrição de Minnesota, Nutr. Conf. Protiva Tech. Symp. Ext. Special Programs, Bloomington, MN. Univ. Minnesota, St. Paul, p.151-171.

Allen, M. S., Coors, J. G., Roth, G. W. 2003. Corn silage. Silage science and technology, 42, 547-608.

Almeida Filho, S. L. D., Fonseca, D. M. D., Garcia, R., Obeid, J. A., Oliveira, J. S. 1999. Características agronômicas de cultivares de milho (*Zea mays* L.) e qualidade dos componentes e silagem. Revista Brasileira de Zootecnia, 28, 7-13.

Ashbell, G., Weinberg, ZG, Hen, Y., Filya, I. 2002. Os efeitos da temperatura na estabilidade aeróbica de silagens de trigo e milho. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 28 (5), 261-263.

Ataíde Júnior, J. R., Pereira, O. G., Valadares Filho, S. D. C., Garcia, R., Cecon, P. R., Alves, M. J., Moreira, A. L. 2001. Consumo, digestibilidade e desempenho de novilhos alimentados com rações à base de feno de capim-tifton 85, em diferentes idades de rebrota. Revista Brasileira de Zootecnia, 30, 215-221.

Basi, S., Neumann, M., Marafon, F., Ueno, R. K., Sandini, I. E. 2011. Influência da adubação nitrogenada sobre a qualidade da silagem de milho. Applied Research and Agrotechnology, 4(3).

Barriere, Y., Émile, J. C., Traineau, R., Hébert, Y. 1995. Genetic variation in the feeding efficiency of maize genotypes evaluated from experiments with dairy cows. *Plant breeding*, 114(2), 144-148.

Bernardes, T. F., Do Rêgo, A. C. 2014. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 97(3), 1852-1861.

Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M. 2003. Lignin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 519-546. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938>.

Bolwell, G. P., Bozak, K., Zimmerlin, A. 1994. Plant cytochrome P450. *Phytochemistry*, 37, 1491–1506. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89567-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89567-9).

Borneman, W. S., Akin, D. E., Ljungdahl, L. G. 1989. Fermentation products and plant cell wall-degrading enzymes produced by monocentric and polycentric anaerobic ruminal fungi. *Appl. Environ. Microbiol*, 55, 1066–1073.

Braybrook, S. A., Jonsson, H. 2016. Shifting Foundations: The Mechanical Cell Wall and Development. *Current Opinion in Plant Biology*, 29, 115-120. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.12.009>.

Buckeridge, M. S. 2010. Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. *Plant physiology*, 154, 1017–1023. Doi: <https://doi.org/10.1104/pp.110.158642>.

Burnet, M. C., Dohnalkova, A. C., Neumann, A. P., Lipton, M. S., Smith, R. D., Suen, G., Callister, S. J. 2015. Evaluating models of cellulose degradation by *Fibrobacter succinogenes* S85. *PLoS ONE*, 10, e0143809.

Cabral, L. D. S., Valadares Filho, S. D. C., Detmann, E., Zervoudakis, J. T., Pereira, O. G., Gonçalves Veloso, R., Pereira, E. S. 2002. Cinética ruminal das frações de carboidratos, produção de gás, digestibilidade in vitro da matéria seca e NDT estimado da silagem de milho com diferentes proporções de grãos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31, 2332-2339.

Chang, V. S., Holtzapple, M. T. 2000. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84, 5- 37.

Chen, F., Tholl, D., Bohlmann, J., e Pichersky, E. 2011. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *The Plant Journal*, 66, 212–229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04520.x>.

Cheng, K. J., Kudo, H., Duncan, S. H., Mesbah, A., Stewart, C. S., Bernalier, A., Fonty, G., Costerton, J. W. 1991. Prevention of fungal colonization and digestion of cellulose by the addition of methylcellulose. *Can. J. Microbiol*, 37, 484–487.

Cheng, K. 2000. Relative contributions of bacteria, protozoa, and fungi to in vitro degradation of orchard grass cell walls and their interactions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3807–3813.

Cherney, J. H., Cherney, D. J. R. 2003. Avaliação da qualidade da silagem. *Silage science and technology*, 42, 141-198.

Cherney, J. H., Cherney, D. J. R., Akin, D. E., Axtell, J. D. 1991. Potencial de mutantes de nervura central marrom, baixa lignina para melhorar a qualidade da forragem. *Advances in agronomy*, 46, 157-198.

Chernoglazov, V. M., Ermolova, O. V., Klyosov, A. A. 1988. Adsorption of high-purity endo-1, 4- β -glucanases from *Trichoderma reesei* on components of lignocellulosic materials: cellulose, lignin, and xylan. *Enzyme and Microbial Technology*, 10(8), 503-507.

Chiang, V. L. 2006. Monolignol biosynthesis and genetic engineering of lignin in trees, a review. *Environmental Chemistry Letters*, 4, 143–146. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10311-006-0067-9>. Acesso em: 10/01/2025.

Christopherson, M. R., Dawson, J. A., Stevenson, D. M., Cunningham, A. C., Bramhacharya, S., Weimer, P. J., Kendzierski, C., Suen, G. 2014. Unique aspects of fiber degradation by the ruminal ethanologen *Ruminococcus albus* 7 revealed by physiological and transcriptomic analysis. *BMC Genom.*, 15, 1066.

Clauss, M., Hummel, J. 2017. Physiological adaptations of ruminants and their potential relevance for production systems. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46, 606-613.

De Freitas, D. L. 2018. Engenharia fisiológica da biomassa lignocelulósica: modificando a parede celular com inibidores enzimáticos da via dos fenilpropanoides. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá.

De Menezes, R. A., Gonçalves, L. C., de Assis Pires, F. P. A., Menezes, G. L., de Oliveira, A. F. 2021. Lignina: caracterização, efeito e manipulação na nutrição de ruminantes. *Revista Eletrônica Nutritime*.

Dehority, B. A. 2008. Improved in vitro procedure for maintaining stock cultures of three genera of rumen protozoa. *J. Anim. Sci.*, 86, 1395–1401.

Delfosse-Debusscher, J., Thines-Sempoux, D., Vanbelle, M., Latteur, B. 1979. Contribution of protozoa to the rumen cellulolytic activity. *Ann. Res. Vet.*, 10, 255–257. 16.

Detmann, E., Souza, M. A., Valadares Filho, S. C., Queiroz, A. C., Berchielli, T. T., Saliba, E. O. S., Cabral, L. S., Pina, D. S., Ladeira, M. M., Azevedo, J. A. G. 2012. Métodos para análise de alimentos. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, Atlas.

Dixon R. A., Paiva, N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, 7, 1085–1097. Doi: 10.1105/tpc.7.7.1085.

Draude, K. M., Kurniawan, C. B., Duff, S. J. B. 2001. Effect of oxygen delignification on the rate and extent of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material, *Bioresource Technology* 79, 113-120.

Farias, J. S., Queiroz, L. O., Santos, G. R. A., Fagundes, J. L., Silva, M. A. 2015. Avaliação de tecidos e equipamentos alternativos na análise de fibras em detergente neutro e de fibra em detergente ácido. *Boletim de Indústria Animal*, 72(3), 229–233. <https://doi.org/10.17523/bia.v72n3p229>.

Farinas, C. S. 2011. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. - São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2011. 13 p., ISSN: 1518-7179; 54.

Fengel, D., Wegener, G., Greune, A. 1989. Studies on the delignification of spruce wood by organosolv pulping using Sem-Edxa and Tem. *Wood Science and Technology*, 23, 123-130.

Ferraretto, L. F., Shaver, R. D., Luck, B. D. 2018. Revisão de silagem: Avanços recentes e tecnologias futuras para colheita de silagem de milho fracionada e de planta inteira. *Journal of dairy science*, 101 (5), 3937-3951.

Ferreira, G., Teets, C. L. 2017. Effect of planting density on yield, nutritional quality, and ruminal in vitro digestibility of corn for silage grown under on-farm conditions. *The Professional Animal Scientist*, 33(4), 420-425.

Fukushima, R. S. G., Habitante, A. M. Q. B., Lacerda, R. S. 2000. Extração da lignina e emprego da mesma em curvas de calibração para a mensuração da lignina em produtos vegetais. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 29 (5), 1302–1311. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982000000500007>.

Gado, H. M., Salem, A. Z. M., Robinson, P. H., Hassan, M. 2009. Influence of exogenous enzymes on nutrient digestibility, extent of ruminal fermentation as well as milk production and composition in dairy cows. *Animal Feed Science Technology*, v. 154, p. 36-46.

Gallego-Giraldo, L., Shadle, G., Shen, H., Barros-Rios, J., Corrales, S. F., Whand, H., Dixon, R. A. 2016. Combining enhanced biomass density with reduced lignin level for improved forage quality. *Plant Biotechnology Journal*, 14, 895-904. Doi: 10.1111/pbi.12439.

Getachew, G., Laca, E. A., Putnam, D. H., Witte, D., McCaslin, M., Ortega, K. P., De Peters, E. J. 2018. The impact of lignin downregulation on alfalfa yield, chemical composition, and in vitro gas production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98, 4205-4215. Doi: 10.1002/jsfa.8942.

Giger-Reverdin, S. Review of the main methods of cell wall estimation: interest and limits for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v.55, n.4, p.295-334, 1995.

Grant, R. J., Ferraretto, L. F. 2018. Silage review: Silage feeding management: Silage characteristics and dairy cow feeding behavior. *J Dairy Sci.*, 101, 4111-4121. Doi: 10.3168/jds.2017-13729.

Halpin, C. 2019. Lignin engineering to improve saccharification and digestibility in grasses. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 223–229. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.013>.

Hindrichsen, I. K., Kreuzer, M., Madsen, J., Bach Knudsen, K. E. 2006. Fiber and lignin analysis in concentrate, forage, and feces: Detergent versus enzymatic-chemical method. *Journal of Dairy Science*, 89(6), 2168–2176. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72287-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72287-1).

Hristov, A. N., McAllister, T. A. 2002. Effect of inoculants on wholecrop barley silage fermentation and dry matter disappearance in situ. *J. Anim. Sci.*, v.80, p.510- 516.

Hoover, W., Miller, T. 1996. Feeding for maximum rumen function. *Mid-South Ruminant Nutrition Conference Proceedings*, Ed. Eller R. Jordan. P. 33-46.

Humer, E., Petri, R. M., Aschenbach, J. R., Bradford, B. J., Penner, G. B., Tafaj, M., Südekum, K. H., Zebeli, Q. 2017. Invited review: Practical feeding management recommendations to mitigate the risk of subacute ruminal acidosis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 101. 872–888. Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13191>.

Hungate, R. E. 1966. *The Rumen and Its Microbes*; Academic Press: New York, NY, USA, 2.

Hunt, C. W., Kezar, W., Vinande, R. 1992. Rendimento, composição química e fermentabilidade ruminal de planta inteira de milho, espiga e palha conforme afetados por híbrido. *Journal of production agriculture*, 5 (2), 286-290.

Johnson, L. M. 2002. Manejo de silagem de milho I. efeitos do híbrido, maturidade e processamento mecânico em características químicas e físicas. *Journal of Dairy Science*, 85, 833-853.

Jung, H. G., Deetz, D. A. 1993. Cell wall lignification and degradability. In: *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, Wis., 315–340. Doi: <https://doi.org/10.2134/1993.foragecellwall>.

Khalili, H., Huhtanen, P. 1991. Sucrose supplements in cattle given grass silage-base diet. 2. Digestion of cell wall carbohydrates. *Animal Feed Science and Technology*. Amsterdam, v.33, p. 263-272.

Klopfenstein, T. J., Erickson, G. E., Berger, L. L. 2013. Maize is a critically important source of food, feed, energy and forage in the USA. *Field Crops Research*, 153, 5-11.

Lapierre, C. 1993. Application of new methods for the investigation of lignin structure. In: Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D., et al. Forage cell wall structure and digestibility. Madison: ASA, p.133-163.

Lauer, J. 1996. Harvesting silage at the correct moisture. Wisconsin Crop Manager, v.3, n.24, p.142-143.

Lima, M. L. M. 2008. Padrão de Fermentação Ruminal de Bovinos Recebendo Produto Homeopático. Ciência Animal Brasileira, v. 9, n. 4, p. 969-975.

Machineni, L. 2020. Lignocellulosic biofuel production: review of alternatives. Biomass Conversion and Biorefinery, 10, 779-791. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00445-x>.

Martarello, D. C. I., Tonete-Diniz, D. C., Gonzaga, D. E. R., Almeida, A. M., Constantin, R. P., da Silva, K. G., dos Santos, W. D. 2023. Treating maize plants with benzohydrazide increases saccharification of lignocellulose: A non-transgenic approach to improve cellulosic ethanol production. Biomass Conversion and Biorefinery, 13(11), 9943-9954.

Mertens, D. R. 1987. Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function. Journal of Dairy Science, p. 64, p.1548-1558.

Mertens, D. R. 1997. Creating a system for meeting the fiber requirement of dairy cows. Journal of Dairy Science, v.80, p.1463.

Montgomery, L., Flesher, B., Stahl, D. 1988. Transfer of *Bacteriodes succinogenes* (Hungate) to *Fibrobacter* gen. nov. as *Fibrobacter succinogenes* comb. nov. and description of *Fibrobacter intestinalis* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol, 38, 430–435.

Mooney, C. A., Mansfield, S. D., Touhy, M. G., Saddler, J. N. 1998. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. Bioresource technology, 64(2), 113-119.

Morais, S., Mizrahi, I. 2019. Islands in the stream: From individual to communal fiber degradation in the rumen ecosystem. FEMS Microbiol. Rev, 43, 362–379.

Neumann, M., Mühlbach, P. R. F., Nörnberg, J. L., Ost, P. R., Restle, J., Sandini, I. E., Romano, M. A. 2007. Características da fermentação da silagem obtida em diferentes tipos de silos sob efeito do tamanho de partícula e da altura de colheita das plantas de milho. Ciência Rural, 37, 847-854.

Neumann, M., Oliboni, R., Oliveira, M. R., Faria, M. V., Ueno, R. K., Reinerh, L. L., Durman, T. 2011. Aditivos químicos utilizados em silagens. Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias, 3(2), 187-208.

Neumann, N. 2002. Avaliação, composição, digestibilidade e aspectos metabólicos da fibra. Seminário de Bioquímica do tecido animal. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS.

Nussio, L. G., Simas, J. M. C., Lima, M. M. 2001. Determinação do ponto de maturidade do milho para silagem. In: Luiz Gustavo Nussio; Maity Zopollato; José Carlos de Moura. (Org.). Anais do 2º Workshop sobre milho para silagem. 1 ed. Piracicaba-SP: FEALQ, v.1, p.11-26.

Oba, M., Allen, M. S. 1999. Avaliação da importância da digestibilidade da fibra em detergente neutro da forragem: efeitos na ingestão de matéria seca e na produção de leite de vacas leiteiras. *Journal of dairy science*, 82 (3), 589-596.

Oliveira, J. S., Sobrinho, F. S., Reis, F. A., Silva, G. A., Rosa Filho, S. N., Souza, J. J. R., Moreira, F. M., Pereira, J. A., Firmino, W. G. 2007. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho destinados à silagem em bacias leiteiras do estado de Goiás. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 1:45-50.

Oliveira, V. D. S., Santana Neto, J. A., Valença, R. D. L., Silva, B. C. D. D., Santos, A. C. P. D. 2016. Carboidratos fibrosos e não fibrosos na dieta de ruminantes e seus efeitos sobre a microbiota ruminal. *Vet. Not*, 01-18. <https://doi.org/10.14393/VTv22n2a2016.32660>.

Paziani, S. D. F., Duarte, A. P., Nussio, L. G., Gallo, P. B., Bittar, C. M. M., Zopollato, M., Reco, P. C. 2009. Características agronômicas e bromatológicas de híbridos de milho para produção de silagem. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38, 411-417.

Pinto, P. H. A. 2022. Efeito da densidade e época de plantio do milho na qualidade nutricional e digestibilidade da silagem: uma revisão bibliográfica. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria.

Qiu, X., Eastridge, M. L., Wang, Z. 2003. Efeitos do híbrido de silagem de milho e da concentração dietética de FDN de forragem na digestibilidade e no desempenho de vacas leiteiras. *Journal of dairy Science*, 86 (11), 3667-3674.

Raffrenato, E., Fievisohn, R., Cotanch, K. W., Grant, R. J., Chase, L. E., Van Amburgh, M. E. 2017. Effect of lignin linkages with other plant cell wall components on in vitro and in vivo neutral detergent fiber digestibility and rate of digestion of grass forages. *Journal of Dairy Science*, 100, 8119–8131. Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12364>.

Restle, J., Pacheco, O. S., Alves Filho, D. C., Freitas, A. K., Neumann, M., Brondani, I. L., Pádua, J. T. Arboitte, M. Z. 2006. Silagem de diferentes híbridos de milho para produção de novilhos superjovens. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35:2066-2076.

Ribeiro, K. G., Garcia, R., Pereira, O. G., Valadares Filho, S. D. C., Cecon, P. R. 2001. Eficiência microbiana, fluxo de compostos nitrogenados no abomaso, amônia e pH ruminal, em bovinos recebendo dietas contendo feno de capim-tifton 85 de diferentes idades de rebrota. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30, 581-588.

Rippert, P., Puyaubert, J., Grisolle, D., Derrier, L., Matringe, M. 2009. Tyrosine and phenylalanine are synthesized within the plastids in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149(3), 1251-1260.

Rosa, B., Fadel, R. 2001. Uso de amônia anidra e de uréia para melhorar o valor alimentício de forragens conservadas. Simpósio sobre produção e utilização de forragens conservadas, 1, 41-63.

Salazar, D. R., Silva, L. F. P. 2009. Variação genética da composição química e digestibilidade do colmo de genótipos de milho colhidos em três estágios de maturidade (Doctoral dissertation, Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009. 86f).

Saliba, E. de O. S., Rodriguez, N. M., Morais, S. A. L., Piló-Veloso, D. 2001. Ligninas: métodos de obtenção e caracterização química. *Ciência Rural*, 31(5), 917–928. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782001000500031>.

Sampiron, E. G., Costacurta, G. F., Baldin, V. P., Almeida, A. L., Ieque, A. L., Santos, N. C., Scodro, R. B. 2019. Hydrazone, benzohydrazones and isoniazid-acylhydrazones as potential antituberculosis agents. *Future Microbiology*, 14(11), 981-994. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0040>.

Sattler, G., Cllander, M. J., Grablowitz, D., Walker, T., Bee, E. K., Rzany, B., Flynn, T. C., Carruthers, A. 2010. Noninferiority of incobotulinumtoxinA, free from complexing proteins, compared with another botulinum toxin type A in the treatment of glabellar frown lines. *Dermatologic Surgery*, 36, 2146-2154. Doi: 10.1111/j.1524-4725.2010.01706.x.

Silva, D. J., Queiroz, A. C. 2002. Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos. 3.ed. Viçosa: UFV. 235p.

Silva, M. M. 2023. Impacto da inoculação bacteriana na qualidade da silagem de milho e na terminação de bovinos em confinamento. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal.

Suen, G., Weimer, P. J., Stevenson, D. M., Aylward, F. O., Boyum, J., Deneke, J., Drinkwater, C., Mikhailova, N., Ivanova, N., Chertkov, I. 2011. The complete genome sequence of *Fibrobacter succinogenes* S85 reveals a cellulolytic and metabolic specialist. *PLoS ONE* 2011, 6, e0018814.

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M. Murphy, A. 2017. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. SBN: 978-85-8271-367-9.

Taiz, L., Zieger, E. 2002. Auxin: Plant Physiology. Sinaver Association Inc. Pub. *Plant. Sci*, 41, 179–183.

Tine, M. A., McLeod, K. R., Erdman, R. A., VI, R. B. 2001. Effects of brown midrib corn silage on the energy balance of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 84(4), 885-895.

Tjardes, K. E., Buskirk, D. D., Allen, M. S., Tempelman, R. J., Bourquin, L. D., Rust, S. R. 2002. Concentração de fibra em detergente neutro em silagem de milho

influencia a ingestão de matéria seca, a digestibilidade da dieta e o desempenho de novilhos Angus e Holstein. *Journal of animal science*, 80 (3), 841-846.

Tsukamoto, M., Read, M. 2005. Novel benzohydrazide derivatives as herbicides and desiccant compositions containing them. U.S. Patent Application No. 10/521,315.

Van Soest, P. J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.

Vanholme, R., De Meester, B., Ralph, J., Boerjan, W. 2019. Lignin biosynthesis and its integration into metabolism. *Current opinion in biotechnology*, 56, 230-239.

Verbancic, J., Lunn, J. E., Stitt, M. Persson, S. 2018. Carbon Supply and the Regulation of Cell Wall Synthesis. *Molecular Plant*, 11, 75-94. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.10.004>.

Vinzelj, J., Joshi, A., Young, D., Begovic, L., Peer, N., Mosberger, L., Luedi, K. C. S., Insam, H., Flad, V., Nagler, M. 2022. No time to die: Comparative study on preservation protocols for anaerobic fungi. *Front. Microbiol*, 13, 978028.

Wilkinson, J. M., Rinne, M. 2018. Highlights of progress in silage conservation and future perspectives. *Grass and Forage Science*, 73(1), 40-52.

Williams, A. G., Coleman, G. S. 1992. *The Rumen Protozoa*; Springer: New York, NY, USA, 58.

Yalpani, N., Leon, J., Lawton, M. A., Raskin, I. 1993. Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol*, 103, 315–321. Doi: 10.1104/pp.103.2.315.

Yang, B., Wyman, C. E. 2004. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. *Biotechnology and bioengineering*, 86(1), 88-98.

II. Desempenho de novilhas leiteiras alimentadas com silagem de milho tratada com benzohidrazida

(Manuscrito formatado de acordo com as normas da revista Journal of Dairy Science)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho de novilhas leiteiras alimentadas com silagem de planta inteira de milho tratada com benzohidrazida (BZD). Vinte e quatro novilhas holandesas (333 kg de peso corporal médio) foram alocadas em 12 blocos ao acaso com base no peso corporal e alojadas em baias individuais. Os animais permaneceram confinados durante período de 67 d, sendo 7 d de adaptação às instalações e 60 d para comparação das dietas experimentais. O consumo de MS foi medido diariamente, enquanto a altura de cernelha e de garupa foram medidas no início e no final do período experimental. A digestibilidade de nutrientes no trato total foi determinada nos dias 18 a 22 e 39 a 43. O teor de lignina brometo de acetila foi similar entre tratamentos, mas a silagem de milho tratada com BZD apresentou menores valores de lignina em detergente ácido. Os consumos de MS e FDN foram menores nos animais alimentados com a dieta contendo silagem tratada com o BZD, mas o ganho de peso diário foi similar entre tratamentos. A utilização de BZD induziu aumento na digestibilidade aparente no trato total das frações FDN (+10,3%) e carboidratos não fibrosos (+2,2%), resultando em aumento na digestibilidade da MS (+6,0%) da dieta. Assim, a eficiência alimentar das novilhas recebendo silagem de milho tratada com BZD foi 11% superior ao tratamento controle. Em conclusão, a aplicação de BZD à cultura do milho aumentou a digestibilidade *in vivo* de fibra e carboidratos não fibrosos, o que resultou em maior valor alimentício da silagem de milho para novilhas leiteiras em crescimento.

Palavras-chave: digestibilidade, consumo de matéria seca, inibidor enzimático, lignina

INTRODUÇÃO

A alimentação adequada de ruminantes é fundamental para garantir produtividade e eficiência no sistema de produção animal. No Brasil, o milho é a principal espécie cultivada para produção de silagens em fazendas leiteiras (Bernardes e Rego, 2014). O milho é a espécie mais escolhida pelos pecuaristas por apresentar características favoráveis ao processo de ensilagem, tais como, alto potencial de produção de matéria seca e ensilabilidade, além de possuir elevado teor energético (Pereira *et al.*, 2004).

A fibra proveniente da silagem desempenha papel essencial na manutenção da saúde ruminal, promovendo a fermentação microbiana e a produção de ácidos graxos voláteis. A composição nutricional da silagem de milho apresenta elevada concentração de carboidratos estruturais, como celulose e hemicelulose, que são fermentados no rúmen para gerar energia. No entanto, a presença de lignina, um componente da parede celular vegetal, pode reduzir a digestibilidade da fibra (Van Soest, 1994).

A digestibilidade da fibra (FDN) impacta o desempenho animal independentemente da concentração na dieta (Dado e Allen, 1996). A quantidade de FDN na alimentação apresenta esplendor negativo com o CMS, devido à fermentação mais lenta e maior tempo de retenção no rúmen. No entanto, uma fibra com maior digestibilidade pode favorecer o consumo, pois acelera a taxa de passagem e libera espaço para uma nova refeição (Robinson e McQueen, 1997).

A lignina é reconhecida como o principal impedimento à digestão de fibra (Van Soest, 1994). A resistência física e química classifica-a como substância indigestível para a nutrição animal e, por causa da forte ligação com a celulose e as proteínas, estes nutrientes têm a digestibilidade reduzida (Taiz *et al.*, 2017).

Uma das estratégias com potencial para reduzir o impacto negativo da lignina na digestibilidade da fibra de forragens é a aplicação de inibidores enzimáticos da via dos fenilpropanoides, como a benzohidrazida (BZD). A BZD pode regular a biossíntese dos monômeros de lignina e modificar a estrutura deste polímero presente na parede celular das plantas de milho para ensilagem, facilitando o ataque de hidrolases microbianas no rúmen. Estudos realizados, com a BZD aplicada por aspersão foliar em plantas jovens de milho cultivadas em laboratório, demonstraram resultados positivos para o aumento da

sacarificação da biomassa através das análises de digestibilidade enzimática (Martarello *et al.*, 2023).

Diante disso, o objetivo deste estudo é avaliar o desempenho de novilhas leiteiras alimentadas com silagem de planta inteira de milho tratada com benzohidrazida (BZD). A hipótese é que, como este composto (BZD) atua na regulação da biossíntese dos monômeros de lignina modificando a estrutura deste polímero nas plantas de milho, a BZD deve aumentar a digestibilidade da fibra (e.g., FDN) da silagem de milho e, portanto, melhorar o desempenho dos animais.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental de Iguatemi da Universidade Estadual de Maringá – UEM. Os procedimentos de cuidado e manejo dos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá – sob número de aprovação 9167300823.

Cultura do milho, ensilagem e tratamentos

O híbrido de milho DKB255PRO3 (Dekalb, Uberlândia, Minas Gerais) foi plantado em fevereiro de 2023, com espaçamento de 90 cm entre linhas e 5 sementes por metro linear (55.600 sementes/ha), em quatro parcelas de 1 ha, agrupadas em dois blocos com duas parcelas em cada bloco, totalizando 4 ha para o experimento. Um fertilizante contendo N P K (10-15-15) foi aplicado a 200 kg/ha no sulco com a semente. Após 30 dias do plantio foi feita a adubação de cobertura com ureia a 200 kg/ha, a lanço, em toda área experimental.

Após 26 dias da emergência das plantas de milho, a benzohidrazida (BZD) foi aplicada em duas parcelas (uma parcela para cada bloco) a uma concentração final de 50 µM, em o volume total de 180 L/ha. Uma segunda aplicação foi realizada após 43 dias de emergência das plantas de milho, na mesma dose da primeira aplicação. Para obtenção da solução final de BZD, inicialmente foi preparado 20 L de uma solução stock com concentração de 500 µM de BZD, que foi diluída em 180 L de calda (H₂O + Aureo® como adjuvante) diretamente no tanque do pulverizador para concentração final de 50 µM. As outras duas parcelas não foram tratadas (CON). O sistema de pulverização

utilizado foi em barra com múltiplos bicos de pulverização acoplado ao sistema hidráulico do trator.

As plantas de milho foram colhidas quando atingiram o estágio de 2/3 da linha do leite (aproximadamente 35% MS), com uma colhedora de forragem do tipo tracionada ajustada para picar em tamanho teórico de partículas de 8 mm. Imediatamente após a colheita, a forragem picada foi distribuída alternadamente em dois silos trincheira (um silo por tratamento) com as seguintes dimensões: 4 m de largura, 1,5 m de altura e 14 m de comprimento.

Cada silo foi vedado com filme de polietileno branco e preto revestindo as paredes laterais e cobrindo a silagem, protegida com uma manta de polietileno de alta densidade (213 g/m²; cobertura anti-UV Silostop, Bruno Rimini Ltd, Londres, Reino Unido) e sacos de cascalho colocados ao redor das bordas e em linhas através do silo em intervalos de 3 m. Após dois meses de armazenamento, os silos foram abertos para alimentação de novilhas leiteiras.

Animais e dieta

Vinte e quatro novilhas holandesas (peso corporal de 333 ± 118 kg) foram bloqueadas pelo peso corporal inicial (12 blocos com 2 novilhas em cada bloco), alocadas aleatoriamente nos 2 tratamentos (CON ou BZD), e alojadas em baias individuais (2 × 3 m) com piso de concreto, com cocho coberto e bebedouro.

Durante 7 d, todos os animais receberam a mesma dieta contendo 85% de silagem de milho não experimental e 15% de concentrados. Após esse período de adaptação os animais receberam as dietas experimentais por 60 d. As dietas experimentais eram compostas (%MS) por 84,5% silagem de milho (CON ou BZD), 12,9% farelo de soja, 2,2% premix mineral-vitamínico e 0,40% ureia. Os ingredientes da dieta foram misturados manualmente duas vezes ao dia, imediatamente antes de cada refeição às 09 e 15h, em quantidade aproximadamente 10% acima da ingestão diária. A composição das dietas experimentais é apresentada na Tabela 1.

Coleta de dados e amostragem

As sobras da dieta foram coletadas e pesadas diariamente antes da alimentação matinal para determinação do consumo de MS (CMS). A variação diária do CMS foi

calculada como a diferença entre o CMS do dia atual e o CMS do dia anterior (Bevans *et al.*, 2005). No início do período de comparação e a cada 20 dias, os animais foram pesados e a altura de cernelha e de garupa foram medidas às 08h, após 14h de jejum durante a noite. O ganho médio diário (GMD) foi determinado pela diferença entre o peso vivo final e peso vivo inicial dividido pelos dias de alimentação. A eficiência alimentar foi calculada como GMD/CMS.

Nos dias 15 a 17 e 36 a 38, o comportamento alimentar foi monitorado visualmente por 48 h por avaliadores treinados. As atividades de alimentação e ruminação foram registradas em intervalos de 5 minutos e o padrão diário foi estimado assumindo um comportamento constante entre as observações. A atividade de mastigação foi calculada como a soma do tempo gasto comendo e ruminando. O número de refeições por dia, tamanho de refeição, duração da refeição e taxa de alimentação também foram computadas. Uma refeição foi definida por pelo menos 2 eventos consecutivos de ingestão de 5 minutos seguidos por pelo menos 10 minutos de ócio, ruminação ou ingestão de água. O tamanho da refeição foi estimado dividindo o CMS pelo número de refeições. A duração da refeição foi obtida dividindo o tempo de alimentação pelo número de refeições. A taxa de alimentação foi calculada dividindo o CMS pelo tempo de alimentação.

A partir dos dados de consumo individual de MS (CMS) e GMD, a energia líquida da dieta foi estimada de acordo com equações propostas pelo NRC, 1984. A necessidade de energia para ganho foi calculada como: $Em \text{ (Mcal/kg MS)} = 0,0608 \times ((PVm \times 478 / PVmd) ^{0,75}) \times (GPM ^{1,097})$, onde: PVm = peso vivo médio, 478 = peso de referência padrão e o PVmd = peso vivo final maduro. A necessidade energética para manutenção foi calculada como: $ELm \text{ (Mcal/kg MS)} = (0,077 \times PVm ^{0,75}) \times 1,2$. A energia líquida da dieta para manutenção foi estimada pela equação: $ELm \text{ (Mcal/kg MS)} = ((-b - \sqrt{(b \times b - 4 \times a \times c)}) / (2 \times a))$, em que: $a = -0,877 \times CMS$, $b = 0,877 \times ELg + 0,41 \times CMS + ELg$, $c = 0,41 \times ELm$.

A energia líquida da dieta para ganho foi calculada como: $ELg \text{ (Mcal/kg MS)} = 0,877 \times ELm - 0,41$. A energia do NDT da dieta foi calculada como: $\% = (ELm + 0,5058) / 0,0305$. A energia metabolizável da dieta foi calculada de acordo com a equação: $EM \text{ (Mcal/kg MS)} = NDT \times 0,0362$. O consumo de energia metabolizável foi estimado como: $\text{(Mcal/d)} = CMS \times EM$. O NDT da silagem de milho foi estimado pela equação: $\% = (NDTd - Elg \text{ dieta sem forragem}) / 85$, em que: 85 = proporção de volumoso incluso na dieta (85 %). A energia líquida para manutenção na silagem de milho foi estimada como:

ELm, (Mcal/kg MS) = (ELm dieta – ELm dieta sem forragem) / 85. A energia líquida para ganho na silagem de milho foi calculada como: ELg, (Mcal/kg MS) = ELg dieta – ELg dieta sem forragem) / 85.

Na 4^a e 7^a semana de comparação foram realizadas coletas de fezes por 5 dias consecutivos, três vezes ao dia, para medir a digestibilidade do trato total usando FDN não digerível como um marcador interno (FDNi; Huhtanen *et al.*, 1994). A digestibilidade aparente foi calculada usando dados de ingestão registrados nos dias da amostragem fecal. A pontuação de consistência fecal (1 a 5; Wildman *et al.*, 1982) foi registrada por 3 avaliadores treinados.

Nos dias 23 e 48, o sangue de cada animal foi coletado por punção da veia jugular externa 4 h após alimentação matinal em tubos a vácuo contendo EDTA. As amostras foram imediatamente centrifugadas a $2.500 \times g$ a 4°C por 30 min e congelados a -80°C para determinar os teores de ureia e glicose.

Análises laboratoriais

O pH da silagem, os produtos de fermentação e as contagens microbianas foram medidas em extratos aquosos preparados pela mistura de 25 g de silagem fresca + 225 mL de água destilada em liquidificador por 1 min. Após a filtração através de 4 camadas de gaze, o pH da silagem foi medido com um pHmetro digital (Tec3, Tecnal®, Piracicaba, Brasil). Após a obtenção do extrato aquoso da silagem, uma alíquota do extrato aquoso foi centrifugada a $12.000 \times g$ por 20 min e o sobrenadante utilizado para análise dos produtos da fermentação. A concentração de ácido láctico (Pryce, 1969) e amônia (Chaney e Marback, 1962) foi determinada por métodos colorimétricos, utilizando um espectrofotômetro (modelo Janway 147 6305, Marconi, Piracicaba, Brasil) com comprimentos de onda de $\lambda=630$ nm e $\lambda=565$ nm, respectivamente. As concentrações de álcoois, ésteres e acetona foram determinados em um cromatógrafo a gás (Nexis GC-2030, Shimadzu, Kyoto, Japão) com um auto injetor (AOC-20i Plus, Shimadzu, Kyoto, Japão), usando uma coluna capilar Stabilwax, Restek, Bellefonte, PA; 60 m, 0,25 mm Ø, 0,25 µm de ligação cruzada carbowax polietilenoglicol). Os compostos foram identificados com base em seu tempo de retenção e quantificados com padrões externos.

A partir da obtenção do extrato aquoso das silagens, uma segunda alíquota foi diluída em série (10^{-1} a 10^{-6}) em água peptonada estéril a 0,1% para contagens microbianas em meio seletivo (pour-plating). Para o plaqueamento de leveduras e fungos

filamentosos foi utilizado o meio Malt Extract Agar – MEA (M137, Himedia, Mumbai, Índia) acidificado a pH 3,5 com ácido láctico, e as colônias foram contadas, após incubação a 30°C aerobiamente por 24 e 48 h respectivamente. As bactérias ácido lácticas (BAL) foram determinadas em ágar de Man, Rogosa e Sharpe – MRS (7543A, Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) com adição de nistatina (400.000 UI/L) e as colônias foram contadas, após incubação a 35°C aerobiamente por 48 h. Todas as amostras foram preparadas em duplicata e o número de microrganismos foi contado como unidades formadoras de colônias (UFC) foram transformadas e expressas como log10.

Subamostras de ofertado, TMR, sobras e fezes foram desidratadas por 72 h em estufa de ventilação forçada a 60°C e moídas em moinho de faca tipo Wiley (Marconi MA340, Piracicaba, Brasil) com peneira de poro de 1 mm. Subamostras foram utilizadas para determinação do teor de MS a 105°C, cinzas por combustão completa em forno mufla a 600°C por 4 h (método nº 942.05), teor de nitrogênio (N) total pelo método de Kjeldahl, e o teor de PB foi obtido multiplicando o teor de N $\times$ 6,25 (método nº 984.13), e extrato etéreo (EE) foi determinado pelo método Soxhlet (método 963.15) de acordo com AOAC (1990).

A fibra em detergente neutro (FDN) foi analisada com sulfito de sódio e amilase estável ao calor (Mertens, 2002) e a fibra em detergente ácido (FDA, Van Soest, 1967) foi determinada sequencialmente em um Analisador de Fibra (TE-149, Tecnal, Piracicaba, Brasil). O teor de carboidratos não fibrosos foi calculado como CNF = 100 - (PB + FDN + EE + cinzas), (NRC, 2001). A concentração de FDNi foi obtida por incubação *in situ* por 288 h (Huhtanen *et al.*, 1994). A digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) e da FDN (DIVFDN) foi determinada usando uma incubadora Daisy II (Ankom Technology, Macedon, EUA), com soluções preparadas conforme descrito em Tilley e Terry (1963). Amostras de forragem e silagem também foram analisadas para carboidratos solúveis em etanol (Hall *et al.*, 1999). Amostras de forragem, silagem e fezes foram analisadas quanto ao teor de amido segundo (Hall *et al.*, 2015).

Amostras de forragem e silagem foram analisadas quanto ao teor de lignina por métodos de análise gravimétrica e o elemento/composto é separado da amostra: Lignina em detergente ácido (LDA) (Van Soest, 1967); Lignina permanganato de potássio (LPer) (Van Soest e Wine, 1968) com a utilização de ácido sulfúrico. A lignina brometo de acetila (LBA) (Morrison, 1972) é baseado na formação de derivados de acetila em grupos OH não substituídos e substituição de brometo dos grupos OH de carbono para produzir uma solubilização completa da lignina sob condições ácidas. Como não é um método

direto, uma superestimação do conteúdo de lignina pode ocorrer devido à degradação oxidativa de polissacarídeos estruturais (por exemplo, xilanos) durante a incubação da parede celular com a solução ácida.

Os metabólitos sanguíneos foram analisados utilizando kits comerciais de ensaios enzimático colorimétricos para glicose plasmática (Glicose PP, Gold analisa Diagnostico LTDA) e ureia plasmática (Ureia PP, Gold analisa Diagnostico LTDA Belo Horizonte, Brasil) utilizando espectrofotômetro (Bioplus2000®).

Análise estatística

Os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (teste de Bartlett). Com o atendimento dessas pressuposições, os dados foram analisados utilizando o procedimento MIXED do SAS (versão 9.4, SAS Institute, Cary, NC, EUA) considerando delineamento de blocos casualizados adotando-se o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + CV + B_i + T_j + e_{ij}, \text{ em que:}$$

μ = média geral;

CV = covariável (i.e., peso em jejum inicial);

B_i = efeito aleatório de bloco ($i = 1$ a 12);

T_j = efeito fixo de tratamento (j = controle ou benzohidrazida);

e_{ij} : resíduo.

O PV_i foi utilizado como covariável para análise de consumo e medidas corporais. As diferenças foram declaradas significativas se $P \leq 0,05$, e as tendências foram indicadas se $0,05 < P \leq 0,10$.

RESULTADOS

As características das silagens experimentais são apresentadas na Tabela 2. A silagem tratada com a BZD apresentou valores numéricos menores de LDA em relação a

silagem controle, (1,72% vs. 1,96%). Entretanto, as diferenças de valores para as demais medidas de lignina (LPer e LBA) foram de menor magnitude.

A aplicação de BZD não alterou o consumo de MO digestível ($P = 0,280$), os tempos de ingestão ($P = 0,174$), ruminação ($P = 0,332$), mastigação ($P = 0,928$), número de refeições ($P = 0,376$), tamanho de refeição ($P = 0,661$), duração de refeição ($P = 0,181$), duração da primeira refeição ($P = 0,154$) e intervalo de refeições ($P = 0,451$). No entanto, o consumo de MS ($P = 0,039$), o consumo de FDN ($P < 0,001$), o consumo de FDNpd ($P = 0,002$), o consumo de FDNi ($P < 0,001$) e a taxa de ingestão de MS ($P = 0,001$) foram menores para o tratamento BZD (Tabela 3).

O ganho de peso diário e os ganhos de altura de cernelha e de garupa não foram afetados pelos tratamentos ($P \geq 0,307$). Contudo, a eficiência alimentar foi maior ($P = 0,011$) nas novilhas alimentadas com a silagem tratada com BZD (Tabela 4).

A inclusão da BZD na silagem de milho resultou em aumento da digestibilidade no trato total da MS, MO, PB, FDN, FDNpd e CNFem comparação ao CON (Tabela 5). Os valores calculados de NDT, EM, ELm e ELg da dieta e os valores de NDT, ELm e ELg da silagem de milho foram maiores para o tratamento BZD ($P = 0,001$) comparativamente ao CON.

As concentrações de glicose sanguínea ($P = 0,283$) foram semelhantes entre os tratamentos, enquanto a concentração sanguínea de ureia foi menor nos animais alimentados com BZD comparativamente ao CON ($P = 0,009$).

DISCUSSÃO

Manipular a quantidade e a forma de deposição da lignina pode ser uma estratégia para melhorar a digestão de fibra, o desempenho animal e a eficiência produtiva (Jung and Deetz, 1993; Ferraretto and Shaver, 2015; Adesogan *et al.*, 2019). No presente estudo, foi demonstrado pela primeira vez que, a aplicação de BZD, um modulador da síntese de lignina, foi capaz de aumentar a digestibilidade da fibra e aumentar a eficiência alimentar de novilhas em crescimento.

Neste estudo, o CMS foi menor para o tratamento BZD em comparação ao controle, enquanto o consumo de energia metabolizável (CEM) foi semelhante entre os tratamentos. Isso indica que os animais alimentados com a silagem tratada com BZD são capazes de extrair a mesma quantidade de energia de menor quantidade de alimento,

evidenciando maior digestibilidade do alimento e melhor eficiência na utilização dos nutrientes da dieta.

A silagem das plantas de milho que receberam BZD apresentou valores numéricos menores de LDA em relação a silagem CON, enquanto os teores de LBA foram similares. Isso sugere que a concentração total de lignina medida como LBA não foi alterada, mas que a lignina causadora de maior recalcitrância à digestão da fibra (i.e., LDA) foi diminuída (Van Soest, 1994). Estudos pioneiros com LDA já relataram a alta correlação negativa com a digestibilidade da fração fibrosa dos alimentos (Van Soest, 1965). Além de melhorar a digestibilidade da FDN, a BZD também induziu aumento de digestibilidade *in vivo* das frações MS, MO, PB e CNF.

Estudos realizados por Freitas (2018) testando inibidores enzimáticos da via dos fenilpropanoides observou que de maneira geral, os tratamentos aumentaram a digestibilidade sem alterar o conteúdo de LBA. Corroborando com os resultados obtidos nesse experimento com BZD, observou-se aumento na digestibilidade da dieta contendo silagem tratada com a BZD, contudo sem apresentar alteração no conteúdo de LBA, mas com redução na LDA da silagem em 12,2% das plantas tratadas com BZD. A redução da LDA na silagem tratada com BZD pode indicar que esse tratamento alterou uma fração da lignina solúvel ou menos condensada, tornando menos detectável pelo método LDA. Podendo estar relacionada com mudanças estruturais na lignina ou maior manipulação de frações mais acessíveis. Como os métodos LBA e LPer não mostraram diferenças significativas, é possível que a lignina total não tenha sido reduzida, mas redistribuída ou modificada na composição.

Martarello *et al.* (2023) obteve resultados semelhantes em experimentos em escala de campo, em que a pulverização de plantas de milho com o composto benzohidrazida aumentou a sacarificação das folhas e caules do milho, facilitando a utilização, sem afetar o conteúdo médio de LBA. Essa produção normal de compostos fenólicos é vantajosa porque pode explicar o padrão normal de crescimento e desenvolvimento da planta observado, apontando também para o metabolismo de defesa normal (Calvo-Flores *et al.* 2015).

Neste estudo, a aplicação de BZD durante os estágios iniciais do desenvolvimento da planta de milho pode ter alterado a estrutura da lignina na parede celular da planta, pois o conteúdo total de LPer e LBA foi semelhante entre os tratamentos. Tal alteração da lignina deve ter facilitado o ataque de hidrolases microbianas no rúmen.

Consequentemente, a dieta contendo silagem de milho tratada com BZD resultou em aumento de 11% na eficiência alimentar em comparação com CON.

Na meta-análise de Oba e Allen (1999) a digestibilidade *in vitro* ou *in situ* da FDN foi positivamente correlacionada com o desempenho de vacas leiteiras. A cada aumento de um ponto percentual na digestibilidade da FDN, houve incremento de 0,17 kg/d no CMS e 0,25 kg/d na produção de leite.

Em dietas típicas para vacas leiteiras, o aumento de digestibilidade de FDN frequentemente resulta em maior consumo de MS. Dado e Allen (1996) alimentaram vacas em lactação com silagens contendo similar conteúdo de FDN mas com diferentes coeficientes de digestibilidades de FDN. Eles observaram maior CMS para animais alimentados com silagens com maiores coeficientes de digestibilidade. Mertens (1994) em trabalhos realizados observou que o CMS é maximizado quando o CFDN chega a ser de 1,2 % do PV (12,5 g/kg de PV) e que, acima deste valor, o enchimento ruminal limita o consumo. Entretanto, no presente estudo, a dieta mais digestível reduziu o consumo de MS, sem deprimir o consumo de EM. Além disso, o consumo de FDN foi de 1,13% do PV para o tratamento CON e 1,01% do PV para BZD, o que sugere que o CMS não teria sido limitado por características físicas e sim metabólicas.

A regulação do consumo em ruminantes ocorre pela combinação de mecanismos físicos e metabólicos. Enquanto a regulação física limita a ingestão de alimentos em dietas ricas em fibra e de baixa digestibilidade, devido à distensão do trato digestório, a regulação metabólica ocorre em dietas mais digestíveis e em animais com menor demanda de nutrientes, em que o consumo é ajustado pelos níveis de metabólitos no sangue (Mertens, 1994; Allen *et al.*, 2009). Assim, enquanto dietas fibrosas restringem o consumo de nutrientes, dietas mais energéticas levam a regular o consumo para evitar excesso calórico, ajustando a ingestão conforme as demandas nutricionais do animal. No presente estudo a silagem tratada com BZD permitiu ao animal extrair mais energia de cada unidade de MS ingerida. Assim, o consumo deve ter sido regulado pela absorção de combustíveis (i.e., regulação metabólica), e por este motivo o CMS foi menor para o tratamento com BZD. A taxa diária de ganho de peso associada as medidas de altura de garupa e cernelha, também suportam que a ingestão de nutrientes e o crescimento das novilhas foi similar entre os tratamentos.

Embora a concentração plasmática de glicose não tenha sido alterada pelos tratamentos, a concentração de ureia foi reduzida no plasma de novilhas alimentadas com silagem de milho tratada com BZD, sugerindo maior disponibilidade ruminal de energia

e melhor aproveitamento do nitrogênio da dieta (Clark *et al.*, 1992). Novamente, essa observação está de acordo com o aumento da digestibilidade dos nutrientes no trato total, ao aumento da eficiência alimentar e à regulação metabólica do consumo de MS.

Em síntese, a aplicação da BZD mostrou-se eficaz em reduzir o CMS sem comprometer o aporte energético, aumentando a eficiência na utilização dos nutrientes. Sugerindo que a regulação do consumo aconteceu pela melhor absorção de combustíveis no tratamento com a BZD. No entanto, mais estudos são necessários para compreender os mecanismos de ação da BZD sobre a estrutura da lignina e seus efeitos sobre a digestibilidade da planta de milho para silagem.

CONCLUSÃO

A aplicação de benzohidrazida na cultura do milho aumentou a digestibilidade *in vivo* da fibra e da matéria seca, conseqüentemente melhorando o valor nutricional da silagem de milho e eficiência alimentar de novilhas em crescimento.

REFERÊNCIAS

- Adesogan, A. T., Arriola, K. G., Jiang, Y., Oyebade, A., Paula, E. M., Pech-Cervantes, A. A., Vyas, D. 2019. Symposium review: Technologies for improving fiber utilization. *Journal of dairy science*, 102(6), 5726-5755. Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15334>.
- Allen, M. S., Bradford, B. J., Oba, M. 2009. Board-invited review: The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. *Journal of animal science*, 87(10), 3317-3334. Doi: [doi:10.2527/jas.2009-1779](https://doi.org/10.2527/jas.2009-1779).
- A.O.A.C. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15 th Edition, Association of Official Analytical Chemist, Washington DC.
- Bernardes, T. F., Rego, A. C. 2014. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.97, n.3, p.1852-1861.
- Bevans, D. W., Beauchemin, K. A., Schwartzkopf-Genswein, K. S., McKinnon, J. J., McAllister, T. A. 2005. Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. *J. Animal Sci.* 83:1116-1132. <https://doi.org/10.2527/2005.8351116x>.

Calvo-Flores, F. G., Dobado, J. A., Isac-García, J., Martín-Martínez, F. J. 2015. Lignin and lignans as renewable raw materials: chemistry, technology and applications. Wiley, Chichester.

Chaney, A. L., Marbach, E. P. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry*, 8, 130-132.

Clark, J. H., Klusmeyer, T. H., Cameron, M. R. 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *Journal of dairy science*, 75(8), 2304-2323.

Dado, R. G., Allen, M. S. 1996. Ingestão e produção aprimoradas de vacas alimentadas com alfafa ensilada com maior digestibilidade de fibra em detergente neutro. *J. Dairy Sci.* 79:418–428.

Ferraretto, L. F., Shaver, R. D. 2015. Effects of whole-plant corn silage hybrid type on intake, digestion, ruminal fermentation, and lactation performance by dairy cows through a meta-analysis. *Journal of dairy science*, 98(4), 2662-2675. Doi: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-9045>.

Freitas, D. L. D. 2018. Engenharia fisiológica da biomassa lignocelulósica: modificando a parede celular com inibidores enzimáticos da via dos fenilpropanoides.

Hall, M. B., Hoover, W. H., Jennings, J. P., Miller Webster, T. K. 1999. A method for partitioning neutral detergent-soluble carbohydrates. *J Sci Food Agric.*, 79, 2079-2086.

Hall, M. B., Arbaugh, J., Binkerd, K., Carlson, A., Doan, T., Grant, T., Heuer, C., Inerowicz, H. D., Jean-Louis, B., Johnson, R., Jordan, J., Kondratko, D., Maciel, E., McCallum, K., Meyer, D., Odijk, C. A., Parganlija-Ramic, A., Potts, T., Ruiz, L., Snodgrass, S., Taysom, D., Trupia, S., Steinlicht, B., Welch, D. 2015. Determination of dietary starch in animal feeds and pet food by an enzymatic-colorimetric method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 98(2), 397-409.

Huhtanen, P., Kaustell, K., Jaakkola, S. 1994. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. *Anim. Feed Sci. Technol*, 48, 211–227. Doi: 10.1016/0377- 8401(94)90173-2.

Jung, H. G., Deetz, D. A. 1993. Cell wall lignification and degradability. In: *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, Wis., 315–340. Doi: <https://doi.org/10.2134/1993.foragecellwall>.

Martarello, D. C. I., Tonete-Diniz, D. C., Gonzaga, D. E. R., Almeida, A. M., Constantin, R. P., da Silva, K. G., dos Santos, W. D. 2023. Tratar plantas de milho com benzohidrazida aumenta a sacarificação da lignocelulose: uma abordagem não transgênica para melhorar a produção de etanol celulósico. *Conversão de Biomassa e Biorrefinaria*, 1-12.

Mertens, D. 1994. Regulation of forage intake. Forage quality, evaluation, and utilization, 450-493.

Mertens, D. R. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. J. AOAC Int, 85, 1217-1240.

Morrison, I. M. 1972. Improvements in the Acetyl Bromide Technique to Determine Lignin and Digestibility and its Application to Legumes. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 23, p. 1463–1469.

NRC. 1984. Nutrient requirements of beef cattle. 6. ed. Washington. D.C. 90p.

NRC. 2001. Nutrient Requirements of dairy cattle. 7 th ver. Ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

Oba, M., Allen, M. S. 1999. Avaliação da importância da digestibilidade da fibra em detergente neutro da forragem: efeitos na ingestão de matéria seca e na produção de leite de vacas leiteiras. Journal of dairy science, 82 (3), 589-596.

Pereira, M. N., Von Pinho, R. G., Bruno, R. G. D. S., Calestine, G. A. 2004. Ruminant degradability of hard or soft texture corn grain at three maturity stages. Scientia Agricola, Maringá. v.61, n.4, p.358-363.

Pryce, J. D. 1969. A modification of Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. Analyst. 94:1151-1152. Doi: 10.1039/an9699401151.

Robinson, P. H., McQueen, R. E. 1997. Influência do nível de alocação de concentrado e fermentabilidade da fibra forrageira no comportamento de mastigação e produção de vacas leiteiras. Journal of Dairy Science, 80 (4), 681-691.

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., Murphy, A. 2017. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. Artmed Editora. 6. ed. Porto Alegre. SBN: 978-85-8271-367-9.

Tilley, J. M. A., Terry, D. R. 1963. Uma técnica de dois estágios para a digestão in vitro de culturas forrageiras. Grass and Forage Science, 18 (2), 104-111.

Van Soest, P. J., Wine, R. H. 1967. Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds, IV. Determination of Plant Cell-Wall Constituents. Journal of Association of Official Analytical Chemists, 50, 50-55. Doi: <https://doi.org/10.1093/jaoac/50.1.50>.

Van Soest, P. J., Moore, L. A. 1965. Novos métodos químicos para análise de forragens com o objetivo de prever o valor nutritivo.

Van soest, P. J. 1967. Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forages. Journal of Animal Science, v.26, p.119-128.

Van Soest, P. J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant (2. Ed.). Ithaca, US: Cornell University Press, 476.

Wildman, E. E., Jones, G. M., Wagner, P. E., Boman, R. L., Troutt Jr, H. F., Lesch, T. N. 1982. Um sistema de pontuação da condição corporal de vacas leiteiras e sua relação com características de produção selecionadas. *Journal of dairy science*, 65 (3), 495-501.

TABELAS

Tabela 1. Composição nutricional das dietas experimentais.

Item	Tratamentos ¹	
	CON	BZD
<i>Ingredientes, %MS</i>		
Silagem de milho	84,5	84,5
Farelo de soja	12,9	12,9
Ureia	0,400	0,400
Premix mineral-vitamínico	2,20	2,20
<i>Nutrientes %MS</i>		
Matéria seca	35,1 ± 0,86	35,4 ± 1,23
Matéria mineral	6,66 ± 0,216	6,30 ± 0,600
Extrato etéreo	2,79 ± 0,041	2,72 ± 0,017
Proteína bruta	12,9 ± 0,43	12,8 ± 0,13
Fibra em detergente neutro	37,0 ± 4,82	37,6 ± 0,65
Amido	23,5 ± 0,18	23,7 ± 0,68
Carboidratos não fibrosos	40,6 ± 0,05	40,6 ± 0,05

¹CON: Controle; BZD: Benzohidrazida.

Tabela 2. Características das silagens de milho experimentais.

Item ²	Silagem ¹	
	CON	BZD
MS, % MN	32,0 ± 0,76	31,9 ± 0,99
MM, % MS	4,01 ± 0,550	3,58 ± 0,272
EE, % MS	2,89 ± 0,319	2,82 ± 0,293
PB, % MS	7,23 ± 0,261	7,16 ± 0,209
FDN, % MS	40,5 ± 4,27	41,0 ± 2,02
FDA, % MS	20,7 ± 2,63	21,1 ± 1,14
LDA, % MS	1,96 ± 0,124	1,72 ± 0,197
LDA, % FDN	4,96 ± 0,622	4,26 ± 0,911
LPer, % MS	18,8 ± 1,53	18,6 ± 0,64
LPer, % FDN	45,6 ± 1,86	45,3 ± 1,68
LBA, % MS	8,03 ± 1,139	7,97 ± 0,990
LBA, % FDN	20,2 ± 3,06	20,0 ± 2,60
FDNi, % MS	16,0 ± 1,77	16,5 ± 1,29
FDNi, % FDN	40,1 ± 7,69	40,4 ± 3,18
FDNpd, % MS	23,4 ± 4,74	23,9 ± 1,33
FDNpd, % FDN	58,1 ± 6,19	59,2 ± 3,20
CSE, % MS	2,62 ± 0,445	2,71 ± 0,450
Amido, % MS	32,5 ± 1,73	34,4 ± 0,97
CNF, % MS	45,4 ± 4,30	45,5 ± 2,00
pH	3,81 ± 0,140	3,83 ± 0,108
Bactérias lácticas, log ufc/g MN	6,63 ± 0,578	7,20 ± 0,518
Leveduras, log ufc/g MN	2,49 ± 2,084	2,51 ± 1,999
Fungos filamentosos, log ufc/g MN	3,90 ± 0,457	3,58 ± 0,621
N-NH ₃ , % N	5,12 ± 0,764	4,98 ± 0,955
Ácido láctico, % MS	7,59 ± 0,728	7,41 ± 0,382
Ácido acético, % MS	1,54 ± 0,377	1,67 ± 0,189
Etanol, % MS	0,862 ± 0,332	0,788 ± 0,126
2,3-Butanodiol, % MS	0,208 ± 0,040	0,205 ± 0,034
1,2-Propanodiol, % MS	0,163 ± 0,108	0,163 ± 0,134
Densidade, kg MN/m ³	580 ± 125,2	581 ± 100,4

¹CON: Controle; BZD: Benzohidrazida.

²MS: Matéria seca; MM: Matéria mineral; EE: Extrato etéreo; PB: Proteína bruta; FDN: Fibra em detergente neutro; FDA: Fibra em detergente ácido; LDA: Lignina em detergente ácido; LPer: Lignina em permanganato de potássio; LBA: Lignina em brometo de acetila; FDNi: Fibra em detergente neutro indigestível; FDNpd: Fibra em detergente neutro potencialmente digestível; CSE: Carboidratos solúveis em etanol; CNF: Carboidrato não fibroso.

Tabela 3. Consumo e comportamento ingestivo em novilhas leiteiras alimentadas com silagem de milho tratada com benzohidrazida.

Item ²	Tratamento ¹		EPM ³	P-valor
	CON	BZD		
CMS, kg/d	11,0	10,2	0,23	0,039
CMS, kg/100 kg PV	3,09	2,88	0,064	0,037
CMOd, kg/d	6,33	6,19	0,159	0,280
CMOd, kg/100 kg PV	1,77	1,73	0,043	0,305
CFDN, kg/d	4,00	3,59	0,129	<0,001
CFDN, kg/100 kg PV	1,13	1,01	0,035	<0,001
CFDNpd, kg/d	2,37	2,20	0,077	0,002
CFDNpd, kg/100 kg PV	0,668	0,618	0,021	<0,001
CFDNi, kg/d	1,63	1,39	0,053	<0,001
CFDNi, kg/100 kg PV	0,457	0,387	0,014	<0,001
Ingestão, min/d	286	299	12,1	0,174
Ingestão, min/kg MS	30,0	30,4	1,50	0,870
Ingestão, min/kg FDN	78,7	81,7	3,80	0,573
Ruminação, min/d	531	519	8,6	0,332
Ruminação, min/kg MS	54,3	55,5	0,94	0,364
Ruminação, min/kg FDN	143	144	2,2	0,873
Mastigação, min/d	806	807	10,5	0,928
Mastigação, min/kg MS	84,4	85,9	2,04	0,599
Mastigação, min/kg FDN	222	222	5,0	0,998
Taxa de ingestão, g MS/min	38,1	34,1	1,54	0,001
Nº refeições, /d	9,49	9,10	0,310	0,376
Tamanho de refeição, kg MS/ refeição	1,26	1,23	0,043	0,661
Duração de refeição, min/ refeição	31,1	32,8	1,29	0,181
Duração da primeira refeição, min	99	109	10,0	0,154
Intervalo de refeição, min	130	135	5,0	0,451

¹CON: Controle; BZD: Benzohidrazida.

²CMS: Consumo de matéria seca; CMOd: Consumo de matéria orgânica digestível; CFDN: Consumo de fibra em detergente neutro; CFDNpd: Consumo de fibra em detergente neutro potencialmente digestível; CFDNi: Consumo de fibra em detergente neutro indigestível.

³EPM: Erro padrão da média.

Tabela 4. Desempenho de novilhas leiteiras alimentadas com silagem de milho tratada com benzohidrazida.

Item ²	Tratamento ¹		EPM ³	P-valor
	CON	BZD		
PV inicial, kg	334	333	7,6	0,944
PV final, kg	397	401	8,6	0,800
GMD, kg/d	1,32	1,38	0,042	0,343
Eficiência alimentar	0,128	0,142	0,003	0,011
ACi, cm	126	127	1,1	0,926
ACf, cm	130	130	1,3	0,964
GAC, cm/d	0,0691	0,0690	0,009	0,997
AGi, cm	128	130	1,3	0,430
AGf, cm	135	135	1,1	0,785
GAG, cm/d	0,137	0,113	0,016	0,307

¹CON: Controle; BZD: Benzohidrazida.

²PV: Peso vivo; GMD: Ganho médio diário; ACi: altura de cernelha inicial; ACf: altura de cernelha final; GAC: Ganho de altura de cernelha; AGi: altura de garupa inicial; AGf: altura de garupa final; GAG: Ganho de altura de garupa.

³EPM: Erro padrão da média.

Tabela 5. Digestibilidade aparente de nutrientes no trato total, energia da dieta e da silagem e parâmetros sanguíneos de novilhas leiteiras alimentadas com silagem de milho tratada com benzohidrazida.

Item	Tratamento ¹		EPM ²	P-valor
	CON	BZD		
<i>Digestibilidade aparente³, %</i>				
MS	58,4	61,9	0,59	<0,001
MO	61,0	64,4	0,67	<0,001
EE	81,4	82,3	1,70	0,419
PB	52,7	55,8	0,48	<0,001
FDN	34,0	37,5	1,43	0,002
FDNpd	58,1	62,1	1,34	0,044
AMIDO	98,6	98,9	0,30	0,139
CNF	86,9	88,8	0,87	0,002
Escore fecal	3,02	3,10	0,086	0,520
Teor de MS das fezes, % MN	13,7	14,0	0,12	0,053
<i>Energia da dieta e da silagem⁴</i>				
ELm dieta, Mcal/kg MS	1,54	1,67	0,021	0,001
ELg dieta, Mcal/kg MS	0,945	1,06	0,019	0,001
NDT dieta, %	67,2	71,4	0,70	0,001
EM dieta, Mcal/kg MS	2,43	2,59	0,025	0,001
Consumo de EM, Mcal/d	26,7	26,6	0,65	0,931
NDT silagem de milho, %	67,0	71,9	0,82	0,001
ELm silagem de milho, Mcal/kg MS	1,52	1,67	0,025	0,001
ELg silagem de milho, Mcal/kg MS	0,914	1,05	0,021	0,001
<i>Parâmetros sanguíneos</i>				
Glicose, mg/dL	67,3	69,7	3,61	0,283
Ureia, mg/dL	25,1	22,7	1,29	0,009

¹CON: Controle; BZD: Benzohidrazida.

²EPM: Erro padrão da média.

³MS: Matéria seca; MO: Matéria orgânica; EE: Extrato etéreo; PB: Proteína bruta; FDN: Fibra em detergente neutro; FDNpd: Fibra em detergente neutro potencialmente digestível; CNF: Carboidrato não fibroso.

⁴ELm: Energia líquida de manutenção; ELg: Energia líquida de ganho; NDT: Nutrientes digestíveis totais; EM: Energia metabolizável.