

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

Larissa Luísa Schumacher

**EFEITO DO PERÍODO DE CONSERVAÇÃO SOBRE A COMPOSIÇÃO
QUÍMICA E A CONCENTRAÇÃO DE MICOTOXINAS EM SILAGEM
DE SORGO DE PLANTA INTEIRA**

Santa Maria, RS
2021

Larissa Luísa Schumacher

**EFEITO DO PERÍODO DE CONSERVAÇÃO SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA
E A CONCENTRAÇÃO DE MICOTOXINAS EM SILAGEM DE SORGO DE
PLANTA INTEIRA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de concentração em Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Zootecnia**.

Orientador: Prof. Dr. Julio Viégas

Santa Maria, RS
2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Schumacher, Larissa Luísa

Efeito do período de conservação sobre a composição química e a concentração de micotoxinas em silagem de sorgo de planta inteira / Larissa Luísa Schumacher.- 2021.
92 p.; 30 cm

Orientador: Julio Viégas
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Zootecnia, RS, 2021

1. Carboidratos 2. Forragem conservada 3. Partição 4. Perdas nutricionais 5. Proteínas I. Viégas, Julio II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, LARISSA LUÍSA SCHUMACHER, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Larissa Luísa Schumacher

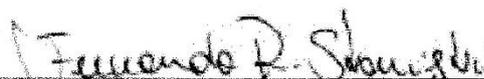
**EFEITO DO PERÍODO DE CONSERVAÇÃO SOBRE A COMPOSIÇÃO
QUÍMICA E A CONCENTRAÇÃO DE MICOTOXINAS EM SILAGEM DE
SORGO DE PLANTA INTEIRA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de concentração em Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Zootecnia**.

Aprovado em 03 de setembro de 2021:



Julio Viégas, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Fernando Reimann Skonieski, Dr. (UTFPR) - Parecer



Tiago Antonio Del Vale, Dr. (UFSM) - Parecer

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Walter e minha mãe Laci, por todo apoio, incentivo, vocês são meus exemplos de vida.

As minhas irmãs Greice e Stéfani, pelo incentivo e motivação, são meus exemplos de determinação.

Ao meu amor Gilmar, por todo amor, lealdade, compreensão, apoio e incentivo, és meu exemplo de coragem.

A todos os familiares, amigos e mestres, que torcem por mim e que me acompanharam até aqui.

A VOCÊS EU DEDICO!

AGRADECIMENTOS

À Deus, à minha Nossa Senhora da Medianeira e Aparecida, por abençoar e iluminar minha caminhada com muita força e sabedoria.

Agradecimento especial aos meus pais Walter e Laci, por todo amor, educação, ensinamentos, apoio e incentivo. Obrigada por sempre estarem ao meu lado em todas as minhas escolhas e conquistas. Amo vocês! As minhas irmãs Greice e Stéfani, pelo companheirismo, cumplicidade, palavras de incentivo e apoio. As palavras não são suficientes para dizer a quão grata eu sou por ter vocês em minha vida, por serem minha família. Eu amo vocês.

Aos meus queridos avós, vovós Neli e Lúcia (*in memoriam*, vovôs Paulo e Alfonso), obrigada pelos ensinamentos, incentivos e orações.

Ao meu cunhado Jonas, és mais que um cunhado e sim como irmão. Também agradecimento especial, aos meus cunhados Éder, Gilceu, Edília, obrigada pelo incentivo constante, palavras de apoio, carinho e amizade.

À minha sogra Araci, obrigada pelo incentivo, dedicação, orações constantes, palavras de apoio e pela torcida das minhas conquistas.

Em especial, ao meu marido Gilmar!! Obrigada por me incentivar tanto e acreditar no meu potencial. Meu amor, te agradeço por todo amor, carinho, dedicação, paciência e confiança. Eu amo muito você!!

Esta conquista é nossa!

Agradeço imensamente ao meu orientador prof. Julio Viégas, por acreditar em mim, obrigada pelos ensinamentos, conselhos e oportunidades. Obrigada pela amizade e por participar no enriquecimento da minha formação profissional.

Aos estagiários (as), mestres e doutores, em especial Tiago e Stela, que me apoiaram no meu crescimento profissional, pelas discussões científicas, conversas e descontração.

À Universidade Federal de Santa Maria, por fazer parte do corpo de discentes, à CAPES, pela bolsa de estudos concedida. Também aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pelos ensinamentos.

Agradecimento especial ao laboratório LAMIC, pela parceria concedida a realização das análises de micotoxinas. Também, aos laboratórios LABRUMEN, tecnologia de alimentos e piscicultura, pelo apoio e parceria na realização das demais análises tão importantes para a realização deste trabalho.

Aos meus queridos amigos, em especial Daniele Alves, Kelly e Vanessa obrigada pelo incentivo, torcida e entenderem que nem sempre foi possível estar por perto.

A todos que não foram citados aqui, mas de alguma maneira contribuíram para a idealização deste projeto.

Minha gratidão eterna!

RESUMO

EFEITO DO PERÍODO DE CONSERVAÇÃO SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA E A CONCENTRAÇÃO DE MICOTOXINAS EM SILAGEM DE SORGO DE PLANTA INTEIRA

AUTORA: Larissa Luísa Schumacher

ORIENTADOR: Julio Viégas

Este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito do tempo de conservação sobre o perfil fermentativo, perdas fermentativas, composição química, fracionamento de carboidratos, fracionamento de proteínas, produção *in vitro* e a concentração de micotoxinas em silagem de planta inteira de sorgo (SSPI). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (45, 90, 180, 360 dias de conservação) e quatro repetições cada. O tempo de conservação alterou os produtos de fermentação, no qual, os ácidos láctico e acético demonstraram sua concentração máxima aos 218 e 163 dias, respectivamente. O ácido propiônico e butírico aumentaram linearmente ao longo do tempo. O teor de matéria seca reduziu $0,01072 \text{ g kg}^{-1}$ por dia de conservação, o pH apresentou seu pico aos 26 dias, enquanto que o nitrogênio amoniacal demonstrou aumento linear de $0,08700 \text{ g kg}^{-1}$ a cada dia a mais de conservação. As perdas por efluentes aumentaram, na ordem de $0,0036 \text{ g kg}^{-1}$ por dia de conservação, enquanto que as perdas por gases apresentaram comportamento quadrático. Os carboidratos não fibrosos apresentaram concentração mínima aos 207 dias de conservação. Houve diminuição nas frações CA4, CB1, CB2 e CB3, afetando negativamente o teor glicídico da silagem de sorgo à medida que avançou a tempo de conservação. Em relação ao fracionamento proteico, PBA, PB2 e PB3 aumentaram, enquanto que PBC reduziu com o avançar do tempo de estocagem, diminuindo desta forma a parte indigestível proteica da silagem. Para os parâmetros cinéticos o volume final, produção de gás (PG) 24h, PG 48h e PG 96h apresentaram comportamento quadrático decrescente. A taxa de degradação e DEGMS_48h aumentaram linearmente e o tempo necessário para atingir a metade da produção máxima de gás, diminuiu linearmente a cada dia de conservação. A temperatura do silo demonstrou crescimento linear positivo em relação ao período de conservação. Não observamos efeito do tempo sobre ($P > 0,05$) a PMS e PNDT, mas houve alteração para PFDN com redução linear e a PPB com aumento linear. As micotoxinas FUMO e AFLA, permaneceram abaixo dos limites de ocorrência nas amostras pré-ensilado e ao longo do período de conservação. A concentração de ZEA demonstrou comportamento quadrático, enquanto DON aumentou linearmente até os 360 dias avaliados. Observou-se correlação negativa de DON com MS, PFDN e PNDT e positiva com temperatura do silo. Já ZEA correlacionou-se positivamente com ácido propiônico, ácido butírico e negativamente com PNDT. Dois modelos de predição foram gerados, em que a temperatura do silo e o teor de MS foram responsáveis por 91% e 38% da variação da concentração de DON. Desta forma, observamos que à medida que aumenta o período de estocagem, mudanças relevantes acontecem. Além disso, o processo de fermentação não é capaz de atenuar a ocorrência de DON e ZEA na silagem da planta inteira de sorgo.

Palavras-chave: Carboidratos. Forragem conservada. Partição. Perdas nutricionais. Proteínas. Toxinas. Valor nutricional.

ABSTRACT

EFFECT OF THE STORAGE PERIOD ON THE CHEMICAL COMPOSITION AND CONCENTRATION OF MYCOTOXINS IN WHOLE PLANT SORGHUM SILAGE

AUTHOR: Larissa Luísa Schumacher

ADVISOR: Julio Viégas

This research was conducted in order to evaluate the effect of different storage periods on fermentation profile, nutritional value, in vitro fermentation, carbohydrate fractionation, protein fractionation, anaerobic losses, and the mycotoxins in whole-plant sorghum silage (WPSS). The experimental design used was completely randomized, with four treatments (45, 90, 180, 360 days of conservation) and four replications each. The storage period affected fermentation profile, in which the lactic and acetic acids showed their maximum concentration at 218 and 163 days, respectively. Propionic and butyric acid increased linearly over time. The dry matter content reduced $0.01072 \text{ g kg}^{-1}$ per day of storage, the pH peaked at 26 days, while ammonia nitrogen showed a linear increase of $0.08700 \text{ g kg}^{-1}$ for each day of storage. Effluent losses increased, in the order of 0.0036 g kg^{-1} per day of conservation, while gas losses showed a quadratic behavior. Non-fibrous carbohydrates showed a minimum concentration at 207 days of storage. There was a decrease in the fractions CA4, CB1, CB2 and CB3, negatively affecting the glycidic content of sorghum silage as the storage time progressed. Regarding protein fractionation, PBA, PB2 and PB3 increased, while PBC decreased with storage time, thus reducing the indigestible protein portion of the silage. For the kinetic parameters, the final volume, gas production (PG) 24h, PG 48h and PG 96h presented a quadratic decreasing behavior. The degradation rate increased linearly and the time needed to reach half of the maximum gas production and DEGDM_48h linearly decreases with each day of conservation. The silo temperature showed positive linear growth in relation to the conservation period. We did not observe time effect on ($P>0.05$) PMS and PNDT, but there was change for PFDN with linear reduction and PPB with linear increase. FUMO and AFLA mycotoxins remained below detection limits in pre-ensiled samples and throughout the conservation period. The ZEA concentration showed a quadratic behavior, while DON linearly increased up to the 360 days evaluated. A negative correlation of DON with MS, PFDN and PNDT and positive with silo and ambient temperature was observed. ZEA was positively correlated with propionic acid, butyric acid and negatively correlated with PNDT. Two prediction models were generated, in which silo temperature and DM content accounted for 91% and 38% of the variation in DON concentration. Thus, we observe that as the storage period increases, relevant changes occur. Furthermore, the fermentation process is not able to attenuate the occurrence of DON and ZEA in the silage of the whole sorghum plant.

Keywords: Carbohydrates. Preserved forage. Partition. Nutritional losses. Proteins. Toxins. Nutritional value.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figura 1 – Produção cumulativa de gás *in vitro* (ml g⁻¹ de MO), ao longo de 96 horas de incubação de silagens de planta inteira de sorgo submetidas à diferentes tempos de estocagem.....51

ARTIGO 2

Figura 1 – Concentração das micotoxinas Desoxinivalenol (a) e Zearalenona (b) em amostras frescas (dia 0) silagens de sorgo de planta inteira, submetidas a distintos períodos de conservação69

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 – Parâmetros fermentativos e perdas de silagens de planta inteira de sorgo, submetidas à diferentes tempos de conservação.....	47
Tabela 2 – Carboidratos totais (CHO), carboidratos não fibrosos (CNF) e fracionamento glicídico em silagens de sorgo de planta inteira submetido a diferentes tempos de conservação.....	49
Tabela 3 – Proteína bruta e fracionamento nitrogenado em silagens de sorgo de planta inteira submetido à diferentes tempos de conservação.....	50
Tabela 4 – Volume de gás produzido em diferentes tempos de incubação, parâmetros da cinética de degradação <i>in vitro</i> e digestibilidade <i>in vitro</i> das silagens de sorgo de planta inteira à submetidos a diferentes tempos de conservação.....	51

ARTIGO 2

Tabela 1 – Produtos de fermentação e parâmetros físicos de silagens de sorgo de planta inteira, submetidas a distintos períodos de conservação	68
Tabela 2 – Perdas nutricionais anaeróbicas ao longo do tempo de conservação em silagens de sorgo de planta inteira, submetidas a distintos períodos de conservação	69
Tabela 3 – Correlação Simples de Pearson entre a composição química, física, perdas nutricionais e as micotoxinas do gênero <i>Fusarium</i>	70
Tabela 4 – Equação de predição da micotoxina desoxinivalenol (DON) a partir da temperatura do silo (temp silo) e matéria seca (MS).....	71

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	HIPÓTESES	12
1.2	OBJETIVOS	12
1.2.1	Objetivos gerais	12
1.2.2	Objetivos específicos	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	SORGO	14
2.2	PRINCÍPIOS BÁSICOS DA ENSILAGEM E SILAGEM DE SORGO	16
2.3	INFLUÊNCIA DO TEMPO DE CONSERVAÇÃO SOBRE A SILAGEM.....	20
2.4	FATORES QUE PREDISPÕE A PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS	25
2.4.1	Aflatoxina (AFLA)	29
2.4.2	Zearalenona (ZEA)	32
2.4.3	Fumonisina (FUMO).....	36
2.4.4	Desoxinivalenol (DON)	38
3	CAPÍTULO I – TEMPO DE CONSERVAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DE SILAGENS DE SORGO DE PLANTA INTEIRA	41
4	CAPÍTULO II – EFEITO DO TEMPO DE CONSERVAÇÃO SOBRE AS PERDAS ANAERÓBICAS E PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS EM SILAGEM DE SORGO DE PLANTA INTEIRA	62
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a intensificação e tecnificação dos sistemas de produção, tanto de carne quanto de leite, faz crescer a demanda por volumoso de boa qualidade para atender os índices zootécnicos do rebanho, além de maximizar o potencial genético dos animais (RODRIGUES, 2014). Nesse contexto, a utilização de alimentos conservados, como a silagem de sorgo, é uma importante opção forrageira para atender a demanda nutricional de energia e fibra de bovinos leiteiros ao longo de todo o ano (ALBUQUERQUE et al., 2013; DANIEL et al., 2019).

Embora a técnica de ensilagem seja considerada um método clássico de conservação, a avaliação das mudanças e transformações bioquímicas que ocorrem desde o momento da ensilagem até a obtenção do produto final, vêm sendo objeto de estudos por muitos pesquisadores. Neste sentido, foi observado que o processo de ensilagem não se estabiliza totalmente após cerca de três semanas (MCDONALDS et al., 1991) e sim, a intensa fermentação apenas desacelera, ocasionando, desta forma, mudanças microbiológicas na composição química e na degradabilidade, de forma constante (DER BEDROSIAN et al., 2012; FERRARETO et al., 2015; KUNG, 2013).

Para Ferraretto et al. (2015) as maiores vantagens em prolongar o tempo de conservação são a melhora na digestibilidade do amido e matéria seca, aumento do nitrogênio amoniacal e da fração da proteína solúvel. Em contrapartida, pouco ou nenhum efeito ocorre na digestibilidade da fibra e geralmente, há decréscimo nas frações de carboidratos solúveis (FERRARETO; SHAVER, 2012; FERNANDES et al., 2020). Tais situações são ocasionadas, principalmente, pela solubilização e degradação no silo por parte das proteases bacterianas e enzimáticas (JUNGES et al., 2017).

Ademais, durante todas as fases que compreendem o processo de conservação, sendo eles durante a colheita, transporte e armazenamento, o volumoso pode ser contaminado por fungos filamentosos como *Fusarium* e *Aspergillus*, produtores, entre outras, de micotoxinas, como a aflatoxina (AFLA), desoxinivalenol (DON), fumonisina (FUMO) e zearalenona (ZEA) (ALONSO et al., 2013). A ocorrência de micotoxinas e a sua co-ocorrência em silagem, pode resultar em graves consequências negativas, como a diminuição no desempenho ruminal, reprodutivo, produtivo, ocasionando ainda, sério risco de saúde pública (GALLO et al., 2015). Também, pode provocar um leve aumento no pH e na temperatura do silo, intensificando as perdas de nutrientes durante o processo de conservação anaeróbia (SANTOS et al., 2019; UDÉN, 2017).

Neste sentido, predizer com maior eficiência o valor nutricional, mensurar as alterações que o maior tempo de conservação pode ocasionar nas frações que compõem a proteína e os carboidratos da silagem de planta inteira de sorgo (SSPI) se torna fundamental (CNCPS, 2002; LANZAS et al., 2007; LICITRA et al., 1996). Ao mesmo tempo, as informações geradas podem estimar com maior precisão a dieta de bovinos leiteiros conforme a abertura do silo, melhorando desta forma, a eficiência alimentar e a maximização da produção.

Com base nestas considerações, o trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito dos distintos tempos de conservação (45, 90, 180 e 360 dias) sobre a partição proteica e glicídica, cinética de degradação *in vitro*, perdas nutricionais anaeróbicas e a ocorrência de micotoxinas antes e durante o período de conservação.

1.1 HIPÓTESES

Silagens da planta inteira de sorgo apresentam modificações em sua composição nutricional quando submetidas há diferentes tempos de conservação.

Micotoxinas são detectadas na fase de pré-fermentação. Durante os distintos períodos de conservação a concentração de algumas micotoxinas são potencializadas.

Ocorre associação entre a concentração de micotoxinas com as perdas anaeróbicas ao longo do tempo de conservação.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivos gerais

Avaliar o efeito do tempo de conservação da silagem da planta inteira de sorgo sobre parâmetros cinéticos de fermentação, fracionamento de proteínas e de carboidratos.

Mensurar a ocorrência e quantificar a concentração de aflatoxinas, zearalenona, fumonisina e deoxinivalenol em amostras de silagem da planta inteira de sorgo submetidos a diferentes tempos de conservação.

1.2.2 Objetivos específicos

Avaliar as modificações nutricionais ocorridas através dos diferentes tempos de conservação.

Mensurar as perdas nutricionais durante o período anaeróbio.

Detectar e quantificar aflatoxinas, zearalenona, fumonisina e desoxinivalenol nas amostras pré e pós-fermentação (pela metodologia de cromatografia e ELISA).

Avaliar a influência do tempo de conservação sobre a ocorrência de micotoxinas.

Correlacionar os resultados obtidos com as perdas nutricionais anaeróbias com a concentração de micotoxinas.

Desenvolver modelos matemáticos de predição.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SORGO

A cultura do sorgo (*Sorghum bicolor* Moench L), originária do continente Africano e parte da Ásia, expandiu-se para as outras áreas do mundo a partir do século XIX (FAO, 2014). Sua introdução é dita como recente nas Américas, no qual, foi trazida pelos escravos africanos. Sendo que no Brasil, o melhoramento dos híbridos iniciou-se no século XX. Atualmente, o sorgo ocupa entre os cereais, o quinto lugar em área cultivada no mundo, superado apenas pelo trigo, arroz, milho e cevada (HAMZA et al., 2016; ZHONG et al., 2016).

O cereal é muito consumido em países da África e da Ásia, considerado como alimento básico para milhões de pessoas, suprimindo cerca de 70% da ingestão calórica diária (ANUNCIACÃO et al., 2017). Entretanto, no Brasil, a produção de sorgo é utilizada internamente quase de forma exclusiva para a alimentação animal na elaboração de concentrado e forragem conservada. O cereal vem recebendo destaque, por registrar produções elevadas de 2,5 milhões de toneladas de grãos na safra de 2019/20, em que o maior produtor do grão é o estado de Goiás, com o volume estimado em 1,098 milhão de toneladas para a safra de 2019/20 (CONAB, 2020).

Pertencente à família Poaceae, o sorgo possui metabolismo de fixação de carbono do tipo C-4, envolvendo alta eficiência na utilização solar para conversão de dióxido de carbono (CO₂) em fotoassimilados, sendo que seu florescimento ocorre em noites longas (MAGALHÃES et al., 2003; PEREIRA FILHO et al., 2013). Apresenta características xerófilas, ou seja, mecanismos eficientes de tolerância à seca e baixa fertilidade. Segundo Ferreira (2015), esta resistência se deve, entre outros fatores, ao sistema radicular profundo, ramificado e extenso, o que possibilita à planta explorar o solo em maior volume e ser mais eficiente na extração e utilização de água do solo. Ainda, dispõe de menor superfície foliar, ocasionando perdas de água por transpirações inferiores, quando comparado ao milho (MAGALHÃES et al., 2003).

Pelas recomendações da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), quanto a semeadura, o ciclo de desenvolvimento e a colheita do sorgo respeitam ao calendário que varia em cada região e estado brasileiro, o sorgo pode apresentar índices elevados de produtividade. Além da possibilidade de se cultivar a rebrota e apresentar valor nutricional semelhante ao primeiro corte (BERNARD; TAO, 2015). Quanto a finalidade produtiva, as cultivares de sorgo são classificadas em quatro grupos: graníferas; forrageiras para silagem; forrageiras para

pastejo e vassoura (GETACHEW et al., 2016). Historicamente, o sorgo convencional é conhecido na literatura por apresentar maiores concentrações de fibras indigestíveis, em destaque a lignina, no qual proporciona digestibilidades inferiores.

Além das características supracitadas, a planta de sorgo possui uma certa capacidade de resistir ao ataque de fungos, devido às propriedades químicas e físicas do grão. Sendo que esta proteção é devida a constituição da matriz proteica do grão, envolvendo os grânulos de amido do sorgo. De maneira geral, a matriz proteica é composta, principalmente por prolaminas, albuminas e globulinas, sendo que no grão de sorgo as prolaminas são chamadas de kafarinas. Ademias, o grão possui característica de ser mais densa, menos digestível e hidrofóbica, incluindo uma alta proporção de endosperma venoso e farináceo e uma espessa camada de cera presente tanto nos grãos como folhas e colmo (HOLDING, 2014).

A planta de sorgo apresenta concentrações significativas de vários compostos fenólicos. Estes, são produtos do metabolismo secundário nas plantas, proporcionando funções essenciais na reprodução e no crescimento, atuando como uma defesa química contra a radiação ultravioleta, herbívoros, fungos, e outros microrganismos epifíticos (BUSO et al., 2011). Os compostos fenólicos existentes no sorgo constituem-se de ácidos fenólicos, no qual, inclui os taninos e flavonóides (AWIKA; ROONEY, 2004).

Os taninos, são do tipo condensados, conhecidos como proantocianidinas, apresentando em sua constituição alto peso molecular (DYKES; ROONEY, 2006). São capazes de se complexar com celulose, lipídios, aminoácidos e ácidos nucleicos, tornando-se mais resistente ao ataque microbiano no silo e no rúmen. Entretanto na nutrição de ruminantes, os taninos não apresentam somente efeitos negativos ou deletérios, pois quando ingeridos em doses baixas (2 a 4% na MS), podem ocasionar efeitos benéficos, sendo estes efeitos, atribuídos a redução da proteólise ruminal sobre a proteína dietética, funcionando com um by-pass, resultando em aumento do fluxo de aminoácidos para o intestino delgado (MIN et al., 2003).

Zhang et al. (2015) demonstraram que dietas contendo concentrações moderadas de tanino, podem reduzir a produção de metano (CH₄). Porém, concentração elevada é capaz de reduzir a digestibilidade da proteína e da fibra da dieta, acarretando efeitos negativos ao desempenho animal (GETACHEW et al., 2016). Resultados promissores são relatadas por Costa et al. (2016) sobre a melhora na degradabilidade ruminal da matéria seca e da fração fibrosa comparando sorgo sem tanino com sorgo convencional, ocasionando respostas superiores em produtividade.

Para melhorar características indesejáveis na planta de sorgo, é crescente o interesse nas abordagens químicas e genéticas para melhorar a digestibilidade da fibra e do amido. Nesta

perspectiva, foi desenvolvido a variedade de sorgo BMR (brown mibrib), no qual, recebeu tratamento nas sementes com di-etil sulfeto, ocasionando redução da atividade das enzimas cinamil álcool desidrogenase e ometiltransferase, envolvidas no processo da síntese de lignina na planta de sorgo (OLIVER et al., 2004). Este tratamento resultou também, em alterações fenotípicas, no qual, geralmente estes híbridos caracterizam-se pela presença de pigmentos vermelhos amarronzados na nervura central nas folhas e no colmo (BARRIÈRE et al., 2004).

A partir do desenvolvimento deste genótipo, o sorgo forrageiro BMR melhorou sensivelmente o valor nutricional desta cultura, podendo apresentar similaridade ou até mesmo superioridade sobre à silagem de milho (CONTRERAS-GOVEA et al., 2010). Numa abordagem meta-analítica Sanchez-Duarte et al. (2019) relataram que os híbridos BMR apresentam potencial de atingir valores de digestibilidade da fibra próximos aos híbridos convencionais de milho. Além disso, McCuistion et al. (2017) descreveram que selecionar uma variedade de sorgo com a característica BMR pode ser mais importante do que usar uma enzima fibrolítica para melhorar as características de degradação da fibra da silagem.

2.2 PRINCÍPIOS BÁSICOS DA ENSILAGEM E SILAGEM DE SORGO

O clima na região sul do Brasil apresenta condições favoráveis para o cultivo de forragens ao longo de todo o ano. Porém, em algumas épocas, ocorrem déficit de quantidade e qualidade de produção forrageira, podendo ocasionar restrição na oferta de alimentos (MACÊDO; SANTOS, 2019), comprometendo desta forma, o consumo e produção dos animais.

Uma das principais alternativas para melhorar a oferta de volumosos ao longo do ano é a técnica de ensilagem (ÁVILA; CARVALHO, 2019). Visto que é considerada um dos processos mais adequados para preservar o valor nutricional próximo à planta fresca e permitir maior competitividade e estabilidade no setor leiteiro (MUCK et al., 2018). Apresentando-se como uma atividade tradicional em nível mundial, esta técnica consiste em conservar a forragem picada por meio da fermentação anaeróbia, através da atuação da microbiota epífita, produzindo ácidos orgânicos, promovendo o declínio do pH e por consequência a conservação do material (FERRARETO et al., 2018; MACÊDO et al., 2017).

Conceitualmente, o processo de ensilagem envolve quatro fases, sendo elas, a fase aeróbia inicial, fermentação anaeróbia, estabilidade fermentativa e abertura do silo ou conhecida como fase de alimentação (BORREANI et al., 2018; WILKINSON; DAVIES, 2012). A fase aeróbia, compreende o processo de picagem, compactação e vedação. Após

devidamente fechado, a massa recém ensilada contém uma certa concentração de oxigênio, ocorrendo o crescimento de microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos. Algumas enzimas das células das plantas continuam ativas, utilizando como fonte de substrato os carboidratos solúveis disponíveis no meio, produzindo CO₂, água e um leve aumento na temperatura (MACÊDO; SANTOS, 2019).

No momento em que ocorre a exaustão completa do oxigênio, é estabelecida a fase anaeróbia, no qual, ocorre o predomínio de bactérias homofermentativas epifíticas, em especial, bactérias produtoras de ácido lático (BAL), responsáveis pela fermentação dos carboidratos solúveis em ácidos orgânicos, promovendo decréscimo do pH e por consequência a conservação do material ensilado (MCDONALD et al., 1991). Com o declínio do pH no meio, normalmente, ocorre a inibição de bactérias e enzimas responsáveis pela produção de compostos indesejáveis, tais como, micotoxinas, ácido butírico, produtos de proteólise, toxinas bacterianas e compostos antinutricionais, que são capazes de elevar as perdas de matéria seca, afetando negativamente a eficiência da conservação (ÁVILA; CARVALHO, 2019).

Já na fase de estabilidade, a intensa fermentação desacelera, mas não paralisa, ou seja, a fermentação ocorre de forma contínua (KUNG, 2013). Além disso, o perfil da microbiota do silo pode alterar, outros microrganismos como as bactérias heterofermentativas são capazes de se desenvolver, mediante a um mecanismo de defesa, apresentando a capacidade de converter em meio anaeróbio o ácido lático em acético e 1,2 propanodiol, podendo ocorrer um leve aumento no pH (OUDE ELFERINK et al., 2001). Tal fase, permanece até o momento da abertura do silo, caracterizada como a etapa em que o silo é exposto ao ar e a silagem é utilizada para compor a dieta dos animais (MCDONALD et al., 1991).

A intensidade da degradação aeróbia, que pode ser observada na última fase, depende diretamente da concentração dos compostos residuais (ácido lático, carboidratos solúveis) que, na presença do oxigênio, resultará em crescimento de organismos aeróbios obrigatórios, principalmente leveduras e fungos (MUCK, 2010). O desenvolvimento destes microrganismos causa a elevação do pH, aumento da temperatura, produção de CO₂ e a perda da qualidade nutricional (KUNG, 2013).

Neste sentido, cabe ressaltar que o resultado dos metabólitos produzidos durante o período de conservação é a consequência da população microbiana predominante (RODRIGUES et al., 2020), sendo que cada fase apresenta suas características específicas, com diferentes reações bioquímicas que devem ser controladas com o intuito de ocorrer de maneira eficiente o processo fermentativo e manter, ao máximo, a qualidade e o valor nutricional da forragem.

A literatura é bastante convincente no que diz respeito às mudanças químicas e nutricionais entre a forragem fresca e a silagem. Assim, torna-se necessário obtermos parâmetros e seus respectivos valores de referência para poder avaliar a qualidade do processo fermentativo. Os critérios normalmente utilizados, são o teor de matéria seca entre 30 a 40% da matéria seca (MS), valores de pH de 3,8 a 4,2%, alguns ácidos orgânicos, sendo eles em maior concentração o ácido lático de 3 a 6 % da MS e depois o ácido acético de 1 a 3 % da MS. Já o ácido butírico e o nitrogênio amoniacal quanto menor a concentração, melhor é a qualidade da silagem (BORREANI, 2018; KUNG JR. et al., 2018; MCDONALD et al., 1991; MUCK, 2010).

Rodrigues et al. (2020) sugeriram a utilização de modelos de predição, com a finalidade de detectar a variabilidade das características bromatológicas do sorgo na forragem fresca e após o material ser fermentado. Neste estudo, os carboidratos solúveis da forragem fresca (CSFf) foi escolhido para ser o preditor dos ácidos lático, acético, propiônico e butírico, bem como, para as concentrações de etanol e pH. Sendo que os modelos apresentaram valores para coeficientes de determinação aceitáveis de 0,51.

Estes modelos, demonstraram que o pH diminuiu até atingir seu nível mais baixo (3,62) com o aumento da concentração dos CSFf, ao nível de 125,0 g/kg MS. No entanto, os mesmos autores, destacaram que carboidratos solúveis acima de 125 g/kg de MS não é aconselhável em silagem de sorgo, pois pode ocorrer produção contínua de etanol.

Para prever a concentração de ácido lático, o modelo mostrou que cada unidade de aumento de CSFf resultou em um acréscimo de 0,37 unidades do conteúdo de ácido lático na silagem, mas atingiu seu platô, quando a forragem apresentou concentração de 125,0 g/kg MS de CSFf. Já para prever as perdas de MS, observou-se entre as variáveis, que apenas as concentrações de etanol e nitrogênio amoniacal na silagem de sorgo foram capazes de serem utilizadas como preditoras das perdas de MS (RODRIGUES et al., 2020).

Do ponto de vista nutricional, é fundamental encontrar estratégias que enfrentam distintas condições edafoclimáticas e mesmo assim apresentam qualidade superior, que possam sustentar a produção, a economia da fazenda e manter a saúde das vacas. Entende-se que entre as culturas, o milho é a planta de maior destaque para a produção de silagem, por apresentar características fermentativas essenciais e alto valor nutricional (VIANA et al., 2012). No entanto, possui elevado custo de produção e uma grande competição com a alimentação humana e animais não ruminantes. Desta forma, é necessária a utilização de outras fontes para suprir a demanda energética e de fibra para os ruminantes.

Neste sentido, a planta de sorgo, se destaca como uma alternativa resiliente ao milho como forragem conservada. Mesmo que o sorgo tenha menor quantidade de amido (12 versus

35% de MS) e maior conteúdo de fibras indigestíveis da parede celular, de maneira geral, apresenta características fenotípicas favoráveis, baixa capacidade tamponante e quantidade de carboidratos solúveis (125,4 g/kg de MS) suficiente para permitir uma adequada fermentação (RODRIGUES et al., 2020).

Segundo Contreras-Govea et al. (2010) a utilização da silagem de sorgo para vacas de média a alta produção, ainda é um obstáculo a ser superado, pois é característico da cultura do sorgo apresentar alto teor de lignina e baixa digestibilidade da fibra em detergente neutro (FDN). Sendo que estes fatores são capazes de influenciar negativamente na ingestão de matéria seca dos animais, a degradabilidade ruminal, e afetando a produção e as concentrações da gordura no leite (SANCHEZ-DUARTE et al., 2019).

Relatos semelhantes foram descritos por Lyons et al. (2019) quando substituíram na dieta de vacas leiteiras, com base em simulações de modelo Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS) a silagem de milho por silagem de sorgo. Os autores constataram que a proteína metabolizável da dieta com silagem de sorgo foi suficiente para estimar o desempenho de produção (42 kg/dia), mas a suplementação energética foi necessária para compensar as concentrações reduzidas de amido e fibra quando a colheita do sorgo para silagem foi realizada nos estágios de flor e grão pastoso.

No entanto, de acordo com Amer et al. (2012) e Bernard e Tao, (2015) semelhanças foram encontradas no consumo de MS, quando substituíram silagem de alfafa ou silagem de milho pela silagem de sorgo. Cattani et al. (2017) e Schambharkar et al. (2018), também não obtiveram diferenças significativas na produção e composição do leite, quando substituíram total ou parcialmente silagem de milho por silagem de sorgo, nas dietas de vacas de alta produção. Além disso, Khosravi et al. (2018) relataram que a silagem de sorgo apresentou capacidade antioxidante, no qual os compostos fenólicos podem eliminar radicais livres do organismo, aumentando de maneira barata e natural o conteúdo antioxidante do leite.

Yang et al. (2019) avaliaram o desempenho produtivo, quando vacas leiteiras de alta produção foram alimentadas com dietas à base de silagem de milho ou de sorgo, com um consumo estimado de 4% do peso vivo (PV). Vacas que consumiram dietas à base de silagem de milho, apresentaram consumo de MS 13% maior (28,8 versus 25,5 kg / dia) e produziram 5% mais leite (51,6 versus 48,9 kg /dia) do que vacas que consumiram dietas à base de silagem de sorgo. Entretanto, as vacas que consumiram dietas à base de silagem de sorgo produziram um leite com maior teor de gordura, (3,84 versus 3,30%) do que o leite de vacas que consumiram dietas à base de silagem de milho.

Ademais, a redução na ingestão de MS das vacas em lactação em função da silagem de sorgo, pode estar associada aos maiores conteúdos de FDN, fibra em detergente ácido (FDA), celulose e lignina, os quais são responsáveis diretamente pela redução da taxa de passagem e digestão dos alimentos, ocasionando aumento do preenchimento ruminal (HARPER et al., 2017). Dietas com maiores frações de fibras indigestíveis, apresentam correlação negativa, principalmente em vacas de alta produção, pois estas necessitam de uma elevada demanda energética.

No entanto, com base nesses estudos, a alimentação com a silagem de sorgo, ainda é uma alternativa adequada para compor a dieta de bovinos leiteiros das mais diversas categorias. Pois segundo Ramos et al. (2021), a silagem de sorgo pode proporcionar uma redução de 28,80% no custo com alimentação, especialmente pela forrageira apresentar alta produtividade e sua capacidade de se ajustar a diferentes condições climáticas.

2.3 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE CONSERVAÇÃO SOBRE A SILAGEM

As mudanças e transformações bioquímicas que ocorrem na planta forrageira do momento da ensilagem até a obtenção do produto final (silagem) são objeto de estudo de pesquisadores do mundo inteiro. A literatura, considera que a terceira etapa do processo da ensilagem, isto é, a fase de estabilidade fermentativa, compreende ser um intervalo de três semanas (MCDONALD et al., 1991; PAHLOW et al., 2003). Entretanto, tal fato é desmistificado por outros autores, pois ocorrem alterações na composição da silagem após longos períodos de conservação. Indicando que existem claras evidências que a fermentação no período de estabilidade ainda persiste, porém com menor intensidade (DER BEDROSIAN et al., 2012; KLEINSCHMIT; KUNG, 2006).

A razão destas descobertas, já tinha sido elucidado por Oude Elferink et al. (2001), relatando que algumas espécies de *Lactobacillus* heterofermentativas, são dependentes de um meio ácido para iniciar seu desenvolvimento. Este mecanismo é justificado, em parte, pela capacidade que algumas bactérias como a *L. Buchneri*, por um mecanismo de defesa e quantidade limitada, ou até mesmo, a ausência de carboidratos solúveis em água, de metabolizar em meio anaeróbio o ácido láctico em acético, 1,2 propanodiol e etanol de forma contínua com o prolongar do tempo de armazenamento (KUNG, 2013).

Além disso, Lindgren et al. (1990) e Krooneman et al. (2002), descreveram que o 1,2-propanodiol também pode ser convertido em ácido propiônico por *L. Diolivorans*. Ademais, de acordo com Grum et al. (1991), a concentração de ácido láctico, assim como dos demais ácidos

orgânicos, pode aumentar com armazenamento prolongado, sendo enfatizado pelo fato de que as bactérias produtoras de ácido lático são bastante tolerantes a ácidos e ativos por períodos prolongados no silo. No entanto, trabalhos mais recentes, diferem do relatado de Grum et al. (1991), em que o ácido lático pode demonstrar diminuição sob efeito do período de conservação (DER BEDROSIAN et al., 2012; FERRERO et al., 2018; SANTOS et al., 2019).

Em razão da necessidade de condições ácidas no silo, é provável que o processo, acima mencionado, inicie entre 30 e 60 dias de ensilagem (KUNG, 2013; MUCK et al., 2018). Portanto, com um período maior de armazenamento, pode ocorrer um ligeiro aumento de 0,1 a 0,2 unidades percentuais no teor de pH, aumento na concentração de ácido acético, propiônico e perdas nutricionais pelo consumo de energia e produção de CO₂ através das bactérias heterofermentativas. Neste sentido, Der Bedrosian et al. (2012) afirmaram que em decorrência ao tempo prolongado de armazenamento, ocasionou um acréscimo no conteúdo de etanol e aumento de forma constante na concentração de ácido acético de 0,98% aos 45 dias para 1,71% em 360 dias de conservação.

Apesar de ocorrer aumento de diferentes produtos metabólicos com o prolongar do tempo, tais modificações podem ser benéficas. Visto que a presença de ácidos voláteis como o acético e o propiônico apresentam correlação positiva e significativa com a estabilidade aeróbia, enquanto que o ácido lático, segundo McDonald et al. (1991) obteve correlação negativa. Isto se deve, pela capacidade do ácido acético e propiônico ser um potente antifúngico, suprimindo o crescimento de leveduras que assimilam ácido lático e promovem um aumento no pH, diminuindo a longevidade da qualidade do material após a silagem ser exposta a ar (KUNG JR. et al., 2018; NERI et al., 2019; WILKINSON; DAVIES, 2012).

Um dos processos que ocorre, porém, se acentua ao longo do período de armazenamento, é a conversão da proteína verdadeira em nitrogênio não proteico (NNP) proteína solúvel, ou seja, compostos que integram a fração A e B1 proposta por Licitra et al. (1996). Várias hipóteses poderiam estar envolvidas na quebra das proteínas em silagens de plantas inteiras, como a proteólise mediada por enzimas vegetais, bem como a proteólise induzida por fermentação, solubilização ácida e microbiana (BARON et al., 1986). Porém, a contribuição decisiva de qual agente era responsável para a ocorrência de tal mecanismo não era bem conhecida. Pesquisas feitas por Kleinschmit e Kung (2006) relataram que a concentração de nitrogênio amoniacal era duas vezes mais alta na silagem de milho controle aos 361 dias de ensilagem, quando comparado com silos armazenados por 282 dias.

Mais tarde, Hoffman et al. (2011) e Ferraretto et al. (2015) afirmaram que a quebra das proteínas durante o período prolongado de conservação da silagem não era associada pela

simples solubilização ácida. Os mesmos autores, também relataram que havia aumento na concentração de nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) conforme a diminuição das subunidades de proteína no grão. Junges et al. (2017) afirmaram que o aumento da solubilidade do nitrogênio em silagens e o aumento da digestibilidade do amido ocorrem pela degradação por proteases bacterianas, colaborando com 60%, seguida por enzimas presentes no grão, com 30%, além de fungos e produtos finais da fermentação, com 10% de participação.

Em relação ao aumento dos produtos oriundos dos processos acima citados, foi sendo justificado pelas características semelhantes que o grão do milho e do sorgo apresentam. Estes cereais possuem em sua constituição proteínas, chamadas de prolaminas, sendo que no sorgo são denominadas kaferinas e no milho, zeínas (DUODU et al., 2003). Estas proteínas, são responsáveis pela formação de arranjos protéicos que constituem a matriz que envolve os grânulos de amido no endosperma do grão. Apresentam insolubilidade em água, baixa capacidade de degradação através da ação bacteriana durante período inicial de fermentação e bastante resistência a degradação ruminal (BELTON et al., 2006; DUODU et al., 2003).

Entretanto, o tempo de conservação pode apresentar potencial em atenuar o efeito hidrofóbico citado anteriormente, além de proporcionar maior acesso as bactérias amilolíticas aos grânulos de amido antes envoltos pela matriz proteica, aumentando a área exposta à ação enzimática de microrganismos ruminais (GIUBERTI et al., 2014; HOFFMAN et al., 2011; FERRARETTO et al., 2015). Tais efeitos foram demonstrados por Hoffman et al. (2011) em que a degradação da proteína zeína foi relacionada com a atividade proteolítica, uma vez que aos 240 dias de armazenamento, houve redução da proteína zeína e aumento do $N-NH_3$. Sendo que o aumento destes produtos oriundos da proteólise nas silagens de grãos e de planta inteira estão altamente correlacionados com degradabilidade do amido (FERRARETTO et al., 2015).

Kung Jr. et al. (2014) e Fernandes et al. (2015) contribuíram para sustentar a hipótese de que o tempo de estocagem reduz os teores de prolaminas, aumento na concentração de $N-NH_3$, proteína solúvel e aumenta a degradabilidade in vitro do amido. Daniel et al. (2014) verificaram que a degradabilidade do amido aumentou 0,31 unidades percentuais por dia até os 28 dias de estocagem. Após este período, o aumento da degradabilidade foi de de 0,03 unidades percentuais/dia sem atingir um platô.

Arcari et al. (2016) também afirmaram que períodos prolongados de conservação podem aumentar em até 8,5 vezes a concentração de $N-NH_3$ (3 versus 330 dias) e concomitantemente um aumento na degradabilidade do amido. Já para silagem de planta inteira de sorgo, Fernandes et al. (2020) demonstraram que o processo é bastante similar, em que a degradabilidade do

amido aumentou com o tempo de armazenamento da silagem (0 versus 90 dias), assim como o N-NH₃.

De acordo com Silva et al. (2019) a diferença de sessenta dias no período de armazenamento permitiu que as vacas leiteiras produzissem 1,2 kg por dia a mais de leite, sem alterar o consumo de MS. A maior produção de leite das vacas alimentadas com silagens armazenadas por 90 dias em relação a silagens com 30 dias é justificada, parcialmente, pelo aumento na degradabilidade do amido e da proteína. Essa melhora na degradação ruminal do amido, aumentou a disponibilidade de energia rapidamente fermentável no rúmen, podendo aumentar a produção de proteína microbiana e de ácidos graxos voláteis totais no rúmen.

Quando silagens fermentadas por períodos curtos de armazenamento passaram a compor a dieta de vacas leiteiras, Kung (2013) relataram redução do consumo de amido e na produção de leite, sendo atribuído, pelo fato de as silagens mais novas terem contribuído com menor aporte de energia líquida (EL), em virtude da baixa degradabilidade do amido em relação a silagens com período maior de armazenamento. Além do mais, o aumento na degradabilidade do amido pode levar a melhor utilização dos nutrientes e redução dos custos alimentares (CURADO, 2020).

Poucas alterações são encontradas para a degradabilidade da FDN com o prolongar do tempo de armazenamento. Ligeira redução de 1 a 2 unidades percentuais, são documentadas por Ferraretto et al. (2014). No qual, estão vinculados provavelmente com a hidrólise de hemiceluloses na fermentação da silagem. Em uma meta-análise, Daniel et al. (2014) observaram que a degradabilidade da FDN diminuiu ao longo do tempo de armazenamento. Os mesmos autores reportam que a fração hemicelulose é parcialmente solubilizada, sendo que as alterações da lignina são, praticamente, insignificantes, ocorrendo por efeito de diluição, com a perda de porções de parede celular mais solúveis, resultando em menor degradabilidade restante da fibra, que parece permanecer inalterada.

Ademais, Hallada et al. (2008), Duvnjak et al. (2019) e Diepersloot et al. (2021) observaram em seus estudos, que houve aumento na degradabilidade da FDN, justificando que o mecanismo que está por trás do aumento da concentração da FDN com o aumento do tempo de armazenamento em sorgo sacarino pode estar relacionado à redução do conteúdo de carboidratos solúveis em água, aumentando a porção fibrosa na silagem.

Bueno et al. (2020) ao avaliar o efeito da maturidade com diferentes períodos de armazenamento, relataram que não houve diferença sobre a degradabilidade do FDN. Também reportaram que híbridos vítreos com alto teor de MS (40%) precisam ser melhor processados, ou aumentar o tempo de armazenamento, para atenuar o impacto negativo da maturidade sobre

a degradabilidade da silagem, podendo ter implicações práticas para a formulação de dietas (HRISTOV et al., 2020).

De acordo com Santos et al. (2019) todos os parâmetros da composição química dos silos, exceto o conteúdo de FDN, foram afetados pela duração do período de armazenamento. Além disso, destacaram que um possível benefício em relação ao prolongar do tempo de conservação foi a redução na concentração do tanino presente no grão do sorgo. No qual, esta diminuição foi relacionada ao ambiente ácido e a atividade microbiana em meio anaeróbio, ocorrendo a inativação e a despolimerização dos taninos condensados para compostos de baixo peso molecular.

O conteúdo de carboidratos solúveis, representado pela fração A4, segundo Lanzas et al. (2007), é consumido pela microbiota do silo ao longo do tempo de conservação, principalmente nos primeiros meses, porém pode ser um indicativo do consumo residual, de forma contínua, durante todo o processo de conservação do silo (MCDONALD et al., 1991). Estes efeitos foram descritos por Naeini et al. (2014), no qual relataram que a concentração de carboidratos solúveis em água, diminuiu drasticamente nos primeiros 30 dias (69,3 g/kg) de fermentação e continuou a cair gradualmente aos 60 dias de armazenamento com concentração de 27,5 g/kg na MS. Fernandes et al. (2020) também verificaram que a concentração de carboidratos solúveis em água, diminuíram 70% após 15 dias de armazenamento.

O maior tempo de conservação apresenta pouco efeito sobre a digestibilidade da fibra, inclusive, nas frações B3 e C proposto por Lanzas et al. (2007). A escolha/seleção do tipo de híbrido e o correto tamanho de partícula no momento da ensilagem são práticas que influenciam e melhoram muito mais a utilização da fibra pelos animais (ÚDEN, 2017).

Ademais, o prolongar do tempo de armazenamento, pode influenciar a produção de gás, observada pela cinética de fermentação ruminal *in vitro*. Segundo relatos de Russel et al. (1992) silagens com maior ocorrência de proteólise, aumento na concentração de amônia e proteína solúvel são capazes de reduzir o volume total de gás, pois a formação do N-NH₃ diminui a formação de CO₂. Naeini et al. (2014) demonstraram que a produção de gás em 24 horas, apresentou decréscimo linear de 184 mL/g MS aos 30 dias para 174 mL/g MS aos 120 de conservação. Entretanto, Santos et al. (2019) relataram que a taxa de produção de gás aumentou 21% nas silagens armazenadas por 90 dias, quando comparada com silagens armazenadas por 30 dias.

Para fins práticos, Santos et al. (2019) sugeriram que o tempo ideal para melhorar as características fermentativas da silagem seja por volta de 180 dias de conservação. De acordo com Bueno et al. (2020) utilizar colheitadeiras, sem o processador de grãos, requer períodos de

armazenamento mais longos, ou seja, pelo menos dois meses, para tentar atenuar o impacto negativo da maturidade avançada, do grão vítreo sobre a degradabilidade da silagem. Os mesmos autores, relataram que o atraso na colheita, aumentando o teor de MS de 30 para 40%, foi contrabalanceado positivamente com o prolongar do tempo de armazenamento.

Neste sentido, monitorar regularmente e compreender os efeitos do período de conservação, sobre o valor nutricional da silagem, permite que produtores de leite e nutricionistas realizem adaptações apropriadas em relação às formulações de dietas conforme o tempo de armazenamento. Com o objetivo de potencializar a produção e constituintes do leite e minimizar os transtornos metabólicos.

2.4 FATORES QUE PREDISPÕE A PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS

Fungos são organismos eucariontes e heterotróficos, que se disseminam, quando em ambientes úmidos, por uma rede de filamentos chamada hifas. Podem crescer em grãos, alimentos e produzir substâncias tóxicas (NONES et al., 2014). Sendo que estes produtos, são popularmente conhecidos como micotoxinas, termo originário da expressão greco-latina “mykes toxicum” que significa toxina fúngica (LAZZARI, 1997).

Estas são produzidas através de uma série de reações catalisadas por enzimas. É descrito na literatura que as micotoxinas são formadas, quando ocorre acúmulo de precursores metabólicos primários, e para evitar este acúmulo, os fungos apresentam a capacidade de expelir o excesso destes precursores e produzir metabólitos secundários, com o intuito de manter o primário de forma constante (OKUMA et al., 2018).

Para Dilkin (2014), micotoxinas são definidas como produtos metabólitos tóxicos secundários, no qual são compostos orgânicos de baixo peso molecular, sintetizados e expelidos através de um conjunto de vias metabólicas no estágio final de seu crescimento (JAY, 2005; NOVINSKI, 2013). Já para Fink-Gremmels (2005) sugeriram que os fungos são capazes de produzir uma ampla diversidade destes metabólitos secundários, com propriedades antimicrobianas e antifúngicas. A produção destas, aumenta a competitividade quando ocorre falta de substratos.

Os fungos que produzem micotoxinas são divididos, geralmente em dois grupos. Aqueles patógenos que normalmente são chamados de fungos de campo, que inicialmente colonizam a planta e predispõe à contaminação, como *Fusarium graminearum* (desoxinivalenol e zearelenona), *F. verticillioides* (fumonisinas) que podem crescer em plantas senescentes ou que apresentaram algum tipo de estresse, além do *Aspergillus flavus* (aflatoxinas) que por vezes,

também pode ser encontrado. Já o outro grupo de patógenos chamados de fungos de armazenamento, fazem parte o *Penicillium verrucosum* (ocratoxinas) e *A. flavus* (aflatoxinas) (ADAMS, 1977; ALONSO et al., 2013).

No Brasil, devido a prevalência do clima tropical e subtropical, existem condições ideais para o desenvolvimento de fungos. Estes, por sua vez, crescem em diversos produtos de origem agrícola, geralmente no estágio de produção, transporte, armazenamento e alimentação. Causando grandes impactos econômicos na agricultura, além de provocar efeitos tóxicos, carcinogênicos, tanto em animais quanto em humanos (ALONSO et al., 2013). Segundo Mallmann e Dilkin (2007), o desenvolvimento dos fungos toxicogênicos e a produção de micotoxinas, tanto na natureza como no laboratório, são dependentes de uma série de fatores, como temperatura (20 a 30 °C), umidade (>80%), substrato, pH, atividade da água (aW) de 0,6 a 0,9, cepa do microrganismo, oxigênio, danos mecânicos entre outros.

Como grande parte dos produtores utilizam a técnica de ensilagem para conservar alimentos aos animais, sendo que as forragens são susceptíveis a danos físicos, ambientais, pragas e doenças. Nesta situação a forragem está em contato, naturalmente, com leveduras e fungos filamentosos presentes no campo (QUEIROZ et al., 2018). A gestão ineficiente dos processos da ensilagem como a higiene dos equipamentos, compactação e vedação podem contribuir para a alta incidência e contaminação por micotoxinas na silagem (SCHMIDT et al., 2011; TELLER et al., 2012).

A maioria dos fungos não se desenvolve durante a fase anaeróbia da ensilagem, devido a sua baixa tolerância a ambientes ácidos e, também, por necessitarem de oxigênio para seu processo de respiração celular (MCDONALD et al., 1991). No entanto, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium roqueforti*, *P. paneum*, *F. oxysporum* são capazes de tolerar altos níveis de dióxido de carbono e baixa disponibilidade de oxigênio (GALLO et al., 2015).

Quando os silos são abertos, a exposição da silagem ao ar torna-se inevitável, sendo que em condições aeróbias o valor nutricional e a qualidade higiênica da silagem podem ser alterados. Nesta fase, as leveduras metabolizam o ácido láctico em CO₂, aumentando, desta forma, o pH da silagem (> 6,0), o que facilita o crescimento ativo de fungos toxinogênicos, principalmente quando ocorre manejos inadequados durante a fase de alimentação (MCDONALD et al., 1991; QUEIROZ, 2011). De acordo com Driehuis (2011), o crescimento de fungos e a produção de micotoxinas em silagens está associada diretamente à infiltração de ar durante o armazenamento e a extensão da infiltração de ar após a abertura do silo, ocorrendo principalmente em silos que apresentam alta porosidade ou baixa taxa de remoção (GONZÁLEZ PEREYRA et al., 2008).

Tais efeitos, geram uma rápida deterioração do material, perda de nutrientes e matéria seca, redução da palatabilidade e no consumo de silagem, acarretando como consequência, diminuição no desempenho produtivo dos animais e desordens metabólicas e/ou digestivas (ALONSO et al., 2013; GONZÁLES PEREYRA et al., 2011). De acordo com Garon et al. (2006) e Richard et al. (2007) a aflatoxina produzida no milho antes da ensilagem muitas vezes se decompõe lentamente na silagem armazenada, devido à fermentação anaeróbia e ácida, fazendo com que algumas micotoxinas sejam metabolizadas. Ademais, espécies de *Fusarium*, geralmente, apresentam baixa prevalência, quando comparadas às espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, sob as condições de fermentação das silagens (CHELI et al. 2013).

Entretanto, alguns estudos relataram o desenvolvimento de micotoxinas de *Fusarium* durante o período de armazenamento da silagem. Um exemplo disso, foi um estudo realizado na Itália, no qual a zearalenona foi detectada em altas concentrações em áreas periféricas em silagens de milho (CAVALLARIN et al., 2004). Keller et al. (2012) relataram que em silagens de sorgo a contagem total de fungos aumentou durante o processo de fermentação, sendo maior no pós-fermentativo do que em relação às amostras antes de serem ensiladas.

Do mesmo modo, ao analisar o efeito do tempo de armazenamento em silagens em relação a contagem de fungos, não foram relatadas alterações significativas durante os primeiros três meses. No entanto, aos 180 dias de armazenamento, a quantidade de propágulos fúngicos viáveis aumentou significativamente (DEL PALÁCIO et al., 2016). Del Palácio e Pan (2020), revelaram que em silagem de grão de trigo, a espécie *A. flavus* esteve presente com incidência de 4% na colheita, após 60 dias ensilado apresentou 27,5% de prevalência, 47% aos 90 dias, atingindo 67% após 120 dias de armazenamento, demonstrando correlação positiva entre a presença de seção de *A. flavus* e o tempo de armazenamento.

Estes fatos podem ser justificados, segundo McDonald et al. (1991), que silagens com baixo pH (4,0), normalmente são consideradas adequadas. Porém, avaliar este fator físico de forma isolada, pode não ser capaz de reduzir o crescimento de leveduras e fungos produtores de micotoxinas na silagem. Além disso, de forma hipotética os fungos não deveriam se desenvolver em silagens anaeróbias bem preservadas. Entretanto, na prática, as silagens não são completamente anaeróbias, pois os materiais de cobertura de silagem, geralmente, não são totalmente herméticos além de apresentarem uma certa permeabilidade ao oxigênio (DRIEHUIS, 2011).

Silva et al. (2000) relataram que *Aspergillus* e *Fusarium* foram os gêneros mais predominantes em silagens no sorgo do Brasil. Mais tarde, Keller et al. (2012) relataram que *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium* foram os mais frequentes. Já no Uruguai, segundo Del

Palácio et al. (2016) *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. foram os gêneros mais prevalentes em silagens de sorgo.

Segundo a revisão feita por Alonso et al. (2013) a distribuição de gêneros dos fungos é bastante semelhante entre diferentes países, sendo que principais fungos isolados foram os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Sendo que as principais micotoxinas encontradas nas silagens são aflatoxinas, ocratoxina, fumonisinas e tricotecenos. Para Silva et al. (2004) e Bandyopadhyay et al. (2007) a silagem de sorgo é geralmente menos contaminada com aflatoxinas e fumonisinas do que em milho. De acordo com Chala et al. (2014) relataram que a zearalenona foi a micotoxina comumente encontrada no sorgo, seguida pelas fumonisinas e aflatoxinas.

Estudos realizados em silagens na Argentina e no Brasil, em relação a contaminação de fungos nas diferentes seções do silo, demonstraram que as seções superior e inferior apresentaram os mesmos níveis, enquanto que a seção intermediária apresentou baixa contaminação por fungos, sendo desta forma, a parte melhor preservada (ALONSO et al. 2013; GONZÁLEZ PEREYRA et al. 2008; KELLER et al. 2013).

Como a silagem constitui uma das principais fontes de volumoso e pela sua alta inclusão em dietas para ruminantes, e a provável contaminação de múltiplas micotoxinas, o fornecimento de silagens contaminadas pode vir a se tornar um problema sanitário (DRIEHUIS, 2011). Contudo, pouco se sabe sobre a sinergia ou antagonismo entre as toxinas presentes simultaneamente na silagem e quais os efeitos colaterais a curto e longo prazo, quando estes, são ingeridos pelos animais (TANGNI et al., 2013).

Neste sentido, a contagem de fungos é uma técnica utilizada para estimar a qualidade higiênica do substrato, sendo que de acordo com as diretrizes internacionais, as unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de alimento, não devem exceder o valor de 1×10^4 UFC g⁻¹ (GMP, 2008). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, como cereais, leite e produtos lácteos, porém para forragem conservada no Brasil, não há um valor de referência.

Dessa forma, para o conhecimento a respeito dos níveis de micotoxinas especificamente para silagem, principalmente a de sorgo, ainda há relatos escassos no Brasil. Em função dessa carência, estudos foram realizados pela Universidade Federal do Paraná, no qual estipularam um limite aceitável para silagem de milho de 1000 µg.kg⁻¹, 285 µg.kg⁻¹ e 19 µg.kg⁻¹, para aflatoxina, zearalenona e fumonisina, respectivamente (NOVISNKI; SCHMIDT, 2011).

Assim, torna-se necessário adotar estratégias de prevenção e parâmetros práticos para controlar o desenvolvimento de micotoxinas, como: práticas agrônômicas para reduzir o

estresse ambiental, ensilar a forragem com teor de matéria seca acima de 30%, atingir aW entre 0,7 e 0,8, restringir a atividade respiratória para não aumentar a temperatura da silagem (>40°C). Também, avaliar o tamanho de partícula, realizar uma boa compactação para atingir alta densidade (700 kg / m³) com o objetivo de restringir a infiltração de ar na silagem durante o armazenamento e após a abertura do silo (DRIEHUIS, 2011; QUEIROZ et al., 2011). Adicionar aditivos microbianos (heterofermentativos) que melhoram a estabilidade aeróbia por meio da sua ação antifúngica. Utilizar materiais de boa qualidade para a vedação, com baixa permeabilidade de oxigênio e fazer o uso de barreiras físicas para diminuir ataques de agentes externos (BERNARDES et al., 2018). Bem como, manter uma taxa de remoção de silagem, em torno de 250 kg/m² por dia para minimizar a rápida deterioração aeróbia (BERNARDES et al., 2021).

Além do mais, fazer o uso, quando possível, de produtos químicos ou agentes sequestrantes, para amenizar e até mesmo inibir o crescimento de fungos toxigênicos e/ou reduzir a absorção da micotoxina pelo animal (QUEIROZ et al., 2011). No entanto, vale ressaltar, que a utilização destes produtos, não desintoxica completamente as silagens que estão contaminadas por micotoxinas. Muitas vezes os aditivos são antieconômicos e ineficazes para silagens em propriedade leiteiras, devido à grande quantidade de material a ser tratado (SCHMIDT et al., 2015).

Ademais as informações sobre a estabilidade das micotoxinas na silagem não são totalmente conclusivas e, para algumas toxinas, são contraditórias. Possivelmente, isso se relaciona ao número reduzido de análises para determinar a presença de micotoxinas, em razão do alto custo analítico e principalmente a carência de valores de referência, assim como a grande heterogeneidade das silagens e ao fato de que as condições climáticas e fatores bióticos se alteram com frequência (DRIEHUIS, 2011; QUEIROZ et al., 2011; SCHMIDT et al., 2015).

2.4.1 Aflatoxina (AFLA)

O nome aflatoxina tem origem na combinação das palavras *Aspergillus* + *flavus* + toxina. São produzidas por diversas espécies de fungos filamentosos, principalmente *A. flavus*, e *A. parasiticus* (HUSSAIN et al., 2010). Segundo Richard (2007), são reconhecidas, atualmente, 18 compostos identificados pelo termo aflatoxina. Entretanto, os que apresentam maior interesse sanitário são denominados B1, B2, G1 e G2, no qual, são denominadas com base na fluorescência quando submetidas luz ultravioleta e na sua mobilidade durante a aplicação da cromatografia de camada delgada. Mas conforme a classificação da International

Agency for Research on Cancer (IARC), apenas a aflatoxina B1 (AFLAB1) é apontada como a micotoxina pertencente ao grupo 1 com alto poder carcinogênico (IMAMURA et al., 2015).

Apresenta capacidade de crescer em uma ampla faixa de temperatura (24 a 35 °C) e umidade (80 a 85%), possui alto ponto de fusão, sendo decomposta em temperaturas acima de 220 °C. Ou seja, são demasiadamente termoestáveis, além de apresentarem bom desenvolvimento em substratos como a silagem, com atividade da água em torno de 0,83 (DILKIN et al., 2000).

Atenção especial deve ser dada a AFLA, por ser uma contaminante onipresente nos alimentos em geral e pela preocupação em relação a saúde pública. Isso se deve, ao fato dos microrganismos ruminais apresentam baixa capacidade de metabolizar e diminuir a toxicidade desta micotoxina. Assim, a AFLA pode ser encontrada na urina, no leite e produtos lácteos de consumo humano (DIAZ et al., 2004).

Como a silagem compõe grande parte da dieta de vacas em lactação, uma vez contaminada por AFLA pode ser uma fonte significativa para contaminação no leite (GLAMOČIĆ et al., 2019). Após o consumo de AFLA, a mesma é absorvida pelo trato gastrointestinal, passando para a corrente sanguínea e transportada até o fígado, no qual é hidrolisada pelo sistema enzimático microsomal hepático, formando derivados hidrossolúveis, no qual, passa a ser chamada de aflatoxina M1 (AFM1). Sendo transferida do sangue para o leite por difusão passiva pela membrana celular ou transporte ativo (CREPPY, 2002; SCUSSEL et al., 2011).

A taxa de transferência para o leite pode variar de acordo com vários fatores, sendo eles nutricionais e fisiológicos, incluindo nível de contaminação e exposição, taxa de ingestão e digestão, saúde imunológica do animal, capacidade de biotransformação hepática e produção de leite (DUARTE et al., 2013). Segundo relatos de Battacone et al. (2009) o pico de concentração da AFM1 no leite pode ocorrer de 3 a 6 horas após a ingestão de AFLAB1. Já em outras espécies, a toxina é totalmente eliminada 24 horas depois da exposição. A AFM1 pode desaparecer em torno de 4 dias após a remoção da AFLAB1 da dieta (DAL POZZO, 2016). Oliveira et al. (2010) determinaram a incidência de AFLAB1 em rações e AFM1 no leite em propriedades no Estado de São Paulo. As maiores ocorrências de AFM1 no leite estavam relacionados diretamente com as propriedades que forneciam maior quantidade de silagem na composição da dieta.

De acordo com Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2011), o leite com concentrações de AFLA acima de 0,05 µg.kg⁻¹ é considerado inadequado para comercialização nos EUA, Brasil, Argentina e outros países pertencentes ao mercado comum do sul. Em relação

aos limites máximos toleráveis de AFLA seja qual for a matéria prima ou rações utilizadas como ingredientes destinadas ao consumo animal, o Ministério da Agricultura através da Portaria MA/SNAD/SFA 07 de 1988, propõe que seja de $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ o máximo de AFLA presentes nos alimentos. Destaca-se que o Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC) da Universidade Federal de Santa Maria, sugere que os limites máximos toleráveis de micotoxinas em alimentos para ruminantes sendo eles, terneiros, machos adultos e fêmeas lactantes, seja de $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$, $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e $0 \mu\text{g.kg}^{-1}$, respectivamente.

Em forragens conservadas como as silagens, a incidência de AFLA é relativamente baixa em comparação com outras micotoxinas, devido, provavelmente à baixa tolerância de *A. flavus* e *A. parasiticus* ao ambiente ácido. Garon et al. (2006) descreveram que AFLAB1 presente na planta de milho no campo se degrada lentamente durante o período de fermentação da silagem. Esta observação pode ser confirmada pelo declínio da AFLAB1 durante nove meses de armazenamento em silagens de milho (DRIHEUS, 2011). Em um estudo conduzido no Brasil por Schmidt et al. (2015) observou-se que AFLA B2, G1 e G2 não são detectadas em nenhuma amostra de silagem, sendo que apenas 3 de 327 amostras foram positivas para AFLAB1.

No entanto, há relatos de que podem ocorrer altos níveis de AFLA em silagens conservadas ou produzida com material contaminado (Queiroz et al., 2009). Gonzales Pereyra et al. (2008) e Amaral e Nussio (2011) também observaram que o manejo inadequado da silagem pode prejudicar a fermentação, promover condições aeróbias dentro da massa do silo, no qual pode favorecer o crescimento de fungos que normalmente são menos tolerantes às condições ácidas ou anaeróbias, como *A. flavus*.

Conforme descrito por Silva et al. (2000), *A. flavus* foi detectado após 8 meses de armazenamento (224 dias), quando a temperatura média e a umidade relativa variaram entre 17 e 24 ° C e 69 e 82%, respectivamente. González Pereyra et al. (2008) relataram que as amostras de milho sem passar pela fermentação não apresentaram contaminação de AFLA, enquanto que 17% dos silos pós-fermentados estavam contaminados. Semelhanças foram encontradas por Keller et al. (2012), no qual observaram que em silagem de sorgo a contagem total de fungos aumentou durante o processo de fermentação, sendo maior no pós-fermentativo do que nas amostras antes de serem ensiladas.

González Pereyra et al. (2011) estudaram o efeito dos diferentes tipos de silo sobre a contaminação com AFLA, no qual, relataram que os silos tipo sacos/bags apresentaram alta contaminação. 86% deles tinham níveis que excediam o limite recomendado para bovinos de corte. Já para silos trincheiras foi encontrada uma baixa incidência de contaminação por AFLA (14%). Segundo Venturini (2019), ao determinar a presença de fungos em silagens de sorgo ao

longo do perfil fermentativo, observou que na silagem controle *A. flavus* apresentou aumento crescente, com identificação de 1,25 UFC g⁻¹ aos 14 dias e 1,67 UFC g⁻¹ aos 56 dias de conservação. De acordo com Mallmann et al. (2014) as AFLA estão presentes em amostras de silagem e sorgo, com positividade em torno de 16%, representando moderado risco de micotoxinas (RM), ou seja, uma prevalência mediana.

Conforme descrito por Del Palácio e Pan (2020), tanto para silagem de grão de trigo quanto para sorgo, a contaminação no campo por aflatoxina foi inferior ao encontrado durante o período de armazenamento, sugerindo que esta espécie pode apresentar uma certa resistência e adaptação às condições de armazenamento. Anteriormente, Queiroz et al. (2009) descreveram que a inoculação com *L. buchneri* e *P. Pediococcus* ao material pré-ensilado com alta concentração de AFLA, resultou em silagem sem a ocorrência de micotoxinas. Desta forma, foi demonstrado um possível efeito antifúngico dos ácidos sobre a proliferação de fungos toxinogênicos.

De acordo com Santos et al. (2019), a contagem de *A. flavus* diminuiu com o prolongar do tempo de armazenamento em variedades sorgo de alto e baixa concentração de tanino. Desta forma, os autores recomendaram um período de até 90 dias de armazenamento. Ademais, grãos de sorgo ensilados por períodos superiores a 30 dias, podem reduzir a presença de espécies de *A. flavus*, isto quando boas práticas de gestão na realização da silagem são seguidas. Podendo indicar que o armazenamento de grãos de sorgo pode ser contaminado com menos frequência por *A. flavus*, produtores de AFLA, do que outros grãos, como trigo e milho. Sugerindo que o sorgo pode ser um substrato menos susceptível para ser utilizado para a produção de silagem (DEL PALÁCIO E PAN, 2020).

2.4.2 Zearalenona (ZEA)

A denominação zearalenona provém do fungo “*Gibberella zeae*”. É um metabólito produzido pela espécie *Fusarium*, englobando principalmente *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. crookwellense* (SOBROVA et al., 2010). Conhecida, anteriormente com toxina F-2, é descrita quimicamente como uma lactona macrocíclica, no qual é classificada como toxina de campo, sendo frequentemente encontrado em milho, trigo, cevada, arroz, sorgo e silagem (JOUANY; DIAZ, 2005; GALLO et al., 2015).

Em estudo *in vitro*, Martins e Martins (2002), relataram que a grande variação térmica se apresentou como essencial para produção de micotoxinas por fungos do gênero *Fusarium*. Variação esta, encontrada em regiões de clima temperado, como ocorre em alguns locais no

estado do Rio Grande do Sul. Estes autores demonstraram que a maior produção de ZEA ocorreu quando a cultura do milho foi incubada a 28 °C por 15 dias, seguido por uma queda na temperatura para 12 °C, isto é, uma oscilação de 13 °C. A ZEA também apresenta boa estabilidade térmica, fato este evidenciado, quando em um estudo, os grãos de milho foram submetidos a uma temperatura de 150 °C, no qual a toxina foi apenas decomposta parcialmente (MALLMANN; DILKIN 2007). Logo, a temperatura ótima para a produção de ZEA está entre 12 e 14 °C, aW próximo ou superior a 0,85 e um pH variando entre 3,5 a 7,5.

As plantas em suas diversas fases de desenvolvimento ou também na colheita, processamento e no armazenamento, submetidas ao estresse climático, seja na seca ou baixas temperaturas, danos causados por insetos ou doenças, podem se tornar mais vulneráveis ao *Fusarium*, servindo como fontes contaminadoras da silagem (LESLIE et al., 1990; TELLER et al., 2012). Sendo que os esporos do *Fusarium* spp. produzem pigmentos avermelhados, podendo ser um bom indicativo da proliferação destes fungos em substratos.

A ZEA é um metabólito secundário com propriedades estrogênicas não esteroide, no qual estimula os receptores citoplasmáticos, propiciando a síntese proteica no aparelho reprodutor (DILKIN; MALLMANN, 2004). Desta forma, a secreção das células endometriais, síntese das proteínas uterinas e o peso do aparelho reprodutivo apresentam tendência de aumento. Podendo ocasionar vários problemas reprodutivos, incluindo diminuição da fertilidade, hiperestrogenismo, vaginite, repetição de cio, aumento da glândula mamária, diminuição na produção de leite, feminização de machos jovens devido à diminuição da produção de testosterona e infertilidade (GONÇALVES et al., 2017).

Ruminantes são menos acometidos quando comparado aos suínos e aves. Podendo ser confirmado pela compilação de dados de Assis et al. (2019) e colaboradores, quando investigaram os efeitos da ingestão de ZEA em ruminantes *in vivo*. Ao testar a dose de 0 a 500 mg/kg de ZEA em vacas em lactação, Weaver et al. (1986) relataram que a concentração de progesterona não foi afetada e não houve alterações comportamentais e no trato genital. Winkler et al. (2014) testaram diferentes doses de ingestão da micotoxina ZEA em vacas não lactantes, relataram que não houve nenhum efeito no desempenho desses animais. No entanto, Bridges et al. (2010) observaram morte embrionária e aborto, quando vacas prenhas receberam 20 mg/kg. Já quando novilhas receberam 1,5-5 mg/kg, os mesmos autores relataram casos de vaginite, edema de glândula mamária e atraso na puberdade.

Este cenário é justificado, pelo fato dos microrganismos ruminais, principalmente os protozoários, atuarem como primeira fase de defesa contra a ZEA, logo após o intestino delgado e fígado participam da biotransformação (WINKLER et al., 2014). Estes apresentam a

capacidade de converter cerca de 90% do total de ZEA em α -zearalenol e numa proporção menor, em β -zearalenol (KIESSLING et al., 1984), sendo que em ruminantes, a meia vida de eliminação pode ser superior a 28 horas (DONG et al., 2010).

Embora α -zearalenol possua maior efeito estrogênico em relação a ZEA, sua taxa de absorção é muito baixa. Já a β -zearalenol, possui atividade tóxica sobre as células endometriais, mas sua afinidade para os receptores estrogênicos é pequena, fazendo com que os efeitos nocivos sejam com menor intensidade sobre o aparelho reprodutivo dos ruminantes. Vale ressaltar, que esta capacidade de alteração pode se tornar limitada e variar de acordo com o nível de ingestão, regime alimentar, tempo de contato, associação com outras micotoxinas passíveis de estarem presentes na silagem e outros distúrbios metabólicos que podem diminuir a taxa de conversão da ZEA em metabólitos menos agressivos (DÄNICKE; WINKLER, 2015; FINK-GREMMELS, 2008).

Ademais, para que a ZEA seja excretada no leite, as vacas precisam ser alimentadas com concentrações muito altas, ou seja, em torno de 12 mg/kg de peso vivo. Pois vacas dosadas com 0,33 mg de ZEA por quilograma de peso vivo não foi detectada contaminação pela micotoxina em amostras de leite (MALLMANN; DILKIN, 2007). Dessa forma, destaca-se que a ZEA não representa risco para a saúde humana, uma vez que a transferência dessa micotoxina para o leite é praticamente nula.

Em alimentos conservados, segundo Garon et al. (2006) observaram que a ensilagem não causou efeito sobre a concentração de ZEA, sendo monitorada durante nove meses de armazenamento. Corroborando com os achados de González Pereyra et al. (2014), em que descreveram uma alta estabilidade de ZEA em silagens. Esta estabilidade de ZEA durante a ensilagem pode ser justificada pelo fato de que a microbiota bacteriana e fúngica da silagem possui uma gama de microrganismos epifíticos capazes de biodegradar a ZEA em seus outros metabólitos como a α -ZEL e β -ZEL (KELLER et al., 2015; TINYIRO et al., 2011; YI et al., 2011). Como também documentado por Jensen et al. (2019), após 90 dias de conservação, não houve efeito sobre a quantidade de ZEA nem os níveis de α -ZEL e β -ZEL em silagens de milho.

Entretanto, no estudo de Whitlow e Hagler (2005) foi descrita uma incidência de 30% de contaminação ZEA em 461 amostras de silagem de milho e o nível médio de contaminação foi de 525 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de MS. Semelhanças foram relatadas por Driehuis et al. (2008) em que a infestação por ZEA foi de 50% nas amostras de silagem de milho, porém com concentrações médias inferiores, de 146 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Glamočić et al. (2019) observaram que a ocorrência de ZEA em silagens de milho foi detectada em todas as amostras analisadas, sendo que a concentração foi de até 538 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. De

acordo com Schmidt et al. (2015) a ZEA foi a micotoxina mais prevalente e foi encontrada em 238 amostras (72,8%) em concentrações variando de 10 a 1.830 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Em torno de 33 amostras apresentaram valores acima de 285 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, o qual pode ser considerado como valor crítico para silagens de milho. Ademais, os mesmos autores relataram que correlação entre temperatura e ZEA foi baixa ($r = 0,03$), indicando que esta variável não pode ser avaliada de maneira isolada.

No entanto, resultados distintos foram descritos por Cheli et al. (2013), em que dependendo do teor de MS das silagens, da duração da ensilagem e da temperatura, o desaparecimento de toxinas pode variar de 50% para ZEA a 100% para DON. Semelhanças são relatadas por Del Palacio et al. (2016), em que a maioria dos gêneros de fungos produtores de ZEA ocorreu em frequências mais altas em grãos de sorgo recém-colhidos e nas amostras dos primeiros meses de armazenamento, ocorrendo diminuição na ocorrência aos 180 dias de fermentação.

Santos et al. (2019) descreveram que à medida que o aumento do tempo de armazenamento reduziu a presença de *Fusarium*, sendo que a concentração mais alta de taninos nos grãos de sorgo foi capaz de reduzir a contaminação fúngica. Ainda, os mesmos autores sugeriram que 90 dias de conservação seria um tempo ideal para não aumentar a concentração da população fúngica.

Embora a legislação brasileira não estabeleça limites de tolerância para a ZEA, o que impossibilita ampliar a discussão sobre as diretrizes a serem seguidas para segurança humana e animal, na tentativa de garantir a segurança alimentar dos bovinos, LAMIC (2018) indicou limites máximos de ZEA por volta de 250 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ em alimentos para terneiros, machos adultos e fêmeas. Já na Europa, o valor de orientação para ZEA é 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (EUROPEAN COMMISSION, 2006).

De acordo com Schmidt et al. (2015) as relações entre micotoxinas e manejos de silagem não são fáceis de diagnosticar, pois no trabalho destes autores, não observaram correlação entre ZEA e variáveis de gerenciamento dos silos. Desta forma, a concentração de ZEA pode apresentar grande variação, sendo muito dependente da região, clima e época de semeadura e fatores de gestão do silo. Neste sentido, boas práticas agrônômicas como controle de pragas e doenças são bons parâmetros para minimizar o estresse ambiental e diminuir os riscos de contaminação de ZEA em silagens (SCHMIDT et al., 2015).

2.4.3 Fumonisina (FUMO)

As fumonisinas, são compostos heterociclícos oxigenados, produzidos por espécies de fungo do gênero *Alternaria* e *Fusarium*. Visto que as maiores produtoras da micotoxina são as *F. moniliformes*, entretanto as espécies de fungos *F. verticilloides* e *F. proliferatum* também são comumente produtoras de FUMOs (WHITLOW; HAGLER, 2005).

Existem dezenas de estruturas moleculares de FUMO isoladas, porém as de maiores relevâncias toxicológicas e produzidas em condições naturais consistem em FUMO B₁, B₂ e B₃, no qual, são classificadas como possíveis carcinógenos em humanos (grupo 2B) (IARC, 2002). Estas toxinas apresentam alta polaridade, resistente a altas temperaturas e ao processamento térmico, demonstra também ter, solubilidade em água e insolubilidade em solventes orgânicos. Além disso, a produção de FUMO é favorecida em temperaturas amenas (15 a 25 °C), alta umidade e a_w de 0,9 (MALLAMANN; DILKIN, 2007).

Consideradas como toxinas de campo, estão associados, segundo Driehuis (2011) com as doenças de podridão rosa e branca em plantas de milho. Para Fink-Gremmels (2005) a ocorrência das FUMO produzidas pelo gênero *Fusarium* spp. em alimentos, tem sido relacionada a ataques de fungos que acontecem na planta quando ainda estão na lavoura, podendo ser produzida durante o armazenamento se o tipo de material utilizado e a vedação do silo no processo da ensilagem não for realizada de forma eficiente.

O mecanismo de ação das FUMO está relacionado com a inibição da enzima acetil-transferase, responsável pela síntese de esfingolipídios, ou seja, lipídeos que compõe a membrana celular. Pois as FUMO são estruturas moleculares semelhantes a esfingosina que circundam o tecido nervoso. Estas moléculas são importantes na regulação de receptores de superfície celular para obter o bom funcionamento e a sobrevivência celular (MALLMANN; DILKIN, 2007).

A toxicidade desta micotoxina pode resultar em diminuição na biossíntese dos esfingolipídeos, causando paralisia, afetando o sistema imune, lesões no fígado e rins, ataxia em cavalos e edema nos pulmões em suínos. Já em ruminantes, as FUMO passam pelo rúmen sem sofrer alteração através da microflora ruminal (CALONI et al., 2000) ademais, qualquer que seja a espécie animal, o fígado é principal órgão alvo desta toxina.

Os bovinos parecem ser menos susceptíveis aos efeitos nocivos de FUMO. Podendo ser comprovado pelos estudos de Osweiler et al. (1993), que adicionou 15, 31 e 148 mg/kg de FUMO, durante 30 dias, nos alimentos de bezerros. Os autores não observaram alterações no desempenho dos animais havendo apenas leves alterações nas enzimas hepáticas. Em bezerros

alimentados com leite recebendo 1 mg/kg de peso corporal de FUMO, Mathur et al. (2001) observaram lesões hepáticas e renais, justificando que esta categoria pode ser mais sensível a exposição de FUMO.

Em relação a presença de FUMO no leite, a literatura sugere que a contaminação pode ser possível, porém, com baixa incidência. Diaz et al. (2000) demonstrou que a dosagem de 100 mg/kg de FUMO reduziu o consumo de ração e a produção de leite em bovinos leiteiros. Porém, segundo Scott et al. (1994) e Richard et al. (1996), após a administração de FUMO, por via oral ou intravenosa em vacas leiteiras, não houve detecção de resíduos da toxina no leite. E no que se refere a presença de FUMO em alimentos conservados com silagens, Toledo et al. (2020) descreveram que grau de compactação (600 kg/m^3 e 700 kg/m^3) e o tamanho de partícula usados no estudo não apresentaram influência sobre a presença de FUMO nas silagens ou tinham níveis abaixo do limite de detecção ($200 \mu\text{g.kg}^{-1}$) da micotoxina.

As espécies de *Fusarium* demonstram uma certa tolerância a baixas temperaturas no inverno e podem vir a colonizar resíduos de colheita. Estes, por sua vez, tornam-se boas fontes de inóculos para a sua sobrevivência quando as temperaturas aumentam (BINDER, 2010). De acordo com Driehus (2011) a frequência e os níveis de contaminação por FUMO foram maiores em amostras de silagem pós-fermentação quando comparado com amostras de materiais antes da ensilagem, sugerindo que a FUMO na silagem, apresenta uma certa estabilidade.

González Pereyra et al. (2008) observaram que os níveis de FUMO na silagem de milho variaram de 340 a $2.490 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de MS. Os mesmos autores relataram que as amostras de diferentes locais do silo tinham diferentes concentrações da toxina, isto é, as da camada superior e das paredes laterais tinham valores elevados de pH, o que favoreceu a produção de FUMO. Posteriormente, o mesmo grupo de estudos, avaliou diferentes tipos de silo, sendo eles trincheira ou sacos/bags, observando que o tipo de silo não apresentou efeito sobre os níveis de FUMO na silagem de milho (GONZÁLEZ PEREYRA et al., 2011).

Para Del Palacio et al. (2016) as FUMO foram detectadas em 40% das amostras recém-colhidas de grão de sorgo, com níveis variando $533 \mu\text{g.kg}^{-1}$ a $933 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Em estudo realizado por Horn et al. (2014) em relação a presença de FUMO em amostras de silagem de milho que seriam posteriormente fornecidas ao gado leiteiro da região Sul do Brasil, demonstraram que as FUMO foram as toxinas que apresentaram menor porcentagem de amostras contaminadas (11,4 a 34,4%) entre os anos de estudo, sendo que todos estavam abaixo do limite máximo tolerável quando comparado aos Estados Unidos ($30.000 \mu\text{g.kg}^{-1}$).

Toledo (2018) relatou que o valor máximo encontrado de FUMO em silagem de milho foi de $600 \mu\text{g/kg}$ com uma incidência de 42,5%. Já Aragon et al. (2011) analisaram 43 amostras

de silagem, sendo que apenas 11,6% apresentaram um resultado positivo para FUMO, com um nível máximo de contaminação de $989 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Aragón e Rodrigues (2009) analisaram uma baixa incidência de FUMO em silagem de milho, ou seja, das 227 amostras analisadas somente 6,6% foram positivas para esta toxina. Entretanto, diferente das citações acima a concentração média foi superior, relatando índices de $1519 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

Sobre os limites máximos toleráveis de FUMO em silagem, não se tem relatos na literatura. Porém, o LAMIC da Universidade Federal de Santa Maria, apresenta recomendações no que se refere aos alimentos em geral destinados para terneiros, machos adultos e fêmeas lactantes, indicando no máximo $2000 \mu\text{g.kg}^{-1}$, $5000 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e $3000 \mu\text{g.kg}^{-1}$, respectivamente. De acordo com as recomendações do Novisnki e Schmidt (2011) são considerados níveis de contaminação aceitáveis, valores inferiores a $1.000 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Já a orientação de recomendação para FUMO é 15 mg.kg^{-1} de MS de dieta para vacas leiteiras em lactação.

2.4.4 Desoxinivalenol (DON)

DON é uma micotoxina que faz parte dos tricotecenos tipo B, sendo produzida pelo gênero *Fusarium* principalmente *F. graminearum*, além de *F. sporotrichioides*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. roseum*, *F. tricinctum*, no qual, são pertencentes ao grupo das micotoxinas típicas de campo. É uma toxina conhecida, tradicionalmente como vomitoxina pois tende a causar vômitos em suínos. Além de vômito, pode causar perda de apetite, diarreia, problemas reprodutivos, redução da produção e maiores contagens de células somáticas no leite. Também podem surgir abortos, hemorragias além de alterações no sistema imunológico (JOBIM et al., 2001; SHARMA, 1993).

Em ruminantes, DON podem ser transformados em metabólitos menos tóxicos através dos microrganismos ruminais. É possível relatar que bovinos são menos vulneráveis do que monogástricos. Segundo observações feitas por Driehuis (2011), o efeito de DON em bovinos leiteiros ainda é inconclusivo. Porém, há relatos que com a ingestão de altos níveis pode diminuir o desempenho (WHITLOW et al., 1994). Outros impactos foram relacionados sobre a modificação na fermentação ruminal e por consequência redução do fluxo de proteína microbiana ao duodeno (DANICKE et al., 2005). Nos estudos de Jeong et al. (2010) quando incluíram $40 \mu\text{g/mL}$ de DON no líquido ruminal, houve redução na produção de gás, concentrações de ácidos graxos voláteis e $\text{NH}_3\text{-N}$.

Boguhn et al. (2010), quando avaliaram a inclusão de 0,36; 0,46; 5,76 e 6,90 mg/kg de DON na dieta não encontrou alterações sobre a microbiota ruminal *in vitro*. Similaridade foi

destacada por Hildebrand et al. (2012), ao adicionar 0,3; 3,4; e 4,4 mg/kg de DON na dieta, também não obtiveram nenhuma modificação. Ademais, devido à baixa transferência da toxina para o leite, DON não é considerado um contaminante que possa reduzir a segurança dos produtos lácteos e saúde humana (EFSA, 2004).

DON pode ser encontrado em diversos cereais e seus subprodutos, especialmente quando são cultivados no inverno, cujas condições de temperaturas mais baixas e alta umidade podem possibilitar o desenvolvimento dos fungos produtores de DON (MALLMANN; DILKIN, 2007). Apresenta estabilidade em temperaturas elevadas, solúvel em água e solventes polares. DON tem sido detectado em maior prevalência em cereais como trigo, cevada, centeio, aveia e milho, com menor frequência em arroz, triticale e sorgo (BELLUCO, 2014).

Micotoxinas produzidas por *Fusarium* estão frequentemente presentes em milho forrageiro recém-colhido (ECKARD et al., 2011; SCHOLLENBERGER et al., 2012), sendo este utilizado posteriormente como matéria-prima para a produção de silagem. De acordo com Driehuis et al. (2008) ao realizarem uma pesquisa sobre a presença de micotoxinas em ingredientes da dieta de bovinos leiteiros, observaram que a silagem de milho foi a principal fonte contaminante de DON e ZEA. Sendo que estas, muitas vezes podem ocorrer de forma simultânea, em amostras de silagem de milho, aumentando o risco de doenças nos animais pelo efeito de associação das micotoxinas e pela alta inclusão desse volumoso na alimentação de vacas leiteiras.

Mesmo que as silagens apresentem ambiente anaeróbico, o baixo pH do substrato e a presença de amins, segundo Gardiner et al. (2009) podem estimular a produção de DON por *F. graminearum*. Keller et al. (2012) relataram um aumento na toxina *Fusarium* após a ensilagem. Sendo que a presença de DON é mais pronunciada em locais submetidos à deterioração aeróbia (BORREANI; TABACCO, 2010). No entanto, a fase de pré-colheita parece ser a etapa mais importante para a contaminação da toxina *Fusarium*, pois está relacionada com vários fatores incluindo a região, clima e época de semeadura (DRIEHUIS, 2011).

Ao avaliar a presença de micotoxinas em silagem de milho de cinco regiões produtoras de leite do Brasil, Schmidt et al. (2015), descreveram que as concentrações de DON obtidas foram em média de 259 ± 124 µg/kg com incidência de 33,6 %. González Pereyra et al. (2011) relataram que os níveis de DON, tanto em silos do tipo trincheira como em saco/bags, estavam dentro do limite recomendado pela União Europeia. Para Toledo et al. (2020) o grau de compactação e o tamanho de partícula em silagem de milho não apresentou efeito sobre a presença de DON. Além destas variáveis, de acordo com Schmidt et al. (2015) a utilização da

temperatura como indicativo para detectar micotoxinas no silo, também não foi um bom preditor.

Em um estudo investigando a estabilidade de DON em silagem de trigo e milho, concluiu-se que a ensilagem apresentou a capacidade de reduzir DON (BOUDRA; MORGAVI, 2008). No entanto, em outros estudos nenhum efeito de ensilagem na concentração de DON foi detectado (LEPOM et al., 1988). Garon et al. (2006) estudaram o comportamento da concentração de DON durante nove meses de armazenamento. Relataram que DON permaneceu estável durante o período analisado, com níveis entre 150 e 200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Já para González Pereyra et al. (2008) houve aumento nas concentrações de DON na ensilagem. Similaridades foram descritas por Jensen et al. (2019), em que a ensilagem resultou em um aumento significativo de DON, sendo que o nível médio após 3 meses de fermentação foi 34% maior em comparação com o valor inicial.

Pode-se notar que, em relação à estabilidade do DON na silagem, há informações contraditórias. Tal efeito pode ser justificado pelo fato que, na maioria das condições, quando as plantas de milho apresentam algum tipo de dano antes da colheita, podem continuar produzindo uma alta concentração de DON na silagem, cerca de 920 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, pois quando se utilizou plantas saudáveis para serem ensiladas a incidência caiu para 3,1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (TELLER et al., 2012). Ou seja, na maior parte das condições, quando a planta possui infestação de DON, esta apresenta estabilidade em silagens ou apresenta baixa capacidade de ser degradada durante o período de conservação (DRIEHUIS, 2011).

Recentemente, Jensen et al. (2019) sugeriram que o aumento de DON durante o período de conservação pode ser devido a liberação da toxina quando estes estavam associados a parede celular das plantas (ROBLEDO et al., 2015; SCHAARSCHMIDT; FAUHL-HASSEK, 2018). Outra hipótese descrita foi que, as micotoxinas derivadas de *Fusarium* são capazes de sofrer alteração na sua estrutura química ao longo do armazenamento (LATORRE et al., 2015).

Ademais, é plausível a possibilidade de que, durante o processo de ensilagem ocorra uma conversão bioquímica parcial ou degradação dos derivados deoxynivalenol-3-glucoside (DON3G), 3-acetyl-deoxynivalenol (3-AcDON) e 15-acetyl-deoxynivalenol (15-AcDON), em sua estrutura primária, ou seja, de DON. No qual, esta biodegradação pode ser induzida por microrganismos epifíticos presentes na silagem (JENSEN et al., 2019).

Tanto o Canadá como os Estados Unidos adotam limite máximo de 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, para novilhas e vacas lactantes (FAO, 1997), entretanto, vale ressaltar que no Brasil não existe legislação específica para DON em silagens. Além do mais, a concentração de DON é bastante variável, sendo dependente das condições heterogêneas do ambiente.

3 CAPÍTULO I – TEMPO DE CONSERVAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DE SILAGENS DE SORGO DE PLANTA INTEIRA

Resumo: O objetivo do presente ensaio, foi avaliar o efeito dos diferentes tempos de conservação (45, 90, 180 e 360 dias) sobre o fracionamento expandido de carboidratos, proteína e a cinética de fermentação ruminal *in vitro* em silagem de sorgo de planta inteira. O delineamento utilizado, foi o inteiramente casualizado, constituindo de quatro tratamentos com quatro repetições cada. O tempo de conservação resultou em efeito quadrático nas variáveis MS, pH, ácido lático, ácido acético. Já para ácido propiônico, butírico, NH₃-N, perdas de gases e efluentes, foi observado incremento linear crescente em função do tempo de conservação. Em relação ao fracionamento dos carboidratos, observamos redução nas frações solúveis e aumento das insolúveis com maiores tempos de conservação das silagens. Para o fracionamento nitrogenado, o tempo de conservação acarretou em proteólise, aumentando as frações PA, PB2 e PB3. Houve uma melhora de 0,00884 % ao dia para DEGMS_48h. A maior produção de gás *in vitro* ficou entre 12 e 24 h. O aumento do período de conservação reduziu as frações de carboidratos solúveis da silagem, e eleva o nitrogênio não proteico e as proteínas potencialmente degradáveis no rúmen. Neste sentido, adaptações nas estimativas de formulações das dietas conforme o tempo de conservação do silo, são essenciais para se obter a maior eficiência produtiva.

Palavras-chave: Dieta. Fermentação. Fracionamento. Glicídios. Nitrogênio. Valor nutricional.

STORAGE TIME ON THE QUALITY OF WHOLE PLANT SORGHUM SILAGE

Abstract: The aim of this trial was to evaluate the effect of different storage times (45, 90, 180 and 360 days) on the expanded fractionation of carbohydrates, protein and the in vitro degradation kinetics in whole plant sorghum silage. The design used was completely randomized, consisting of four treatments with four replications each. The conservation time resulted in a quadratic effect on the variables DM, pH, lactic acid, acetic acid. For propionic acid, butyric acid, NH₃-N, gas losses and effluents, there was a linear increase over time. Regarding the fractionation of carbohydrates, we observed a reduction in soluble fractions and an increase in insoluble ones. For nitrogen fractionation, the conservation time resulted in proteolysis, increasing the PA, PB2 and PB3 fractions. There was an improvement of 0.00884% per day for DEGMS_48h. The highest in vitro gas production was between 12 and 24 h. In summary, increasing the storage period reduced the soluble carbohydrate fractions in the silage, but increased non-protein nitrogen and potentially degradable proteins in the rumen. In this sense, adaptations in the estimates of diet formulations according to the storage time of the silo are essential to obtain greater production efficiency.

Key words: Diet. Fermentation. Fractionation. Glycids. Nitrogen. Time. Nutritional value.

INTRODUÇÃO

As informações geradas até os dias atuais, são bastante pertinentes quando nos referimos que a intensa fermentação que ocorre até a fase de estabilidade da silagem, desacelera, mas não paralisa, isto é, a fermentação do material ensilado ocorre, de forma constante, até a abertura do silo (DER BEDROSIAN et al., 2012; FERRARETO et al., 2015). Sendo que esta fermentação permanente, ocasiona mudanças na composição nutricional e no valor nutritivo em silagens durante o armazenamento prolongado, como resultado da atividade bacteriana e enzimática (JUNGES et al., 2017).

Estas alterações são conhecidas em silagens de milho (planta inteira ou grão), em que, normalmente, aumentam o nitrogênio não proteico, melhora na digestibilidade da matéria seca e amido, com pouco ou nenhum efeito sobre a digestibilidade da fibra (FERRARETO et al., 2015; HRISTOV et al., 2020; KUNG JR. et al., 2018). No entanto, a extensão dessas transformações é menos estudada em silagens de planta inteira de sorgo (SSPI), especialmente no Brasil, devido aos dados serem escassos e divergentes.

Desta forma, torna-se relevante identificar o grau das alterações nutricionais que os diferentes tempos de conservação podem proporcionar no material ensilado, visto que, os sistemas de formulação de dietas para ruminantes demandam informações constantes e atualizadas sobre os mais diversos alimentos conservados, principalmente, no que diz respeito às suas frações de carboidratos e proteínas, bem como, sua degradabilidade. Neste sentido, podemos estimar de forma mais detalhada, o desempenho de vacas leiteiras, além de maximizar a eficiência da utilização dos nutrientes (FOX et al., 2004; HIGGS et al., 2015).

Dada a relevância da silagem de sorgo de planta inteira como fonte alternativa de volumoso, os resultados obtidos no estudo atual, podem servir de apoio para atualização do banco de dados ao modelo mecanicista Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS). Essa atualização visa auxiliar técnicos e produtores na elaboração de dietas com estimativas mais realistas, pois realizar análises detalhadas e rotineiras do conteúdo nutricional da silagem, ao longo dos diferentes tempos de conservação, torna-se oneroso.

Neste sentido, a hipótese a ser avaliada no presente estudo é de que o aumento do período de armazenamento modifica a composição nutricional da silagem de planta inteira de sorgo. Assim, o presente estudo, têm por objetivo avaliar o quanto, o tempo de conservação da silagem pode afetar o fracionamento expandido de carboidratos, proteína e cinética da degradação *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Grupo de Estudo em Aditivos na Produção Animal (GEAPA) da UFSM, localizado na região fisiográfica da Depressão Central, Rio Grande do Sul, Brasil, no período de outubro de 2016 a junho de 2018. A área experimental foi instalada na cidade de Santa Maria – RS, Brasil, coordenadas latitude 29,73'12'' Sul e longitude 53.71'82'' Oeste, a 95 metros de altitude. O solo da região é classificado como Argissolo Vermelho Distrófico, com horizontes A e Bt definidos (EMBRAPA, 2013). O clima é o Cfa, subtropical, sem estação seca e com verões quentes (PEEL et al., 2007).

Utilizou-se o híbrido comercial de sorgo (*Sorghum bicolor* L, Moench), ADV 2499BMR, em que a semeadura ocorreu no dia 02/12/2016. A área experimental total foi formada por 16 unidades experimentais. Cada unidade experimental possuía 5 linhas, espaçadas em 0,45 m, com 6 metros de comprimento, totalizando área total de 13,5 m². Como critério, as plantas de sorgo foram colhidas para a confecção da ensilagem quando as mesmas chegassem aos 28% de MS. Foram trituradas com tamanho média de partícula de 2 cm. O material vegetal, foi adequadamente compactado em silos experimentais com quatro sacos plásticos para a proteção contra a entrada de ar e luminosidade. A sequência dos sacos plásticos respeitou a seguinte ordem: o 1º saco com furos no fundo tinha por finalidade a saída dos efluentes e acomodação do material ensilado, o 2º saco continha areia lavada e seca em estufa, que foi utilizada para absorção dos efluentes; o 3º saco para melhor vedação dos demais e o 4º saco, escuro para proteção contra luminosidade. Os silos experimentais continham 8 kg de silagem e 2 kg de areia, sendo obtida densidade média das silagens de 840,65 kg de matéria verde (MV/m³).

A abertura dos silos experimentais foi pré-estabelecida conforme o tempo de conservação, sendo realizada após 45, 90, 180 e 360 dias de conservação. Com os silos abertos, foi retirada uma amostra de silagem de cada silo para determinação do pH conforme Silva e Queiroz (2002) e outra amostra para a extração por meio de prensagem do líquido da silagem (prensa Carver), sendo posteriormente utilizado para análise do nitrogênio amoniacal (N-NH₃) pelo método de calorimetria de acordo com Weatherburn (1967). As perdas oriundas do processo fermentativo como efluentes e gases, foram calculadas de acordo com fórmulas citadas por Jobim et al. (2007).

Uma amostra (aproximadamente 200g) de silagem foi seca em estufa com circulação forçada de ar com temperatura média de 55 °C, até atingir peso constante. Posteriormente, a amostra foi processada em moinho de facas com peneira de malha de 1 mm para análises

bromatológicas e 2 mm para o ensaio de degradabilidade. A matéria seca (MS) total foi determinada em estufa a 105 °C durante um período mínimo de 8 horas, a matéria mineral (MM) através de incineração em mufla a 550 °C durante 4 horas. A proteína bruta (PB) foi determinada pelo método micro Kjeldhal, segundo AOAC (1995), e o extrato etéreo (EE) de acordo com AOCS (2005).

Os níveis de fibra em detergente neutro (FDN) foram obtidos com o uso de α -amilase termoestável (Termamyl 120L, Novozimes Latin America, LTDA), realizada com auxílio de autoclave, conforme técnica adaptada por Senger et al. (2008) e o conteúdo de fibra em detergente ácido (FDA) e o teor de lignina (LDA), realizadas de acordo com a metodologia de Van Soest et al. (1991), sendo a LDA extraída com o uso de ácido sulfúrico 72 %. Os teores de hemicelulose (HEM) e celulose foram obtidos por diferenças entre os teores (FDN e FDA) e (FDA e LDA), respectivamente.

O conteúdo de açúcares solúveis (AS) na MS foi determinado pela extração com etanol 70° e estimado por colorimetria (HALL, 2000). Os ácidos acético, propiônico e butírico produzidos durante a fermentação foram mensurados conforme Tangerman e Nagengast, (1996). O ácido láctico foi submetido ao processo de derivatização com auxílio N-terc-butilmetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida (OMS-OLIUI et al., 2011). As concentrações de todos os ácidos foram analisadas em cromatografia gasosa equipada com detector de ionização de chama (GC-FID), Varian Star 3400CX (CA, EUA). Para a quantificação do teor de amido total das silagens, a amostra foi submetida a digestão enzimática com amilase (Termamyl 120L), amiloglicosidase (AMG 300L) e protease (Flavourzyme 500L). Os açúcares resultantes dessa digestão foram quantificados em espectrofotômetro a $\lambda = 505$ nm de absorbância, utilizando o kit glicose oxidase-peroxidase (GOP) como reativo de cor (WALTER et al., 2005).

Para a determinação de nitrogênio não proteico (NNP), assim como as equações utilizadas para calcular o fracionamento do nitrogênio, foram analisados de acordo com Licitra et al. (1996), no qual, as descrições das frações são as seguintes: PA= nitrogênio não proteico, PB1= constituída de proteína solúvel em tampão borato fosfato, mas que precipita em TCA, sendo rapidamente degradável no rúmen; PB2= constituída de proteína insolúvel em tampão-borato presente no conteúdo celular e com taxa de degradação intermediária; PB3= proteína insolúvel e lentamente degrada no rúmen, PC= é a proteína insolúvel no rúmen e indigestível no trato gastrintestinal.

Para o fracionamento dos carboidratos (CHO) foi seguida a metodologia de Lanzas et al. (2007), os quais descrevem as frações do método expandido em: CA1= ácidos voláteis

(acético, propiônico, butírico), CA2= ácido láctico, CA3= ácidos orgânicos, CA4= açúcares, CB1= amido, CB2= fibra solúvel, CB3= fibra digestível, CC= fibra indigestível.

As análises de degradabilidade dos gases *in vitro* foram realizadas de acordo com técnicas adaptadas de Schofield et al. (1994) e Theodorou et al. (1994). As amostras (0,5 g) foram pesadas em frascos de fermentação com capacidade de 100 mL. Quarenta mL de meio de cultura (tampão) e 10 mL de líquido ruminal filtrado por duas camadas de gaze de algodão foram adicionados sob injeção contínua de CO₂ e mantidos em banho-maria a 39 °C. Após a inoculação do líquido ruminal, os frascos foram colocados em banho-maria a 39 °C com agitação constante por 96 h. A produção de gás foi medida em 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 72 e 96 h. Os cálculos dos parâmetros da cinética de produção de gás foram realizados usando SAS[®] University Edition version. O líquido ruminal foi coletado de dois bovinos fistulados com cânulas de 10 cm. O uso dessa técnica foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA) sob o protocolo número 5439180417. Durante a coleta, foi mantido em temperatura controlada de 39 °C em banho-maria. Os animais foram adaptados à silagem de sorgo durante um período de 10 dias antes da coleta do fluido ruminal. Os dados foram ajustados ao modelo de logística unicompartimental descrito por Schofield et al. (1994), $V_t = V_f \times (1 + \exp(2 - 4 \times S \times (t - L)))^{-1}$, onde V_f é o volume final de gás (ml g⁻¹ de MO) no tempo t , S é a taxa de degradação (h⁻¹), e L é o tempo de colonização (h).

A estimativa da degradabilidade da matéria orgânica (DMO) de amostras usando a produção de gás (GP) em 24 h foi estimada usando as equações descritas por Menke et al. (1979): $DMO (g \text{ kg}^{-1} \text{ MS}) = 148,8 + (8,89 \times PG24) + (0,45 \times PB) + (0,0651 \times CB)$. Onde, $PG24$ é a produção líquida de gás (ml g⁻¹ MO) às 24 horas de incubação, PB é proteína bruta (g / kg de MS), CZ é cinza (g / kg de MS). A energia líquida para lactação foi calculada como: $EL (MJ/kg \text{ MS}) = 0,54 + (0,0959 \times PG24) + (0,0038 \times PB) + (0,001733 \times EE)$. Em que GP é a produção de gás (ml / 200 mg MS), $GP24$ é a produção líquida de gás (ml / 200 mg de MS) às 24 h de incubação, PB é a proteína bruta (g / kg de MS), EE é o extrato etéreo (g / kg de MS), CZ é a cinza (g / kg de MS). A degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DEGMS_48h) foi estimada aplicando a metodologia de Tilley e Terry (1963), adaptado por Goering e Van Soest (1970). A degradabilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DEGFDN_48h) foi determinada usando a seguinte equação: $DEGFDN_{48h} = 100 - (FDN \text{ remanescente em } t = 48 \text{ h} / FDN \text{ em } t = 0 \text{ h}) \times 100$.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e 4 repetições cada. O modelo experimental foi: $y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$, onde y_{ij} = valor observado na

unidade experimental que recebeu o tratamento *i*, repetição *j*; μ = efeito geral da média; t_i = efeito do tratamento *i*; e_{ij} = erro aleatório (resíduo). Foi realizada análise de regressão e correlação de Pearson, sendo que a escolha dos modelos foi baseada no nível de 5% de significância. As análises dos dados foram realizadas através do pacote estatístico R software (R Core Team).

RESULTADOS

O período de armazenamento reduziu em 0,01072 g kg⁻¹ de MS por dia o teor de matéria seca da silagem (Tabela 1). O teor de nitrogênio amoniacal (NH₃-N) aumentou 0,08700 g kg⁻¹ de MS a cada dia de conservação, enquanto que o o tempo de armazenamento afetou de maneira quadrática o pH da silagem, com valores mínimos aos 26 dias de conservação.

A concentração de ácido láctico apresentou comportamento quadrático, com o ponto de máxima aos 218 dias de conservação, com concentração de 54,78 g kg⁻¹ de MS. Foi observado efeito quadrático para o ácido acético, atingindo seu maior nível aos 163 dias de conservação, com valor de 17,45 g kg⁻¹ de MS. A concentração dos ácidos propiônico e butírico apresentaram incremento linear conforme aumentou o tempo de armazenamento, com acréscimos de 0,00300 e 0,00210 g kg⁻¹ de MS por dia de conservação, respectivamente.

Tabela 1 – Parâmetros fermentativos e perdas de silagens de planta inteira de sorgo, submetidas à diferentes tempos de conservação

Variáveis	Tempo de Conservação (dias)					EPM	P valor	
	0	45	90	180	360		L	Q
MS ^I	28,49	30,40	29,23	27,34	26,71	0,81	0,012	0,206
NH ₃ -N ^{II}		22,07	25,31	29,14	49,22	0,68	< 0,001	0,221
pH ^{III}		3,62	3,84	3,96	3,95	0,03	0,009	0,001
Ácido láctico ^{IV}		19,50	46,50	48,41	39,00	1,95	0,520	0,003
Ácido acético ^V		13,90	18,21	17,76	14,20	0,77	0,258	0,045
Ácido prop ^{VI}		4,00	4,18	3,98	5,03	0,28	0,040	0,361
Ácido but ^{VII}		1,39	2,05	1,55	2,19	0,22	0,045	0,847
Efluentes ^{VIII}		9,67	11,5	16,58	17,63	0,18	0,002	0,405
PG ^{IX}		7,80	15,8	18,5	18,3	0,68	0,199	0,046

Ácido acético em g/Kg⁻¹ MS; Ácido but= ácido butírico em g/Kg⁻¹ MS; Total ácidos em g/Kg⁻¹ MS; Ácido láctico em g/Kg⁻¹ MS; Ácido prop= ácido propionico em (g/Kg⁻¹ MS); Effluents= produção de efluentes em (g/kg MV ton⁻¹); MS= matéria seca em g/Kg⁻¹ MS; NH₃-N= nitrogênio amoniacal em (g kg⁻¹ of total nitrogen); PG= perda por gases em g/Kg⁻¹ MS.

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

$$^IY = 30,18696 - 0,01072DIA \quad (R^2 = 0,48; CV = 5,16\%);$$

$$^{II}Y = 16,52942 + 0,08745DIA \quad (R^2 = 0,95; CV = 8,36\%);$$

$$^{III}Y = 3,45944 + 0,004368 DIA - 0,00008254DIA^2 \quad (R^2 = 0,87; CV = 1,63\%)$$

$$^{IV}Y = 6,22222 + 0,44519DIA - 0,00102DIA^2 \quad (R^2 = 0,64; CV = 12,48\%);$$

$$^VY = 12,167 + 0,0652DIA - 0,0002DIA^2 \quad (R^2 = 0,76; CV = 14,44\%);$$

$$^{VI}Y = 3,76522 + 0,0032DIA \quad (R^2 = 0,44; CV = 10,48\%);$$

$$^{VII}Y = 1,4989 + 0,0021546DIA \quad (R^2 = 0,34; CV = 12,48\%);$$

$$^{VIII}Y = 0,94186 + 0,00360 DIA \quad (R^2 = 0,29; CV = 41,59\%);$$

$$^{IX}Y = 3,3824 + 0,1396DIA - 0,0003DIA^2 \quad (R^2 = 0,33; CV = 25,88\%)$$

As perdas por efluentes aumentaram linearmente em função do tempo de conservação, na ordem de 0,00360 g kg⁻¹ de MS por dia de conservação. As perdas por gases (PG) apresentaram comportamento quadrático, com valor máximo de 19,53g kg⁻¹ de MS aos 216 dias de conservação.

Os carboidratos totais não foram alterados pelos diferentes tempos de conservação, cuja média foi de 825,81 g kg⁻¹ de MS (Tabela 2). Os carboidratos não fibrosos (CNF) apresentaram concentração mínima de 372,02 g kg⁻¹ de MS aos 207 dias de conservação, expressando comportamento quadrático crescente. As frações CA1 e CA2, também expressaram comportamento quadrático decrescente, com máxima concentração de 42,86 e 73,22 g kg⁻¹ de MS aos 224 e 265 dias, respectivamente. A fração CA4 apresentou redução linear de 0,06482 g kg⁻¹ de MS por dia de conservação. As frações CB1, CB2 e CB3 também apresentaram diminuição linear de 0,07556, 0,2277 e 0,11188 g kg⁻¹ de MS por dia de conservação, respectivamente. Já a fração CC apresentou incremento na ordem de 0,1657 g kg⁻¹ de MS por dia de conservação.

Tabela 2 – Carboidratos totais (CHO), carboidratos não fibrosos (CNF) e fracionamento glicídico em silagens de sorgo de planta inteira submetido a diferentes tempos de conservação

Variáveis (g/Kg ⁻¹ MS)	Período de Conservação (dias)					EPM	P valor	
	0	45	90	180	360		L	Q
CHO	839,36	817,29	821,99	826,10	827,32	2,81	0,7687	0,1688
CNF ^I	427,98	418,57	380,06	376,39	403,20	17,77	0,4265	0,0453
CA1 ^{II}	-	19,35	24,30	24,00	21,52	0,65	0,1134	0,0054
CA2 ^{III}	-	21,00	46,50	48,00	39,00	2,90	0,0707	0,0006
CA3	-	-	-	-	-	-	-	-
CA4 ^{IV}	45,90	12,96	11,95	11,45	9,49	0,58	0,0288	0,0684
CB1 ^V	249,32	212,22	208,82	203,62	208,32	5,97	0,0244	0,1287
CB2 ^{VI}	143,45	166,71	79,32	73,77	65,45	11,68	0,5164	0,0473
CB3 ^{VII}	302,96	291,68	302,73	293,89	259,94	8,20	0,0498	0,4929
CC ^{VIII}	108,42	109,04	139,20	155,82	164,19	7,10	0,0016	0,0576

CA1= soma dos ácidos graxos voláteis (acético + propiônico + butírico); CA2= ácido láctico, CA3= outros ácidos orgânicos; CA4= açúcares solúveis; CB1= amido; CB2= fibra solúvel; CB3= fibra digestível; CC= fibra indigestível;

EPM= erro padrão da média; L=linear; Q= quadrático

^IY= 430,84431 - 0,56776DIA + 0,00137DIA² (R²= 0,50; CV= 5,69%);

^{II}Y= 17,83500 + 0,22372DIA - 0,00049991 DIA² (R²=0,77; CV=28,70%);

^{III}Y= 10,004 + 0,4771DIA - 0,0009 DIA² (R²= 0,89; CV= 23,30%);

^{IV}Y= 27,10056 - 0,06482DIA (R²= 0,69; CV= 20,11%);

^VY= 226,66 - 0,07556 DIA (R²=0,76; CV= 23,33%);

^{VI}Y= 131,4378 - 0,2277DIA (R²=0,48; CV= 25,94%);

^{VII}Y= 305,343 - 0,11188DIA (R²=0,33; CV= 8,61%)

^{VIII}Y= 112,57 + 0,1657DIA (R²=0,73; CV= 8,61%)

A concentração de PB e PB1 não se alterou nos diferentes tempos de conservação (Tabela 3). A fração PBA aumentou linearmente na ordem de 0,26516 g kg⁻¹ de MS por dia de conservação, correlacionando-se com os teores de N-NH₃ descritos anteriormente. Houve efeito do processo da ensilagem para os períodos mais prolongados de conservação, com ganhos lineares de 0,18966 e 0,17559 g kg⁻¹ de MS das frações PB2 e PB3, respectivamente, além de uma diminuição gradual de 0,26331 g kg⁻¹ de MS por dia para a fração PBC (Tabela 3).

Tabela 3 – Proteína bruta e fracionamento nitrogenado em silagens de sorgo de planta inteira submetido à diferentes tempos de conservação

Variáveis (g/Kg ⁻¹ MS)	Período de Conservação (dias)					EPM	P valor	
	0	45	90	180	360		L	Q
PB	86,38	95,48	88,63	91,70	80,47	0,57	0,3023	0,1781
PA ^I	185,69	285,82	292,57	309,83	317,73	16,23	0,0209	0,1059
PB1	33,28	37,23	47,33	39,15	38,95	5,87	0,7492	0,3299
PB2 ^{II}	424,82	387,42	380,64	425,81	469,11	12,07	0,0210	0,1052
PB3 ^{III}	116,19	121,09	138,06	154,48	178,08	11,19	0,0008	0,3522
PBC ^{IV}	240,00	135,04	141,40	145,90	102,33	8,05	0,0200	0,1949

PA= nitrogênio não proteico (g kg⁻¹NT); PB= proteína bruta (g kg⁻¹MS); PB1= proteína rapidamente degradável (g kg⁻¹ NT), PB2 = proteína com degradação intermediária (g kg⁻¹ NT), PB3= proteína com lenta degradação (g kg⁻¹ NT), PC= proteína insolúvel e indigestível no trato gastrointestinal (g kg⁻¹ NT).
EPM= erro padrão da média. L=linear; Q= quadrático;

^IY= 242,53763 + 0,26513DIA (R²=0,76; CV=13,56%);

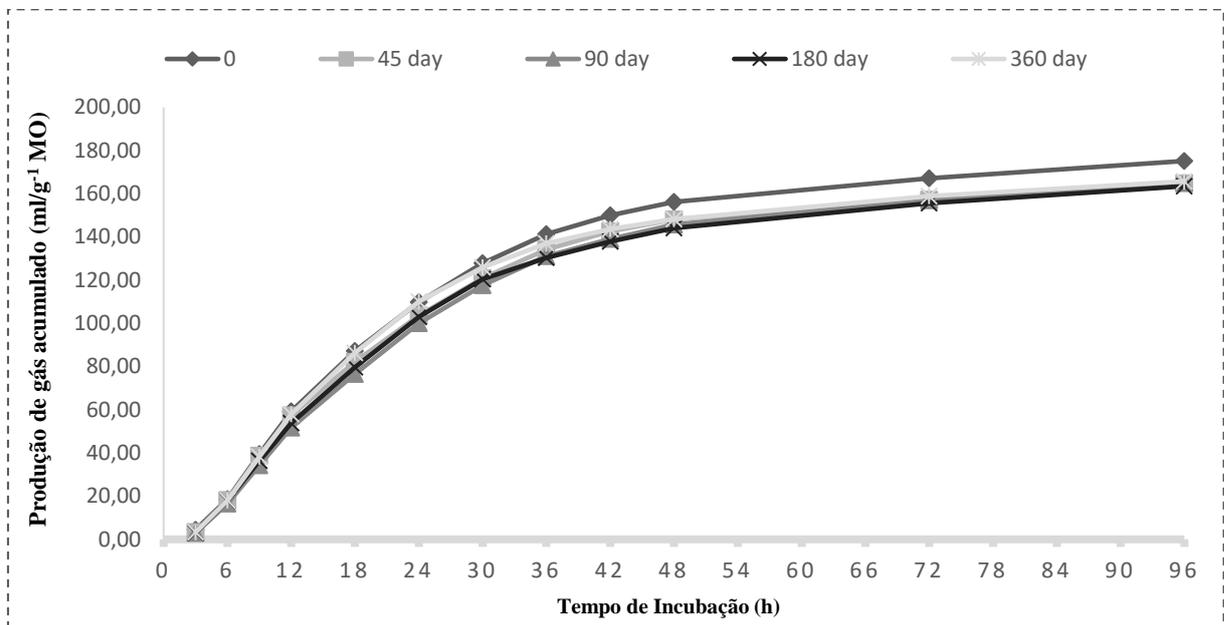
^{II}Y= 391,956+ 0,18966 DIA (R²= 0,50; CV= 5,60%);

^{III}Y= 117,87 + 0,17559 DIA (R²= 0,78; CV= 18 %);

^{IV}Y= 188,48325 - 0,26331 DIA (R²= 0,51; CV=23,91%).

A produção cumulativa de gás ruminal *in vitro*, com volume final médio entre os tratamentos foi de 155,98 ml g⁻¹ de MO (Figura 1). O Vf apresentou comportamento quadrático crescente, com valor mínimo de 150,67 ml g⁻¹ de MO aos 224 dias de conservação (Tabela 4). Comportamentos similares foram observados para os diferentes tempos de incubação, PG 24h, PG 48h e PG 96h, com valores de produção mínima de 67,79 ml g⁻¹ de MO, 114,84 ml g⁻¹ de MO 143,05 ml g⁻¹ de MO aos 169, 179 e 205 dias de conservação, respectivamente.

Figura 1 – Produção cumulativa de gás *in vitro* (ml g⁻¹ de MO), ao longo de 96 horas de incubação de silagens de planta inteira de sorgo submetidas à diferentes tempos de estocagem



A taxa de degradação (S) aumentou linearmente na ordem de 0,000010 % a cada dia de conservação (Tabela 4). O tempo necessário para atingir a metade da produção máxima de gás (T1/2), diminuiu linearmente 0,00679 horas para cada dia de conservação. As variáveis L, DMO, mantiveram-se constantes ao longo do tempo de conservação, apresentando média de 3,00 h e 379,76 g kg⁻¹, respectivamente (Tabela 4). O tempo de conservação não alterou DEGMO_48h e DEGFND_48h. A DEGMS_48h apresentou um incremento de 69,41% no dia 0 para 73,02% após 360 dias de conservação, o que representa uma elevação na ordem de 0,00884 % por dia de conservação (Tabela 4).

Tabela 4 – Volume de gás produzido em diferentes tempos de incubação, parâmetros da cinética de degradação *in vitro* e digestibilidade *in vitro* das silagens de sorgo de planta inteira à submetidos a diferentes tempos de conservação

(continua)

Variáveis (ml/g ⁻¹ MO)	Período de Conservação (dias)					EPM	P valor	
	0	45	90	180	360		L	Q
Vf ^I	164,05	154,95	154,70	151,92	154,30	1,82	0,1945	0,0252
S ^{II}	0,0316	0,0316	0,0306	0,0325	0,0349	1,06	0,0031	0,2931
L	2,80	2,64	3,30	3,14	3,13	1,79	0,7374	0,7272
t1/2 (h) ^{III}	21,93	21,96	22,63	21,37	19,93	0,38	0,0032	0,2921

Tabela 4 – Volume de gás produzido em diferentes tempos de incubação, parâmetros da cinética de degradação *in vitro* e digestibilidade *in vitro* das silagens de sorgo de planta inteira à submetidos a diferentes tempos de conservação

Variáveis (ml/g ⁻¹ MO)	Período de Conservação (dias)					EPM	P valor	
	0	45	90	180	360		L	Q
	PG 12h	41,29	39,49	37,98	37,82		40,87	1,99
PG 24h ^{IV}	80,04	75,93	72,53	74,58	79,71	1,36	0,3324	0,0424
PG 48h ^V	124,70	117,91	115,33	116,35	121,97	1,80	0,5006	0,0107
PG 96h ^{VI}	155,42	146,79	145,65	144,37	148,18	2,17	0,5899	0,0126
OMD	386,30	379,97	370,66	375,64	386,27	4,29	0,4231	0,0783
DEGMO_48h	69,50	68,07	71,97	67,62	72,60	1,18	0,066	0,171
DEGMS_48h ^{VII}	69,41	68,42	71,86	71,94	73,02	1,12	0,031	0,129
DEGFDN_48h	58,80	64,23	55,11	61,14	61,75	3,27	0,135	0,858

DEGFDN_48h= degradabilidade da fibra em detergente neutra em 48 horas (%); DEGMO_48h= degradabilidade da matéria orgânica em 48 horas (%); DEGMS_48h= degradabilidade da matéria seca em 48 horas (%); DMO= digestibilidade da matéria orgânica (g kg⁻¹ MS); L = tempo de colonização (horas); PG= produção de gás; S= taxa de fermentação (h⁻¹); t1/2 (h) = metade da produção máxima de gás; Vf = volume final.

EPM= erro padrão da média; L=linear; Q= quadrático;

^IY= 161,11325 - 0,09302DIA + 0,00020728DIA² (R²= 0,36; CV= 2,78);

^{II}Y= 0,03068 + 0,00001096DIA (R²=0,43; CV= 5,19);

^{III}Y= 22,54278 - 0,00679DIA (R²= 0,42; CV= 4,48);

^{IV}Y= 78,52789 - 0,06345DIA + 0,00018717 (R²=0,29; CV= 5,73);

^VY= 122, 24416 - 0,08222DIA+ 0,00022841 DIA² (R²= 0,37; CV= 3,42);

^{VI}Y= 152,48994 - 0,09190 + 0,00022388DIA² (R²= 0,36 CV= 2,77);

^{VII}Y= 68,90279 + 0,00884 DIA (R²= 0,33; CV= 4,20%).

DISCUSSÃO

A diminuição do teor de MS em SSPI ocasionada pelo maior período de conservação, está relacionado com as perdas de efluentes e gases, concomitantemente com a redução de CNF, CB1, CB2, CB3, aumento do conteúdo de NH₃-N e o ácido propiônico. Isto pode ter sido parcialmente causado pela produção de água como subproduto através da biotransformação de 1,2 propanodiol em ácido propiônico, pelas bactérias *L. diolivorans* e *L. buchneri* (ZHANG et al., 2010). O aumento na concentração de ácido propiônico, observado no presente estudo, pode ter contribuído para a diminuição no teor de MS e elevação nas perdas por efluentes em função do tempo de conservação.

Esses resultados demonstram que o processo fermentativo não é interrompido, e que o extravasamento do conteúdo intracelular para o meio externo, por meio do mecanismo de

lixiviação, produção de CO₂ e etanol, podem influenciar no valor nutricional da silagem. Segundo McDonald et al. (1991), os efluentes contêm grandes quantidades de compostos orgânicos, tais como: açúcares redutores, ácidos orgânicos e proteínas. Estes são os compostos com maior valor nutricional da massa ensilada, por esta razão é que o gerenciamento da ensilagem deve ser no sentido de reduzir ao máximo as perdas durante a fermentação (BORREANI et al., 2018).

A razão pelo qual o prolongar do tempo de conservação resultou em silagens com aumento na concentração de ácido propiônico, especialmente após o aumento quadrático do ácido láctico e acético, se deve em parte, pela capacidade de algumas bactérias como a *L. Diolivorans* e *Clostridium propionicum* em metabolizar estes ácidos através da rota do acrilato em propionato (KROONEMAN et al., 2002; KUNG et al., 2018). Além disso, por um mecanismo de defesa e quantidade limitada de carboidratos solúveis em água, estas mesmas bactérias heterofermentativas, podem utilizar em meio anaeróbio o ácido láctico como fonte de energia, acarretando em risco potencial de degradação da silagem (DIEPERSLOOT et al., 2021; OUDE ELFERINK et al., 2001; SCHEIN et al., 2018).

Paralelamente, o tempo de conservação refletiu em efeito quadrático crescente sobre os valores de pH. Associamos este efeito, com o aumento do ácido propiônico e NH₃-N, pois ambas variáveis apresentaram correlação positiva de ($r = 0,89$; $P = 0,0002$) e ($r = 0,60$; $P = 0,001$) respectivamente, com o pH da silagem. Caracterizando-se também pelo ácido propiônico ser um ácido mais fraco ($pK_a 4,9$) em relação aos demais ácidos produzidos. Além disso, de acordo com Henderson (1993), com o aumento da produção de NH₃-N resultante da proteólise, ocorre a liberação de íons de amônio, no qual, pode ter sido uma causa adicional para a ocorrência de um leve efeito tamponante, não resultando em aumentos importantes no pH (KLEINSCHMIT; KUNG, 2006; OUDE ELFERINK et al., 2001).

Observamos aumento linear nos níveis de ácido butírico ao longo do tempo de conservação, sendo que concentrações elevadas podem ser indicativas de crescimento de microrganismos indesejáveis, pois são compostos característicos provenientes da via metabólica clostridial (PAHLOW et al., 2003; ROOKE; HATFIELD, 2003). Porém, mesmo após 360 dias de armazenamento, a concentração relatada no presente estudo, não apresentou comprometimento sobre a qualidade da SSPI, pois os valores situaram-se abaixo dos propostos por McDonald et al. (1991).

A degradação das proteínas e acúmulo contínuo de NH₃-N observado ao longo do tempo de conservação, pode estar relacionado à atividade proteolítica durante o processo fermentativo.

No presente estudo é possível constatar que a proteólise foi mais intensa após 180 dias de conservação, corroborando com os achados de Gerlach et al. (2018) e Fernandes et al. (2020).

De acordo com Junges et al. (2017), o principal motivo pelo aumento da solubilidade do nitrogênio em silagens é a degradação por proteases bacterianas, seguida por enzimas presentes no grão. Além disso, conforme relatado por Ferraretto et al. (2015) e Fernandes et al. (2020), o efeito do tempo de conservação sobre o aumento contínuo nas concentrações de $\text{NH}_3\text{-N}$, foram associados positivamente com a degradabilidade ruminal do amido *in vitro*, indicando através destas mudanças, que a atividade microbiana no silo em SSPI persiste, mesmo quando o pH está abaixo de 4.

Com base no fracionamento expandido de CHO proposto por Lanzas et al. (2007), realizado no estudo atual, verificamos que o tempo de conservação afetou principalmente a fração CA4, constituída por açúcares solúveis. Atribuímos tal efeito ao consumo destes açúcares como fonte de substrato pela microbiota epifítica, para a conversão de produtos pertencentes a fração CA1 (MCDONALD et al., 1991). Estes resultados foram semelhantes aos observados por Fernandes et al. (2020) e Duvnjak et al. (2019), os quais, verificaram que a concentração de carboidratos solúveis em água, diminuíram 70% após 15 dias de armazenamento. Tal fato, também foi descrito por Naeini et al. (2014), que observaram redução drástica da concentração de carboidratos solúveis em água nos primeiros 30 dias (69,3 g/kg) de fermentação, e que continuou a cair gradualmente aos 60 dias (27,5 g/kg).

O prolongamento do tempo de conservação, acarretou em diminuição linear da fração CB1, sendo constituída pelo amido da planta. Santos et al. (2019) e Diepersloot et al. (2021) justificam este resultado pelo aumento da atividade proteolítica de silagens armazenadas por longos períodos, em comparação com aquelas silagens armazenadas por menos tempo. Possivelmente fornecendo aos microrganismos maior acesso aos grânulos de amido, resultando em degradação e conseqüentemente consumo contínuo do mesmo até os 360 dias de conservação.

A redução linear conferida pela ação do tempo de conservação em relação a fração CB2 representada pelas fibras solúveis e a fração CB3 constituída de fibra digestível, é causada em parte, pela hidrólise ácida e solubilização contínua da fibra digestível e pela ação conjunta de enzimas bacterianas, ocasionando degradação da hemicelulose, durante o decorrer do tempo de conservação (HENZ et al., 2020; MCDONALD et al., 1991; SNIFFEN et al., 1992). No estudo atual, está justificativa é reforçada também pela diminuição gradual do conteúdo da hemicelulose, redução quadrática na concentração de CNF, e a correlação negativa ($r = -0,70$; $P = 0,003$) entre CB2 e CA1, no qual as fibras solúveis e digestíveis, provavelmente foram

consumidas como fonte de substrato para a produção de CA1 no prolongar do tempo de conservação.

O mecanismo por trás do aumento da fração CC ao longo do tempo de conservação pode estar relacionado a redução linear das frações CB2 e CB3, aumentando desta forma a proporção relativa da fibra indigestível em SSPI. Resultados semelhantes foram encontrados por Hristov et al. (2020), em que relataram aumento linear na concentração da lignina com o prolongar do tempo de conservação. O aumento no teor de lignina reduz a ingestão de matéria seca pelos animais, sendo capaz de afetar o enchimento físico ruminal, reduzindo diretamente o desempenho animal (MERTENS, 1987), além de afetar a digestibilidade da MS.

A diminuição de frações de fibra potencialmente degradáveis influenciadas pelo tempo de conservação, confirma a necessidade de realizar ajustes contínuos nas formulações de dietas, a fim de estimular a máxima produção de proteína microbiana e ácidos graxos voláteis no rúmen, evitando desta forma, a redução na produção e no teor de gordura do leite (HIGGS et al., 2015).

Mudanças relevantes foram encontradas em SSPI com o prolongar do tempo de conservação, em relação ao fracionamento proteico proposto por Licitra et al. (1996). Como podemos observar na Tabela 3, houve acúmulo contínuo da fração PA, demonstrando claramente que houve solubilidade constante de proteínas e degradação de aminoácidos. A concentração de PA foi positivamente correlacionada ($r = 0,78$; $P = 0,004$) com o acúmulo constante de $\text{NH}_3\text{-N}$ (Tabela 1). Este efeito pode ser atribuído, principalmente, a um aumento da hidrólise durante a fermentação microbiana (BARON, 1986), uma vez que, parte da matriz da proteína de reserva, a kafirina, que circunda o amido do endosperma no grão de sorgo, mesmo com elevada hidrofobicidade, pode se susceptível a degradação (HOFFMANN et al., 2011; KUNG et al., 2014; WONG et al., 2009).

Embora, o presente estudo não tenha quantificado o teor de kafirina, ou seja, o arranjo proteico do grão de sorgo, possivelmente, esta proteína confere baixa capacidade de degradação através da ação bacteriana durante período inicial de fermentação. Entretanto, o tempo de conservação pode apresentar potencial em atenuar tal efeito, além de proporcionar maior acesso as bactérias amilolíticas do rúmen aos grânulos de amido antes envoltos pela matriz proteica (FERRARETTO et al., 2015; GIUBERTI et al., 2014).

Os dados conferidos no estudo atual, em relação a fração PB2 representada pela proteína ligada ao FDN e a fração PB3 constituída de proteína insolúvel, prolaminas e extensinas com lenta degradação no rúmen, demonstrou elevação ao longo do tempo de conservação, o quê, potencialmente, poderia ser associado a maior fração de proteínas fluindo para o intestino do

animal (FOX et al., 2004; SNIFFEN et al., 1992). Além disso, o aumento da fração PB3 pode estar relacionada à hidrólise da Kafirina, a qual pertence ao grupo das prolaminas (VAN AMBURGH et al., 2015).

Podemos observar que a redução ocasionada na fração PBC pelo efeito do tempo de conservação, pode melhorar consideravelmente o valor nutricional da SSPI, uma vez que esta fração apresenta alta resistência ao ataque de enzimas microbianas no silo e é indigestível no trato gastrointestinal de ruminantes, não possuindo valor da proteína alimentar relevante (DAS et al., 2015; SNIFFEN et al., 1992). Determinando as características da fração nitrogenada da SSPI nos permite estimar seus respectivos conteúdos, bem como a quantidade de escape de nitrogênio ruminal (DAS et al., 2015). Através do conhecimento das diferentes concentrações das frações protéicas modificadas ao longo do tempo de conservação, é possível desenvolver estratégias para maximizar o nível e a utilização do nitrogênio nas dietas.

Considerando que a retenção média da digesta no rúmen seja em torno de 48 h, seria esperado que a maior parte do material ingerido fosse fermentado dentro deste período (BUENO et al., 2005). De fato, para todos os tempos de conservação, 80% da degradação ficou dentro das 48h. Entretanto, o pico de produção de gases para cada tratamento não diferiu, demonstrando maior produção entre 12 e 24h após a incubação, demonstrando que a fermentação de carboidratos e proteínas solúveis foi realizada no período inicial de incubação.

A produção de gás em 24, 48 e 96h demonstraram efeito quadrático decrescente em função do tempo de conservação, indicando que o pré-ensilado, teve maior produção de gás em relação ao material conservado. Sendo justificado, provavelmente, pelo fato do material do dia zero, não ter passado por um processo de conservação e que ocasionasse perdas de fermentação. Ao contrário, do que foi observado para as silagens, no qual, promoveu maiores perdas de efluentes e gases, substratos fermentáveis como CNF, CB1, CB2, CB3 e, portanto, um declínio na produção de gás, corroborando com o relatado por Ali et al. (2015).

Além disso, como já mencionado, o prolongar dos tempos de conservação, apresentaram aumento contínuo de PA e $\text{NH}_3\text{-N}$. De acordo com Russel et al. (1992), quando esta fração de nitrogênio é degradada, a produção de carbonato de amônio é favorecida, reduzindo a formação de dióxido de carbono e por consequência o volume de gás produzido durante o período de incubação. Ademais, Peyrat et al. (2014) descreveram que a acidez da silagem potencializa a hidrólise parcial da hemicelulose em silagens com maior tempo de conservação, sendo que o FDN residual e maior presença de frações de carboidratos de natureza insolúveis (CC), provavelmente, são menos degradáveis do que o pré-ensilado.

O aumento da degradabilidade da MS causado pelo processo de fermentação encontrada no presente estudo, foi contraditório, uma vez que a porção de fibra solúveis apresentaram redução. Entretanto, Duvnjak et al. (2019), reportaram que a degradabilidade e da MS foi afetada positivamente pelo tempo de ensilagem através da diminuição gradual da concentração do FDN.

CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que o prolongar do tempo de conservação, mesmo em condições ácidas e anaeróbias, resulta em aumento das perdas por efluentes, redução constante na fração de carboidratos solúveis e acréscimo na fração insolúvel. Entretanto há benefícios do tempo de conservação sobre as frações proteicas da SSPI.

Os distintos períodos de conservação, acarretaram em diminuição na produção de gás *in vitro*. Portanto, todas estas alterações devem ser consideradas ao realizar a formulação de dietas para vacas leiteiras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, M. et al. Effect of temperature and duration of ensiling on *in vitro* degradation of maize silages in rumen fluid. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 99, p. 251-257, 2015.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 16. ed. Arlington: AOAC International, 1995. 474 p.
- AOCS. American Oil Chemists' Society. **AOCS, Office Procedure, Am 5-04**, Rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction. Urbana, IL: AOCS, 2005.
- BARON, V. S.; STEVENSON, K. R.; BUCHANAN-SMITH, J. G. Proteolysis and fermentation of grain-corn ensiled at several moisture levels and under several simulated storage methods. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 66, n. 2, p. 451-461, 1986.
- BUENO, I. C. S. et al. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123, p. 95-105, 2005.
- CNCPS. **Cornell Net Carbohydrate and Protein System**. Ithaca: Cornell University, 2002. Software, version 5.0.
- DAS, K. L. et al. Fractionation of carbohydrate and protein content of some forage feeds of ruminants for nutritive evaluation. **Veterinary World**, v. 8, n. 2, p. 197-202, 2015.

- DER BEDROSIAN, M. C.; NESTOR JR, K. E.; KUNG JR, L. The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 9, p. 5115-5126, 2012.
- DIEPERSLOOT, E. C. et al. Effects of Microbial Inoculation and Storage Length on Fermentation Profile and Nutrient Composition of Whole-Plant Sorghum Silage of Different Varieties. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p.1-16, 2021.
- DUVNJAK, M.; KLJAK, K.; GRBEŠA, D. Response of common silage corn hybrids to inoculant application: fermentation profile, carbohydrate fractions, and digestibility during ensiling. **Animal Production Science**, v. 59, n. 9, p. 1-9, 2019.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3. ed., Brasília, DF: EMBRAPA, 2013. 353 p.
- FERNANDES, T. et al. Short Communication: Influence of sorghum cultivar, ensiling storage length, and microbial inoculation on fermentation profile, N fractions, ruminal in situ starch disappearance and aerobic stability of whole-plant sorghum silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 266, p. 1-22, 2020.
- FERRARETTO, L. et al. Effect of corn silage hybrids differing in starch and neutral detergent fiber digestibility on lactation performance and total-tract nutrient digestibility by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 1, p. 395-405, 2015.
- FOX, D. et al. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. **Animal Feed Science and Technology**, v. 112, n. 1-4, p. 29-78, 2004.
- GERLACH, K. et al. Effects of length of ensiling and maturity group on Chemical composition and in vitro ruminal degradability of whole-crop maize. **Grass and Forage Science**, v. 73, n. 3, p. 1-11, 2018.
- GIUBERTI, G. et al. Factors affecting starch utilization in large animal food production system: A review. **Starke**, v. 66, n. 1-2, p. 72-90, 2014.
- GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. Forage fier analysis: apparatus reagentes, procedures and some application. **Agricultural Hantbook**, Washington, D.C., n. 379, 1970.
- HALL, M. B. Neutral detergent-soluble carbohydrates: nutritional relevance and analysis – a laboratory manual. **University of Florida Extension – Extension, Institute of Food and Agricultural Sciences**, n. 339, 2000.
- HENZ, E. L. et al. Evaluation and characterization of triticale silage to replace Sorghum bicolor (L.) Moench (S. vulgare Pers.) silage as feed for beef cattle. **Semina**, v. 41, n. 1, p. 335-344, 2020.
- HIGGS, R. J. et al. Updating the Cornell Net Carbohydrate and Protein System feed library and analyzing model sensitivity to feed inputs. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 9, p. 6340-6360, 2015.

- HOFFMAN, P. C. et al. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2465-2474, 2011.
- HRISTOV, A. N. et al. Effects of ensiling time on corn silage neutral detergent fiber degradability and relationship between laboratory fiber analyses and in vivo digestibility. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 3, p. 1-14, 2020.
- JOBIM, C. C. et al. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, supl. esp., p. 101-119, 2007.
- JUNGES, D. et al. Short communication: Influence of various proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 11, p. 1-4, 2017.
- KLEINSCHMIT, D. H.; KUNG JR, L. The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage during various stages of ensiling. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 10, p. 3999-4004, 2006.
- KROONEMAN, J. et al. *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 639-646, 2002.
- KUNG JR, L. et al. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 4020-4033, 2018.
- KUNG JR, L.; WINDLE, M. C.; WALKER, N. The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of highmoisture corn. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1707-1712, 2014.
- KUNG, JR. L. The effects of length of storage on the nutritive value and aerobic stability of silages. In: DANIEL, J. L. P.; SANTOS, M. C.; NUSSIO, L. G. (ed.). INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 3., 2013, Campinas. **Proceeding...** Campinas: [s.n.], 2013. p. 7-19.
- LANZAS, C. et al. A revised CNCPS feed carbohydrate fractionation scheme for formulating rations for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 136, n. 3-4, p. 167-190, 2007.
- LICITRA, G.; HERNANDEZ, T. M.; VAN SOEST, P. J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 57, n. 4, p. 347-358, 1996.
- MCCARY, L. C. et al. Graduate Student Literature Review: Current perspectives on whole-plant sorghum silage production and utilization by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 6, p. 5783-5790, 2020.
- MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. 2. ed. [S.l.]: Chalcombe Publications, 1991.

- MENKE, K. H. et al. The estimation of the digestibility and metabolisable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. **Journal of Agricultural Science**, v. 93, n. 1, p. 217-222, 1979.
- MERTENS, D. R. Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function. **Journal of Animal Science**, v. 64, n. 5, p. 1548-1558, 1987.
- NAEINI, S. Z. et al. Influence of ensiling time on chemical composition, fermentation characteristics, gas production and protein fractions of sweet sorghum silage. **Research Opinions in Animal and Veterinary Sciences**, v. 4, n. 6, p. 286-293, 2014.
- OMS-OLIU, G. et al. Metabolic characterization of tomato fruit during preharvest development, ripening, and postharvest shelf-life. **Postharvest Biology and Technology**, v. 62, n. 1, p. 7-16, 2011.
- OUDE ELFERINK, S. J. W. H. et al. Anaerobic Conversion of Lactic Acid to Acetic Acid and 1,2-Propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 125-132, 2001.
- PAHLOW, G.; MUCK, R. E.; DRIEHUIS, F. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (ed.). **Silage Science and Technology**. Madison, WI: American Society of Agronomy, 2003. p. 31-93.
- PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Sciences Discussions**, v. 4, n. 2, p. 439-473, 2007.
- PEYRAT, J. et al. Effects of ensiling maize and sample conditioning on in situ rumen degradation of dry matter, starch and fibre. **Animal Feed Science and Technology**, v. 196, p. 12-21, 2014.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2020. URL <https://www.R-project.org/>.
- ROOKE, J. A.; HATFIELD, R. D. Biochemistry of Ensiling. **Silage Science and Technology**, v. 42, p. 95-139, 2003.
- RUSSELL, J. B. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluation cattle diets: Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3551-3581, 1992.
- SANTOS, W. P. et al. The effect of length of storage and sodium benzoate on the nutritive value of reconstituted sorghum grain silages for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 10, p. 9028-9038, 2019.
- SCHEIN, H. et al. The use of *Lactobacillus diolivorans* as silage inoculant. In: GERLACH, K.; SÜDEKUM, K. H. (ed.). **XVIII International Silage Conference**. Bonn, Germany: [s.n.], 2018. p. 166-167.
- SCHOFIELD, P.; PITT, R. E.; PELL, A. N. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. **Journal Animal Science**, v. 72, n. 11, p. 2980-2991, 1994.

- SENGER, C. C. D. et al. Short communication: Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 146, n. 1-2, p. 169-174, 2008.
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de Alimentos (Métodos químicos e biológicos)**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 2002. 165 p.
- SNIFFEN, C. J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3562-3577, 1992.
- TANGERMAN, A.; NAGENGAST, F. M. A gas chromatographic analysis of fecal short-chain fatty acids, using the direct injection method. **Analytical Bioanalytical**, v. 236, n. 1, p. 1-8, 1996.
- THEODOROU, M. K. et al. A simple gas production using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, n. 3-4, p. 185-197, 1994.
- TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crop. **Journal British Grassland Society**, v. 18, n. 2, p. 104-111, 1963.
- VAN AMBURGH, M. E. et al. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System: Updates to the model and evaluation of version 6.5. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 9, p. 6361-6380, 2015.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharide in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.
- WALTER, M.; SILVA, L. P. D.; PERDOMO, D. M. X. Amido disponível e resistente em alimentos: adaptação do método da AOAC 996.11. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 39-43, 2005.
- WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 971-974, 1967.
- YOUNG, K. M. et al. Effect of exogenous protease enzymes on the fermentation and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 11, p. 6687-6694, 2012.
- ZHANG, C. et al. Propionic acid production by cofermentation of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus diolivorans* in sourdough. **Food Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 390-395, 2010.

4 CAPÍTULO II – EFEITO DO TEMPO DE CONSERVAÇÃO SOBRE AS PERDAS ANAERÓBICAS E PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS EM SILAGEM DE SORGO DE PLANTA INTEIRA

Resumo: Este experimento foi conduzido com o objetivo de quantificar o efeito do tempo de conservação da silagem de sorgo de planta inteira sobre a redução dos nutrientes ao longo do processo fermentativo e a avaliação das micotoxinas aflatoxina (AFLA), fumonisina (FUMO), desoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZEA) no material pré e pós-ensilado. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos (45, 90, 180 e 360 dias), quatro repetições cada. O tempo de conservação determinou efeito quadrático sobre os ácidos láctico e acético e linear para os ácidos propiônico e butírico. As perdas anaeróbicas de proteína bruta (PPB) aumentaram e as perdas de fibra em detergente neutro (PFDN) reduziram ao longo do processo fermentativo. As micotoxinas AFLA e FUMO estavam abaixo do limite de ocorrência no material pré-ensilado, ao passo que, durante o período de conservação, independente do tempo, também não tiveram ocorrência. Para ZEA e DON o material pré-ensilado estava contaminado e o período de fermentação causou efeito quadrático para ZEA e aumento linear para DON. ZEA correlacionou-se positivamente com os ácidos propiônico, butírico e negativamente com perdas de nutrientes digestíveis totais (PNDT). DON apresentou correlação positiva com a temperatura do silo, negativamente com matéria seca (MS), PFDN e PNDT. A temperatura do silo e a MS explicaram respectivamente 92 e 38%, a variação da concentração de DON. As perdas nutricionais anaeróbicas são inerentes ao processo fermentativo, porém, a produção de micotoxinas antes e durante a conservação, representa um potencial problema para o uso da silagem da planta inteira de sorgo na alimentação animal.

Palavras-chave: Ácidos orgânicos. Desoxinivalenol. Deterioração. Fermentação. Zearalenona.

EFFECT OF STORAGE TIME ON ANAEROBIC LOSSES AND MYCOTOXIN PRODUCTION IN WHOLE PLANT SORGHUM SILAGE

Abstract: This experiment was carried out with the objective of quantifying the effect of the shelf life of whole plant sorghum silage on the reduction of nutrients throughout the fermentation process and the evaluation of the mycotoxins aflatoxin (AFLA), fumonisin (FUMO), deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEA) in the pre- and post-ensiled material. The design used was completely randomized with four treatments (45, 90, 180 and 360 days), four replications each. The conservation time determined a quadratic effect on lactic and acetic acids and linear for propionic and butyric acids. Anaerobic crude protein (PPB) losses increased and neutral detergent fiber (PFDN) losses decreased throughout the fermentation process. AFLA and FUMO mycotoxins were below the occurrence limit in the pre-ensiled material, while during the conservation period, regardless of time, they were also did not occur. For ZEA and DON the pre-ensiled material was contaminated and the fermentation period caused a quadratic effect for ZEA and linear increase for DON. ZEA correlated positively with propionic and butyric acids and negatively with losses of total digestible nutrients (PNDT). DON showed a positive correlation with the temperature of the silo, negatively with dry matter (DM), PFDN and PNDT. Silo temperature and DM explained, respectively, 92 and 38%, the variation in DON concentration. Anaerobic nutritional losses are inherent to the fermentation process, however, the production of mycotoxins before and during conservation represents a potential problem for the use of whole sorghum plant silage in animal feed.

Keywords: Organic acids. Deoxynivalenol. Deterioration, Fermentation. Time. Zearalenone.

INTRODUÇÃO

A silagem de sorgo de planta inteira (SSPI) apresenta uma fonte alternativa de fibra e energia de alta qualidade, que compõe a dieta de bovinos leiteiros com o intuito de manter em equilíbrio a produtividade ao longo de todo ano (MCCARY et al., 2020). O processo de ensilagem, é um método de preservação anaeróbio de forragens úmidas, no qual bactérias epifíticas fermentam carboidratos solúveis em ácidos orgânicos, resultando em diminuição do pH no material ensilado (MCDONALD et al., 1991).

Está bem documentado que na fase de estabilidade, a intensa fermentação desacelera, mas não paralisa, ou seja, a fermentação ocorre de forma contínua (KUNG, 2013). Entretanto, apesar do processo de conservação ser um método dito como adequado, ocorre uma série de biotransformações ao longo do período de armazenamento, que provocam perdas de nutrientes que muitas vezes são inevitáveis, resultando em redução na qualidade nutricional da silagem (ÚDEN, 2017).

Conjuntamente com as perdas nutricionais, a silagem, de forma geral, demonstra ser um substrato vulnerável a contaminação por fungos patogênicos como *Fusarium* e *Aspergillus*, que podem produzir metabólitos secundários tóxicos aos animais, conhecidos como micotoxinas (DILKIN, 2014). Os fungos podem contaminar as plantas ainda quando estão no campo, assim como durante o processo de fermentação, sendo que a síntese de micotoxinas pode ser intensificada quando o manejo e o processo de ensilagem são inadequados.

A ocorrência de micotoxinas, como aflatoxina (AFLA), fumonisina (FUMO), zearalenona (ZEA) e desoxinivalenol (DON) antes e após o processo de fermentação em silagens foram documentados por González Pereyra et al. (2008), Keller et al. (2012), Del Palacio et al. (2016) Jensen et al., (2019) e Del Palacio e Dinorah Pan et al. (2020), com resultados parcialmente contraditórios. Isso se deve, possivelmente pelo fato de que as condições edafoclimáticas e as etapas da ensilagem não são homogêneas (DRIEHUIS, 2011)

Enquanto que alguns estudos descreveram uma diminuição ou até mesmo uma eliminação completa de DON, ZEA e AFLA durante a ensilagem (BOUDRA; MORGAVI 2008; FERRERO et al., 2018), outros relataram aumento na concentração de DON e FUMO com redução nos seus metabólitos ao longo do período de conservação (DEL PALÁCIO et al., 2016; JENSEN et al., 2019; KELLER et al., 2012). Em contrapartida, Driehuis (2011) e Uegak et al. (2013) reportaram que a síntese de micotoxinas durante a ensilagem era inesperada, propondo que as toxinas encontradas nas silagens são produzidas principalmente na fase de pré-ensilagem.

Desta forma, avaliar a ocorrência de micotoxinas no material antes e após a ensilagem se torna essencial, uma vez que, pode causar sérios danos na saúde humana e animal, além de trazer prejuízos econômicos. Neste sentido, nosso trabalho possui como hipótese, que ao longo do período de conservação, ocorre aumento em relação as perdas fermentativas e a concentração de micotoxinas na silagem de planta inteira de sorgo. Assim, objetivou-se com o presente estudo avaliar o efeito do tempo de conservação sobre os produtos de fermentação, perdas nutricionais anaeróbicas e a concentração das micotoxinas AFLA, DON, FUMO e ZEA em silagem de sorgo de planta inteira.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Grupo de Estudos em Aditivos na Produção Animal (GEAPA) da UFSM, localizado na região fisiográfica da Depressão Central, Rio Grande do Sul, Brasil, no período de outubro de 2016 a junho de 2018. A área experimental foi instalada na cidade de Santa Maria – RS, Brasil, coordenadas latitude -29,73'12" Sul e longitude 53.71'82" Oeste, a 95 metros de altura do nível do mar. O solo da região é classificado como Argissolo Vermelho Distrófico com horizontes A e Bt definidos (EMBRAPA, 2013). O clima é o Cfa, subtropical, sem estação seca e com verões quentes (PEEL et al., 2007). Utilizou-se híbrido comercial de sorgo (*Sorghum bicolor* L, Moench), ADV 2499BMR. Para a semeadura, utilizou-se uma semeadora tratorizada com 5 linhas, regulada para população de plantas de 120.000 plantas ha⁻¹.

Como critério, as plantas de sorgo foram colhidas para a confecção da ensilagem quando as mesmas chegassem aos 28% de MS, no qual a forragem picada, em um triturador estacionário, com tamanho médio de partículas de 2 cm, compactada em baldes de 30 litros, com o uso de quatro sacos plásticos, formando os silos laboratoriais. No primeiro saco interno havia 2 kg de areia seca e no segundo saco interno estava a forragem picada (8 kg), compactada. Furos na parte inferior do saco com foragem foram feitos para saída do efluente, captado pela areia do primeiro saco. Com auxílio de um aspirador de pó o ar foi retirado dos dois primeiros sacos. O terceiro e quarto sacos eram pretos para evitar entrada de ar e proteção contra a luz solar.

A abertura dos silos ocorreu após 45, 90, 180 e 360 dias de conservação, conforme os tratamentos pré-estabelecidos. Foram realizadas as pesagens dos silos antes e após a coleta das amostras, para a avaliação das perdas que ocorreram durante os períodos de conservação. Os silos foram levados um dia antes da abertura para uma sala com ambiente climatizado com

temperatura constante de 25°C. No momento da abertura, foi realizada a medição da temperatura do silo, no qual, retirou-se a primeira camada do silo e em seguida inseriu-se em torno de 15 cm o termômetro do tipo analógico no interior de cada silo. A determinação do pH, realizou-se conforme a metodologia de Silva e Queiroz (2002). Foram coletados 200g de amostra das silagens, levadas a estufa com circulação forçada de ar com temperatura média de 55 °C, até atingir peso constante e pesada para determinação da matéria parcialmente seca (MPS), sendo moída posteriormente, em moinho do tipo “Willey” com peneira de malha de 1 mm para análises bromatológicas.

A matéria seca total (MS) foi determinada em estufa a 105 °C durante um período mínimo de 8 horas. Para determinação de proteína bruta (PB) pelo método micro Kjeldhal, segundo AOAC (1995). Os níveis de fibra em detergente neutro (FDN) foram obtidos com o uso de α -amilase termoestável (Termamyl 120L, Novozimes Latin America, LTDA), realizada com auxílio da autoclave, conforme técnica adaptada por Senger et al. (2008). Os teores de nutriente digestível total (NDT), foram aferidos através da digestibilidade da matéria orgânica (DMO) e pelo valor de FDN, de acordo com Cappelle et al. (2001), pela fórmula $NDT = 3,71095 - 0,129014 \text{ FDN} + 1,02278 \text{ DMO}$. As perdas nutricionais de MS, PB, NDT e FDN, oriundas do processo fermentativo anaeróbico, foram adaptadas de acordo com fórmulas citadas por Jobim et al. (2007), sendo que os silos e o conjunto areia+TNT+saco foram pesados no momento da confecção da silagem e no momento da abertura.

A quantificação dos ácidos acético, propiônico e butírico produzidos durante o processo fermentativo foi realizada de acordo com Tangerman e Nagengast (1996), com adaptações, enquanto que o ácido lático foi submetido ao processo de derivatização com auxílio N-terc-butilmetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) de acordo com Oms-Oliu et al. (2011). As concentrações de todos os ácidos foram analisadas em cromatografia gasosa equipada com detector de ionização de chama (GC-FID), Varian Star 3400CX (CA, EUA).

As análises de aflatoxina (somatório das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2) foram realizadas utilizando o método adaptado de Sulyok et al. (2007). Uma amostra de 5 g foi adicionada à 20 ml de solução de acetonitrila: água (84:16, v / v) e agitada a 70 rpm por 1 h (Lucadema, São Paulo, Brasil). Em seguida, o extrato foi diluído com uma solução de metanol: água (1: 1, v / v) e 20 μ l foram injetados em uma HPLC Infinity série 1200 (Agilent, Palo Alto, EUA) acoplado a um espectrômetro de massa 5500 QTRAP (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) equipada com uma fonte de ionização por electrospray (ESI) em modo positivo. A separação cromatográfica foi realizada a 30 °C usando uma coluna Eclipse XDB-C8 (4,6'150 mm, diâmetro da partícula de 5 μ m) (Agilent, Palo Alto, CA, EUA). O gradiente da fase móvel

foi composto por soluções de metanol: água: acetato de amônio (95: 4: 1, v / v / v) (solução A) e água: acetato de amônio (99: 1, v / v) (solução B).

Fumonisinás foram analisadas de acordo com a metodologia descrita por Dall'Asta et al. (2008), com adaptações. Uma amostra de 3 g foi adicionada à 15 ml de solução de acetonitrila: água (1: 1, v / v) e agitada em vórtex por 20 min em um instrumento MA563 (Marconi, Piracicaba, Brasil). O extrato foi então diluído em solução de acetonitrila: água: ácido fórmico (5: 4: 1, v / v / v) e 10 µl foram injetados em HPLC Infinity Série 1200 (Agilent) 1200 acoplado a um espectrômetro de massa API 5000 (Applied Biosystems) equipados com uma fonte ESI no modo positivo. A separação cromatográfica foi feita a 40 ° C usando uma coluna Eclipse XDB-C8 (4,6'150 mm, diâmetro de partícula de 5 µm) (Agilent). O gradiente da fase móvel foi composto por soluções de água: ácido fórmico (95: 5, v / v) (solução A) e acetonitrila: ácido fórmico (95: 5, v / v) (solução B).

Para as análises de zearalenona e desoxinivalenol, foi adaptado o método proposto por Berthiller et al. (2005). Adicionou-se uma amostra contendo 3 g à 24 ml de uma solução de metanol: água (7: 3, v / v) e agitou-se no vórtice por 20 minutos usando um instrumento MA563 (Marconi). Em seguida, o extrato foi diluído em uma solução 1 M de metanol: água: acetato de amônio (90: 9: 1, v/v/v) e 10 µl foram injetados em uma HPLC Infinity Série 1200 (Agilent) acoplada a um 4000 QTRAP espectrômetro de massa (Applied Biosystems), equipado com uma fonte ESI em modo positivo. A separação cromatográfica foi realizada a 40 ° C com uma coluna Zorbax SB-C18 (4,6'150 mm, diâmetro de partícula de 5 µm) (Agilent). O gradiente da fase móvel foi composto por soluções de metanol: água: acetato de amônio (90: 9: 1, v / v / v) (solução A) e água: acetato de amônio (90:10, v / v) (solução B).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e quatro repetições cada. O modelo experimental foi: $y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$, onde y_{ij} = valor observado na unidade experimental que recebeu o tratamento i , repetição j ; μ = efeito geral da média; t_i = efeito do tratamento i ; e_{ij} = erro aleatório (resíduo). Foi realizada análise de regressão e a escolha dos modelos foi baseada no valor de significância ($P < 0,05$). Adicionalmente, foi realizado o procedimento CORR do programa estatístico R software (R Core Team) para analisar a correlação entre as variáveis de interesse. Os resultados das análises de correlações foram usados para determinar as variáveis incluídas nas análises de regressão. As variáveis que não contribuíram significativamente para o modelo foram eliminadas ($P < 0,10$), sendo que a regressão Stepwise do programa estatístico R software (R Core Team) e os maiores coeficientes de determinação (R^2) foram usados para selecionar as melhores equações.

RESULTADOS

O pH apresentou efeito quadrático em função do período de conservação, com produção máxima aos 26 dias (Tabela 1). Em relação aos produtos de fermentação, o ácido láctico e o acético demonstraram comportamento quadrático, com ponto de máxima aos 218 e 163 dias de conservação, respectivamente.

O tempo de conservação resultou em aumento linear de 0,0032 g kg⁻¹ de MS para o ácido propiônico e 0,0021546 g kg⁻¹ de MS na concentração do ácido butírico para cada dia de fermentação. Observamos efeito linear do tempo de conservação sobre a diminuição no teor de MS em 0,01072 g kg⁻¹ ao dia. A temperatura do silo demonstrou crescimento linear positivo de 0,03367 graus por dia em relação ao período de conservação.

Tabela 1 – Produtos de fermentação e parâmetros físicos de silagens de sorgo de planta inteira, submetidas a distintos períodos de conservação

Variáveis	Período de Conservação (dias)					EPM	P - values	
	0	45	90	180	360		L	Q
pH ^I		3,62	3,84	3,96	3,95	0,03	0,0092	0,001
Temp silo (°C) ^{II}		16,05	19,05	22,62	27,15	2,70	0,0002	0,001
MS ^{IV}	28,49	30,40	29,23	27,34	26,71	0,68	<,0001	0,221
Ácido láctico ^V		19,50	46,50	48,41	39,00	1,95	0,5200	0,0032
Ácido acético ^{VI}		13,90	18,21	17,76	14,20	0,77	0,2579	0,0446
Ácido prop. ^{VII}		4,00	4,18	3,98	5,03	0,28	0,0396	0,3613
Ácido butírico ^{VIII}		1,39	2,05	1,55	2,19	0,22	0,045	0,8465

Ácido acético em g kg⁻¹ de MS; Ácido butírico em g kg⁻¹ de MS; Ácido láctico em g kg⁻¹ de MS; Ácido propiônico em g kg⁻¹ de MS; MS= matéria seca (g kg⁻¹); Temp silo= temperatura do silo; Temp amb= temperatura ambiente; EPM= erro padrão da media L=linear; Q= quadrático;

^IY= 3,45944 + 0,004368DIA – 0,0000824DIA² (R²= 0,87; CV= 1,63%);

^{II}Y= 15,535 + 0,03367 DIA (R²=0,96; CV= 15,21%);

^{IV}Y= 30,18696 - 0,01072DIA (R²= 0,48; CV= 5,16%);

^VY= 6,2222 + 0,44519 – 0,00102 DIA² (R²=0,64; CV= 12,48%);

^{VI}Y= 12,167+ 0,0652DIA - 0,0002DIA² (R²= 0,76; CV 14,44%);

^{VII}Y= 3,76522 + 0,0032DIA (R²= 0,44; CV= 10,48%);

^{VIII}Y= 1,4989 + 0,0021546DIA (R²= 0,34; CV= 12,48%).

Não observamos efeito do período de conservação para as perdas de MS e NDT da silagem de planta inteira de sorgo (Tabela 2). As perdas de FDN em função do tempo de

conservação diminuíram linearmente, 0,014 g kg⁻¹ por dia, enquanto que para as perdas de PB, o tempo de conservação resultou em aumento linear de 0,003 g kg⁻¹ ao dia.

Tabela 2 – Perdas nutricionais anaeróbicas ao longo do tempo de conservação em silagens de sorgo de planta inteira, submetidas a distintos períodos de conservação

Variáveis (g/Kg ¹)	Período de Conservação (dias)				EPM	P - values	
	45	90	180	360		L	Q
PMS	0,20	0,19	0,21	0,19	0,01	0,841	0,3614
PFDN ^I	0,21	0,22	0,16	0,14	0,01	0,0018	0,5455
PPB ^{II}	0,13	0,15	0,19	0,22	0,02	0,0421	0,5349
PNDT	0,2	0,22	0,23	0,2	0,01	0,1208	0,3231

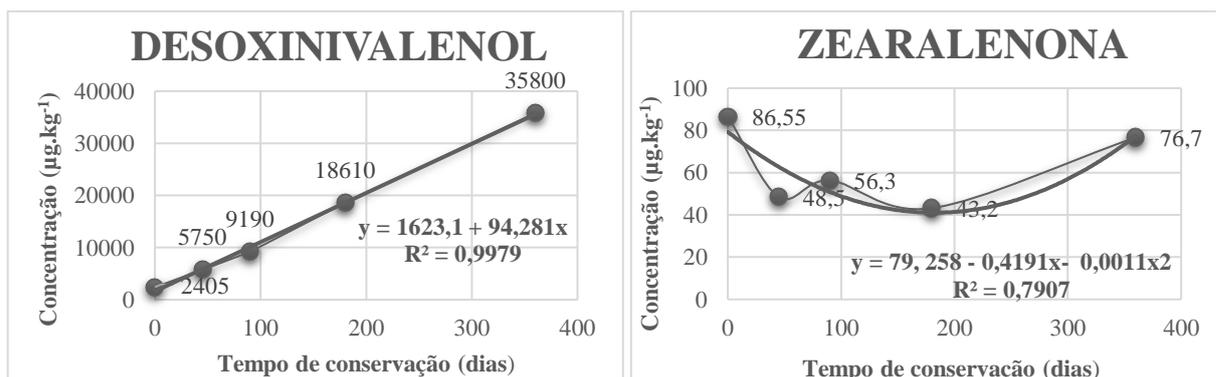
PFDN= perdas de fibra em detergente neutro; PMS= perdas de matéria seca; PNDT= perdas de nutrientes digestíveis totais; PPB= perdas de proteína bruta; EPM= erro padrão da média L=linear; Q= quadrático;

^IY= 0,022-0,014DIA (R²=0,39; CV=26%);

^{II}Y= 0,1261 + 0,0003DIA (R²=0,5; CV=54%).

A concentração das micotoxinas FUMO e AFLA permaneceu abaixo dos limites de ocorrência nas amostras frescas e ao longo do período de conservação avaliado. Assim, estas micotoxinas não participaram da análise de correlação. Na figura 1, podemos observar que DON e ZEA tiveram ocorrência no material pré e pós- ensilado. Para DON, o tempo de fermentação resultou em aumento linear de 94,281 µg.kg⁻¹ por dia de conservação, enquanto que para a micotoxina ZEA, o período de conservação demonstrou efeito quadrático positivo, com a produção mínima em torno dos 190 dias de conservação, com posterior aumento.

Figura 1 – Concentração das micotoxinas Desoxinivalenol (a) e Zearalenona (b) em amostras frescas (dia 0) silagens de sorgo de planta inteira, submetidas a distintos períodos de conservação



A correlação de Person dos produtos de fermentação, parâmetros físicos e perdas nutricionais sobre as micotoxinas ZEA e DON estão demonstradas na Tabela 3. Foi observada correlação negativa entre DON com MS, PFDN e PNDT. A micotoxina DON apresentou correlação positiva com a temperatura do silo. Já ZEA correlacionou-se positivamente com ácido propiônico, ácido butírico e negativamente com as perdas de NDT.

Tabela 3 – Correlação Simples de Pearson entre a composição química, física, perdas nutricionais e as micotoxinas do gênero *Fusarium*

Variables	DON	ZEA
MS	-0,699*	-0,199
pH	0,635	0,291
Temperatura do Silo	0,954**	0,466
Ácido Lático	0,217	0,146
Ácido Acético	0,009	-0,074
Ácido Propionico	0,514	0,654*
Ácido Butírico	0,551	0,760*
PMS	0,185	-0,283
PFDN	-0,938**	-0,553
PPB	0,085	-0,419
PNDT	-0,670*	-0,635*

MS= matéria seca; PMS= perdas de matéria seca; PFDN= perdas de fibra em detergente neutra; PPB= perdas de proteína bruta; PNDT= perdas de nutrientes digestíveis total.

*P < 0,05; ** P <0,01.

Realizou-se também, equação de predição através dos resultados de correlação. Dois modelos de predição foram gerados, no qual, a temperatura do silo e o teor de MS foram utilizados como variáveis independentes e DON como variável dependente (Tabela 4.) A temperatura do silo foi responsável por 91 % da variação do R², enquanto que o teor de MS explicou 38% da variação da concentração de DON, apresentando um efeito linear decrescente. Não obtivemos nenhum modelo de predição que pudesse explicar a variação de ZEA em relação às variáveis independentes avaliadas.

Tabela 4 – Equação de predição da micotoxina desoxinivalenol (DON) a partir da temperatura do silo (temp silo) e matéria seca (MS)

Variable	Modelo	R ²	P -values
DON	$y = -40535,19 + 2736,297 \text{ temp silo}$	0,91	0,050
DON	$y = 144476,7 - 4616,03 \text{ MS}$	0,38	0,056

DISCUSSÃO

Associamos a diminuição gradual no teor de MS e as perdas de FDN ao longo do período de conservação com a intensa hidrólise na fase inicial dos carboidratos solúveis e provavelmente pelo consumo dos mesmos pelos fungos, como pode ser observado pela correlação negativa apresentada. Outros fatores como a produção de efluentes e o extravasamento do conteúdo intracelular para o meio externo podem contribuir para os resultados do presente estudo (MCDONALD et al., 1991).

O aumento das perdas de PB foi relacionado com a solubilização das proteínas ao longo do processo fermentativo, ocorrido, principalmente pelas proteases bacterianas (HOFFMAN et al., 2011; JUNGES et al., 2017), demonstrando que a degradação dos nutrientes ao longo do período de conservação é inerente ao processo fermentativo, mesmo em anaerobiose. Embora ocorra alterações constantes nos produtos de fermentação após longos períodos de conservação, e que a atividade microbiana dentro do silo pode persistir, mesmo que a silagem apresente pH baixo, conforme relatado por Oude Elferink et al. (2001) e Kung et al. (2018), não observamos modificações que pudessem comprometer o perfil de fermentação e a preservação das silagens de sorgo de planta inteira. No entanto, tais mudanças precisam ser consideradas ao realizar estimativa de dietas, para não comprometer o desempenho animal.

A temperatura do silo aumentou ao longo do tempo de conservação, entretanto nenhuma silagem apresentou temperatura acima de 40°C, pois segundo Kung Jr et al. (2018), altas temperaturas podem ser um indício de deterioração aeróbia, degradação de carboidratos e proteínas. De acordo com Kung Jr et al. (2000), o aumento da temperatura na silagem pode ser uma consequência da utilização de substratos no metabolismo microbiano para a produção de ácidos orgânicos ocasionando variação no pH. O mesmo efeito foi reportado por Schmidt et al. (2015), em que obtiveram ainda, uma correlação moderada entre a temperatura interna do silo e o pH.

Como não houve incidência das micotoxinas AFLA e FUMO, tanto nas amostras antes de serem ensilados quanto após o processo fermentativo, podemos inferir que o armazenamento de SSPI não apresenta ser uma fonte relevante destas toxinas, visto que podem causar sérios danos à saúde animal, incluindo efeitos carcinogênicos e imunossupressores (ASSIS et al., 2019). Além das implicações adversas das micotoxinas em animais, há também preocupação com a saúde pública, pois quando animais estão expostos e ingerem alimentos contaminados por AFLA, existe o risco potencial de transferência de resíduos de micotoxinas para produtos alimentícios de origem animal, como carne ou leite (ALONSO et al., 2013).

De acordo com Schmidt et al. (2015), a temperatura da silagem não foi um bom preditor para detectar a presença de DON, ZEA, FUMO e AFLA, relatando que o perfil das micotoxina e a composição química da silagem de milho são altamente variáveis e não se correlacionam diretamente com a temperatura da silagem. No entanto, no presente estudo, a temperatura do silo apresentou elevado coeficiente de determinação para a micotoxina DON, demonstrando que a temperatura apresenta bom indicativo para a presença de DON em SSPI.

Além disso, DON foi correlacionado negativamente com o teor de MS e resultou em um modelo de predição intermediário. Considerando que a obtenção de silagens com alto valor nutricional, teores acima de 30% de MS são desejáveis (KUNG JR. et al., 2018) podemos inferir, neste sentido, que teores de MS mais altos, porém moderados, apresentam a capacidade de minimizar a produção de micotoxinas.

A alta incidência de DON e ZEA encontrada nas amostras pré-ensiladas é justificada pelo período de pré-colheita ser uma fase favorável para a contaminação das plantas pelos fungos do gênero *Fusarium*, o que pode afetar fortemente a ocorrência destas micotoxinas, mesmo após serem ensiladas (DEL PALÁCIO et al., 2016). Apesar de ZEA ter demonstrado efeito quadrático em relação ao tempo de conservação, esta toxina apresenta em sua constituição, baixa solubilidade e uma certa estabilidade ao longo do período de conservação. Similaridades foram reportadas por Boudra e Morgavi (2008), González Pereyra et al. (2014) e Jensen et al. (2019), os quais relataram que a ZEA e seus metabólitos permaneceram estáveis durante o armazenamento, sugerindo que não houve nenhuma degradação significativa através dos produtos de fermentação ou mesmo pelas bactérias epifíticas presentes no silo.

Deste modo, vale ressaltar que a ZEA produzida na fase pré-colheita apresenta estabilidade com um provável aumento durante o período de conservação, sendo que as condições do meio, como o baixo pH, temperatura, baixa concentração de oxigênio não são suficientes para amenizar a concentração de ZEA (WAMBACQ et al., 2016). Segundo González Pereyra et al. (2014), a realização de um bom manejo em todas as etapas da ensilagem

pode até diminuir os níveis de ZEA e DON, porém, quando o material fresco já apresenta alta contaminação, possivelmente a fermentação anaeróbia não terá efeito de restrição.

A alta incidência de DON durante o período de conservação foi justificado em parte por Robledo et al. (2015) e Schaarschmidt e Fauhl-Hassek (2018), em razão da hidrólise causada ao longo do processo fermentativo, promovendo a liberação de DON que estava aderido na parede celular das plantas de sorgo e nos componentes enzimáticos como xilanase e celulases.

Além disso, Jensen et al. (2019) reportaram em seu estudo que o aumento de DON durante o processo de conservação, de 2096 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ na MS no material fresco, para 2805 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ na MS aos 90 dias de armazenamento, foi acompanhado por uma diminuição gradual dos seus derivados (deoxynivalenol-3-glucoside; 15-acetyl-deoxynivalenol e 3-acetyl-deoxynivalenol). Ou seja, estes autores, conjuntamente com Latorre et al. (2015), indicaram que pode ocorrer uma alteração na estrutura básica durante o processo de conservação, isto é, a conversão dos derivados de DON em sua micotoxina original através da biodegradação induzida pelos microrganismos epifíticos.

Ademais, outro fator relevante relatado por Gardiner et al. (2009), foi que o baixo pH extracelular combinado com a presença de aminas na silagem, agem de forma sinérgica e estimulam a expressão de genes que estão envolvidos na biossíntese de DON pelo fungo *F. graminearum*. Os mesmos autores afirmaram que estes fungos, em condições de meio ácidas, possuem a capacidade de manter o seu pH intracelular constante, garantindo sua sobrevivência ao longo do tempo de conservação.

Embora algumas perdas nutricionais sejam inevitáveis e o processo fermentativo anaeróbio não aparenta ser um método totalmente adequado para atenuar a concentração de fungos produtores de DON e ZEA, e mesmo que, ruminantes sejam considerados menos sensíveis a contaminação de toxinas por apresentarem a capacidade de degradar e/ou inativar as micotoxinas através da microbiota ruminal. Vale ressaltar que, a exposição prolongada de múltiplas micotoxinas pode prejudicar a saúde e produção animal. Associado a isto, é importante salientar que há pouco conhecimento com relação aos efeitos sinérgicos, ou até mesmo antagônicos, de DON e ZEA (STORM et al., 2014; WAMBACQ et al., 2016).

A diminuição da qualidade nutricional da silagem, associada às perdas e produção de micotoxinas ao longo do processo de conservação, pode resultar em uma diminuição na produção potencial de leite. Tal situação foi descrita por Tabacco et al. (2011), em que ao relacionarem a estimativa de produção de leite por tonelada de MS com a contagem de fungos, obtiveram uma redução de 50% na produção de leite quando a contagem de fungos excedeu 8log cfu/g de silagem. Assim, preservar a qualidade do material ensilado, com boas práticas de

produção e gestão, deve ser um aspecto considerado dentro das propriedades (BORREANI et al., 2018) sendo que a qualidade nutricional da silagem de sorgo é influenciada, sobre tudo pelo período de conservação.

CONCLUSÕES

A SSPI apresenta um bom processo fermentativo, contudo as perdas nutricionais anaeróbias aumentam ao longo do período de conservação.

A temperatura do silo pode ser utilizada para prever a contaminação de DON.

As micotoxinas AFLA e FUMO não apresentam prevalência de contaminação no material antes de ser ensilado e após o processo de conservação. As micotoxinas ZEA e DON apresentam alto risco de contaminação em silagem de sorgo de planta inteira, sendo que o tempo de conservação não é capaz de atenuar a concentração de DON e ZEA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, V. A. et al. Review Article: Fungi and mycotoxins in silage: an overview. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 637-643, 2013.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 16. ed. Arlington: AOAC International, 1995. 474 p.

ASSIS, J. R. et al. Micotoxinas no metabolismo e desempenho de animais ruminantes. **Journal of Biology e Pharmacy and Agricultural Management**, v. 15, n. 4, p. 404-435, 2019.

BERTHILLER, F. et al. Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1062, n. 2, p. 209-216, 2005.

BORREANI, G. et al. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 3952-3979, 2018.

BOUDRA, H.; MORGAVI, D. P. Reduction in Fusarium toxin levels in corn Silage with low dry matter and storage time. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 56, n. 12, p. 4523-4528, 2008.

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

DALL'ASTA, C. et al. A LC/MS/MS method for the simultaneous quantification of free and masked fumonisins in corn and corn-based products. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 3, p. 237-246, 2008.

DEL PALACIO, A.; BETTUCCI, L.; PAN, D. Fusarium and Aspergillus mycotoxins contaminating wheat silage for dairy cattle feeding in Uruguay. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1000-1005, 2016.

DEL PALACIO, A.; PAN, P. Occurrence and toxigenic potential of Aspergillus section Flavi on wheat and sorghum silages in Uruguay. **Mycology**, v. 11, n. 2, p. 147-157, 2020.

DILKIN, P. et al. Micotoxinas: prevalência em alimentos, efeitos em animais e seu controle. In: AVISULAT, 2014, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Avisulat, Sanidade, 2014.

DRIEHUIS, F. Occurrence of mycotoxins in silage. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2., 2011, São Pedro. **Proceedings...** São Pedro: [s.n.], 2011. p. 85-104.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3. ed., Brasília, DF: EMBRAPA, 2013. 353 p.

FERRERO, F. et al. Effects of conservation period and Lactobacillus hilgardii inoculum on the fermentation profile and aerobic stability of whole corn and sorghum silages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 5, p. 2530-2540, 2018.

GARDINER, D. M. et al. Low pH regulates the production of deoxynivalenol by Fusarium graminearum. **Microbiology**, v. 155, p. 3149-3156, 2009.

GONZÁLEZ PEREYRA, M. L. et al. Evaluation of zearalenone, α -zearalenol, β -zearalenol, zearalenone 4-sulfate and β -zearalenol 4-glucoside levels during the ensiling process. **World Mycotoxin Journal**, v. 7, n. 3, p. 291-295, 2014.

GONZÁLEZ PEREYRA, M. L. et al. Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 4, p. 1034-1041, 2008.

HOFFMAN, P. C. et al. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2465-2474, 2011.

JENSEN, T. et al. Effect of ensiling duration on the fate of deoxynivalenol, zearalenone and their derivatives in maize silage. **Mycotoxin Research**, v. 36, p. 127-136, 2019.

JOBIM, C. C. et al.. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, supl. esp., p. 101-119, 2007.

JUNGES, D. et al. Short communication: Influence of various proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 11, p. 1-4, 2017.

KELLER, L. A. M. et al. Gliotoxin contamination in and pre- and postfermented corn, sorghum and wet brewer's grain silage in Sao Paulo and Rio de Janeiro State Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 5, p. 865-873, 2012.

KUNG JR, L. et al. Microbial populations, fermentation end-products, and aerobic stability of corn silage treated with ammonia or a propionic acid-based preservative. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 7, p. 1479-1486, 2000.

KUNG JR, L. et al. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 4020-4033, 2018.

KUNG, JR. L. The effects of length of storage on the nutritive value and aerobic stability of silages. In: DANIEL, J. L. P.; SANTOS, M. C.; NUSSIO, L. G. (ed.). **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION**, 3., 2013, Campinas. **Proceeding...** Campinas: [s.n.], 2013. p. 7-19.

LATORRE, A. et al. Occurrence and stability of masked fumonisins in corn silage samples. **Food Chemistry**, v. 189, p. 38-44, 2015.

MCCARY, C. L. et al. Graduate Student Literature Review: Current perspectives on whole-plant sorghum silage production and utilization by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 3, p. 5783-5790, 2020.

MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. 2. ed. [S.l.]: Chalcombe Publications, 1991.

NRC. National Research Council. **Nutrient Requirement Tables. Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7. ed. Washington, DC: National Academies Press, 2001. 405 p.

OMS-OLIU, G. et al. Metabolic characterization of tomato fruit during preharvest development, ripening, and postharvest shelf-life. **Postharvest Biology and Technology**, v. 62, n. 1, p. 7-16, 2011.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H. et al. Anaerobic Conversion of Lactic Acid to Acetic Acid and 1,2-Propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 125-132, 2001.

PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Sciences Discussions**, v. 4, n. 2, p. 439-473, 2007.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2020. URL <https://www.R-project.org/>.

ROBLEDO, A. et al. Production of thermostable xylanase by thermophilic fungal strains isolated from maize silage. **CYTA- Journal of Food**, v. 14, p. 302-308, 2015.

SCHAARSCHMIDT, S.; FAUHL-HASSEK, C. The fate of mycotoxins during the processing of wheat for human consumption. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 3, p. 556-593, 2018.

SCHMIDT, P. et al. Concentration of mycotoxins and chemical composition of corn silage: A farm survey using infrared thermography. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 9, p.1-11, 2015.

SENGER, C. C. D. et al. Short communication: Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 146, n. 1-2, p. 169-174, 2008.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de Alimentos (Métodos químicos e biológicos)**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 2002. 165 p.

STORM, I. M. L. D.; RASMUSSEN, R. R.; RASMUSSEN, P. H. Occurrence of Pre- and Post-Harvest Mycotoxins and Other Secondary Metabolites in Danish Maize Silage. **Toxins**, v. 6, n. 8, p. 2256-2269, 2014.

SULYOK, M.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 5, p. 1505-1523, 2007.

TABACCO, E. et al. Dry matter and nutritional losses during aerobic deterioration of corn and sorghum silages as influenced by different lactic acid bacteria inocula. **Journal Dairy Science**, v. 94, n. 3, p. 1409-1419, 2011.

TANGERMAN, A.; NAGENGAST, F. M. A gas chromatographic analysis of fecal short-chain fatty acids, using the direct injection method. **Analytical Bioanalytical**, v. 236, n. 1, p. 1-8, 1996.

UDÉN, P. Fresh and ensiled forage plants—total composition, silage losses and the prediction of silage composition from the crop. **Grass and Forage Science**, v. 73, n. 2, p. 1-12, 2017.

UEGAKI, R.; TSUKIBOSHI, T.; TOHNO, M. Changes in the concentrations of fumonisin, deoxynivalenol and zearalenone in corn silage during ensilage. **Animal Science Journal**, v. 84, n. 9, p. 656-662, 2013.

WAMBACQ, E. et al. Occurrence, prevention and remediation of toxigenic fungi and mycotoxins in silage: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 7, p. 2284-2302, 2016.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo, demonstram que o prolongar do tempo de conservação ocasiona mudanças no valor nutricional da silagem de sorgo de planta inteira. Tais alterações foram observadas na redução constante nas frações de carboidratos solúveis e aumento das frações insolúveis. O período de conservação resultou em aumento em relação as frações proteicas, porém, houve diminuição na produção de gás *in vitro*. Devido a isto, vale ressaltar, que as mudanças constantes ao longo do tempo de conservação sobre a qualidade das silagens devem ser consideradas ao realizar a formulação de dietas para vacas leiteiras e na atualização do banco de dados do modelo CNCPS.

Ademais, as perdas nutricionais anaeróbias aumentam ao longo do período de conservação. Entretanto, as micotoxinas AFLA e FUMO não apresentam prevalência de contaminação no material pré-ensilado e após o processo de conservação. Por outro lado, as micotoxinas ZEA e DON apresentaram alto risco de contaminação em silagem de sorgo de planta inteira, sendo que o tempo de conservação não foi capaz de atenuar a concentração de DON e ZEA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J. M. A review of the literature concerning losses in stored cereals and pulses. **Tropical Science**, v. 19, p. 1-27, 1977.

ALBUQUERQUE, C. J. B. et al. Características agronômicas e bromatológicas dos componentes vegetativos de genótipos de sorgo forrageiro em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 12, n. 2, p. 164-182, 2013.

ALONSO, V. A. et al. Review Article: Fungi and mycotoxins in silage: an overview. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 637-643, 2013.

AMARAL, R. C.; NUSSIO, L. G. Fungos e micotoxinas em silagens: In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 4. Maringá. **Anais...** Maringá: UEM, 2011. p. 221-250.

AMER, S. et al. Effects of water-soluble carbohydrate content on ensiling characteristics, chemical composition and in vitro gas production of forage millet and forage sorghum silages. **Animal Feed Science and Technology**, v. 177, n. 1-2, p. 23-29, 2012.

ANUNCIACÃO, P. C. et al. Comparing sorghum and wheat whole grain breakfast cereals: Sensorial acceptance and bioactive compound content. **Food Chemistry**, v. 221, p. 984-989, 2017.

ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada nº.7, de 18 de fevereiro de 2011**. Limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. [S.l.]: ANVISA, 2011. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br>>. Acesso em: 10 nov. 2020.

ARAGÓN, Y. A. et al. Mycotoxins in Silages: Occurrence and Prevention. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2011.

ARAGÓN, Y. A.; RODRIGUES, I. The occurrence of mycotoxins in silages. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 2009, Madison. **Proceedings...** Madison: ISC, 2009. p. 201-202.

ARCARI, M. A. et al. Effect of the ensiling time of hydrated ground corn on silage composition and in situ starch degradability. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 1, p. 60-71, 2016.

ASSIS, J. R. et al. Micotoxinas no metabolismo e desempenho de animais ruminantes. **Journal of Biology e Pharmacy and Agricultural Management**, v. 15, n. 4, p.404-435, 2019.

ÁVILA, C. L. S.; CARVALHO, B. F. Silage fermentation—updates focusing on the performance of micro-organisms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 4, p. 966-984, 2019.

AWIKA, J. M.; ROONEY, L. W. Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. **Phytochemistry**, v. 65, n. 9, p. 1199-1221, 2004.

- BANDYOPADHYAY, R.; KUMAR, M.; LESLIE, J. Relative severity of aflatoxin contamination of cereal crops in West Africa. **Food Additives and Contaminants: Part A**, v. 24, n. 10, p. 1109-1114, 2007.
- BARON, V. S.; STEVENSON, K. R.; BUCHANAN-SMITH, J. G. Proteolysis and fermentation of grain-corn ensiled at several moisture levels and under several simulated storage methods. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 66, n. 2, p. 451-461, 1986.
- BARRIÈRE, Y. et al. Genetics and genomics of lignification in grass cell walls based on maize as model species. **Genes, Genomes and Genomics**, v. 1, n. 2, p. 133-156, 2007.
- BATTACONE, G. et al. The transfer of aflatoxin M1 in milk of ewes fed diet naturally contaminated by aflatoxins and effect of inclusion of dried yeast culture in the diet. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 4997-5004, 2009.
- BELLUCO, B. **Distribuição de desoxinivalenol nas frações de trigo obtidas no processo de moagem**. 2014. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 2014.
- BELTON, P. et al. Kafirin structure and functionality. **Journal of Cereal Science**, v. 44, n. 3, p. 272-286, 2006.
- BERNARD, J. K.; TAO, S. Short communication: Production response of lactating dairy cows to brachytic forage sorghum silage compared with corn silage from first or second harvest. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 12, p. 8994-9000, 2015.
- BERNARDES, T. F. et al. Feed-out rate used as a tool to manage the aerobic deterioration of corn silages in tropical and temperate climates. **Journal of Dairy Science**, v. 104, p. 1, 2021.
- BERNARDES, T. F. et al. Silage review: Unique challenges of silages made in hot and cold regions. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 4001-4019, 2018.
- BOGUHN, J. et al. Effects of concentrate proportion in the diet with or without Fusarium toxin contaminated triticale on ruminal fermentation and the structural diversity of rumen microbial communities in vitro. **Archives of Animal Nutrition**, v. 64, p. 467-483, 2010.
- BORREANI, G. et al. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 3952-3979, 2018.
- BORREANI, G.; TABACCO, E. The relationship of silage temperature with the microbiological status of the face of corn silage bunkers. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 6, p. 2620-2629, 2010.
- BOUDRA, H.; MORGAVI, D. P. Reduction in Fusarium toxin levels in corn Silage with low dry matter and storage time. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 12, p. 4523-4528, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância 756 Sanitária. Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites 757 máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 fev. 2011 Seção 1, p. 72.

BRIDGES, A. et al. Zearalenone concerns in reproducing livestock. **Purdue Extension, Purdue University**, v. 598, n. 1, p. 01-03, 2010.

BRYDEN, W. L.; WAYNE, L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, p. 134-158, 2012.

BUENO, J. L. et al. Storage length interacts with maturity to affect nutrient availability in unprocessed flint corn silage. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 49, p. 1-14, 2020.

BUSO, W. H. D. et al. Utilização do sorgo forrageiro na alimentação animal. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 5, n. 23, p. 1-29, 2011.

CALONI, F. et al. In vitro metabolism of fumonisin B1 by ruminal microflora. **Veterinary Research Communications**, v. 24, p. 379-387, 2000.

CATTANI, M. et al. Effects of total replacement of corn silage with sorghum silage on milk yield, composition, and quality. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, n. 15, p. 1-8, 2017.

CAVALLARIN, L.; BORREANI, G.; TABACCO E. Mycotoxin occurrence in farm maize silages in northern Italy. **Grassland Science in Europe**, v. 9, p. 1023-1025, 2004.

CHALA, A. et al. Multimycotoxin analysis of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) and finger millet (*Eleusine coracana* L. Gaertn.) from Ethiopia. **Food Control**, v. 45, p. 29-35, 2014.

CHELI, F.; CAMPAGNOLI, A.; DELL'ORTO, V. Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. **Animal Feed Science and Technology**, v. 183, p. 1-16, 2013.

CNCPS. **Cornell net carbohydrate and protein system**. Ithaca: Cornell University, 2002. Software, version 5.0.18

CONAB. Campanha Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos, Safra 2019/20 - Primeiro levantamento**. Brasília: CONAB, 2019. p. 1-47. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>>. Acesso em: 11 jan. 2021.

CONTRERAS-GOVEA, E. F. et al. Forage Sorghum Nutritive Value: A Review. **Forage and Grazinglands**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2010.

COSTA, R. F. et al. Agronomic characteristics of sorghum genotypes and nutritional values of silage. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 38, n. 2, p. 127-133, 2016.

CREEPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, v. 127, n. 1-3, p. 19-28, 2002.

CURADO, P. H. C. F. **Efeito de adição de amiloglucosidase e pepsina ao longo do tempo de ensilagem do milho grão moído e reidratado**. 2020. 31 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 2020.

- DAL POZZO, M. et al. Impacto dos adsorventes de micotoxinas β -glucana ou montmorilonita sobre a fermentação ruminal de bovinos in vitro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1-6, 2016.
- DÄNICKE, S. K. et al. Effects of Fusarium toxin-contaminated wheat grain on nutrient turnover, microbial protein synthesis and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone in the rumen of dairy cows. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 89, n. 9-10, p. 303-315, 2005.
- DÄNICKE, S.; WINKLER, J. Invited review: Diagnosis of zearalenone (ZEN) exposure of farm animals and transfer of its residues into edible tissues (Carry over). **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, p. 225-249, 2015.
- DANIEL, J. L. P. et al. Production and utilization of silages in tropical areas with focus on Brazil. **Grass and Forage Science**, v. 74, n. 2, p. 188-200, 2019.
- DANIEL, J. L. P.; JUNGES, D.; NUSSIO, L. G. Alterações na qualidade de silagens de milho durante o armazenamento. In: JOBIM, C. C.; CECATO, U.; CANTO, M.W.; BANKUTI, F.I. (eds.). SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 5., 2014. Maringá, **Anais...** Maringá, 2014. p.23-36.
- DEL PALACIO, A.; BETTUCCI, L.; PAN, D. Fusarium and Aspergillus mycotoxins contaminating wheat silage for dairy cattle feeding in Uruguay. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.47, n. 4, p. 1000-1005, 2016.
- DEL PALACIO, A.; PAN, P. Occurrence and toxigenic potential of Aspergillus section Flavi on wheat and sorghum silages in Uruguay. **Mycology**, v. 11, n. 2, p. 147-157, 2020.
- DER BEDROSIAN, M. C.; NESTOR JR, K. E.; KUNG JR, L. The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 9, p. 5115-5126, 2012.
- DIAZ, D. E. et al. Aflatoxin Binders II: Reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. **Mycopathologia**, v. 157, p. 233-241, 2004.
- DIAZ, D. E. et al. Effect of fumonisin on lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1171, 2000.
- DIEPERSLOOT, E. C. et al. Effects of Microbial Inoculation and Storage Length on Fermentation Profile and Nutrient Composition of Whole-Plant Sorghum Silage of Different Varieties. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1-16, 2021.
- DILKIN, P. et al. Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de aflatoxinas em híbridos de milho. **Ciência Rural**, v. 1, n. 1, p. 137-141, 2000.
- DILKIN, P. et al. Micotoxinas: prevalência em alimentos, efeitos em animais e seu controle. In: AVISULAT, 2014, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Avisulat, Sanidade, 2014.
- DILKIN, P.; MALLMANN, C. A. Sinais clínicos e lesões causadas por micotoxinas. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 11., 2004, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: USP-ESALQ, 2004. p. 32-35.

DONG, M. et al. The toxic effects and fate of intravenously administered zearalenone in goats. **Toxicon**, v. 55, n. 2, p. 523-530, 2010.

DRIEHUIS, F. et al. Occurrence of Mycotoxins in Feedstuffs of Dairy Cows and Estimation of Total Dietary Intakes. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 11 p. 4261-4271, 2008.

DRIEHUIS, F. Occurrence of mycotoxins in silage. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2., 2011, São Pedro. **Proceedings...** São Pedro: [s.n.], 2011. p. 85-104.

DUARTE, S. C. et al. Aflatoxin M1 in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal exposure. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 411-417, 2013.

DUODU, G. et al. Factors affecting sorghum protein digestibility. **Journal of Cereal Science**, v. 38, n. 2, p. 117-131, 2003.

DUVNJAK, M.; KLJAK, K.; GRBEŠA, D. Response of common silage corn hybrids to inoculant application: fermentation profile, carbohydrate fractions, and digestibility during ensiling. **Animal Production Science**, v. 59, n. 9, p. 1-9, 2019.

DYKES, L.; ROONEY, L. W. Sorghum and Millets Phenols and Antioxidants. **Journal of Cereal Science**, v. 44, n. 3, p. 236-251, 2006.

ECKARD, S. et al. Incidence of Fusarium Species and Mycotoxins in Silage Maize. **Toxins**, v. 3, n. 8, p. 949-967, 2011.

EFSA. European Food Safety Authority. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the Commission related to aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. **EFSA J**, v. 39, p. 1-27, 2004. Disponível em: <<https://efsa.online.library.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2004.39>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. **Official Journal of the European Union**, v. 229, p. 7-9, 2006.

FAO. Food and Agricultural Organization of the United Nations. **Arquivo de notícias**. [S.l.]: FAO, 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/news/archive/news-bydate/2014/pt/?page=2eipp=10etx_dynalist_pi1%5Bpar%5D=YToxOntzOjE6IkwiO3M6MToiMiI7fQ%3D%3D>. Acesso em: 3 mar.2020.

FAO. Food and Agriculture Organization. **Worldwide Regulations for Mycotoxins 1995: A Compendium**. Roma: FAO, 1997. n. 64.

FERNANDES, T. et al. Short Communication: Influence of sorghum cultivar, ensiling storage length, and microbial inoculation on fermentation profile, N fractions, ruminal in situ starch disappearance and aerobic stability of whole-plant sorghum silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 266, p. 1-22, 2020.

FERRARETTO, L. et al. Effect of corn silage hybrids differing in starch and neutral detergent fiber digestibility on lactation performance and total-tract nutrient digestibility by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 1, p. 395-405, 2015.

FERRARETTO, L. F. et al. Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia nitrogen and ruminal in vitro starch digestibility in high-moisture corn samples. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 5, p. 3221-3227, 2014.

FERRARETTO, L. F.; SHAVER, R. D. Effect of corn shreddlage on lactation performance and total tract starch digestibility by dair cows. **The Professional Animal Scientist**, v. 28, n. 6, p. 639-647, 2012.

FERRARETTO, L. F.; SHAVER, R. D.; LUCK, B. D. Silage review: Recent advances and future technologies for whole-plant and fractionated corn silage harvesting. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 3937-3951, 2018.

FERREIRA, O. E. **Produção de etanol a partir de sorgo sacarino com tratamento enzimático**. 2015. 98f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Federal Paulista, Jaboticabal, SP, 2015.

FERRERO, F. et al. Effects of conservation period and *Lactobacillus hilgardii* inoculum on the fermentation profile and aerobic stability of whole corn and sorghum silages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 5, p. 2530-2540, 2018.

FINK-GREMMELS, J. **Mycotoxins in forages**. Mycotoxins Blue Book. Nottingham: University Press, 2005. p. 249-268.

FINK-GREMMELS, J. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 84-92, 2008.

GALLO, A. et al. Review on Mycotoxin Issues in Ruminants: Occurrence in Forages, Effects of Mycotoxin Ingestion on Health Status and Animal Performance and Practical Strategies to Counteract Their Negative Effects. **Toxins**, v. 7, n. 8, p. 3057-3111, 2015.

GARDINER, D. M. et al. Low pH regulates the production of deoxynivalenol by *Fusarium graminearum*. **Microbiology**, v. 155, p. 3149-3156, 2009.

GARON, D. et al. Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 9, p. 3479-3484, 2006.

GETACHEW, G. et al. Potential of Sorghum as an Alternative to Corn Forage. **American Journal of Plant Sciences**, v. 7, p. 1106-1121, 2016.

GIUBERTI, G. et al. Factors affecting starch utilization in large animal food production system: A review. **Starke**, v. 66, n. 1-2, p. 72-90, 2014.

GLAMOČIĆ, D. et al. Occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and zearalenone in maize silage in the region of Vojvodina, Serbia. **Acta Veterinaria**, v. 69, n. 1, p. 106-115, 2019.

GMP. Certification Scheme Animal Feed Sector, 2006. **Version Marzo 2008. Appendix 1: Product Standards (Including Residue Standards)**. The Hague: Productschap Diervoeder, 2008. p. 1-39.

GONÇALVES, B.; SANTANA, L.; PELEGRINI, P. Micotoxinas: uma revisão sobre as principais doenças desencadeadas no organismo humano e animal. **Revista de Saúde da Fiaciplac**, v. 4, n. 1, p. 1-12, 2017.

- GONZÁLEZ PEREYRA, M. L. et al. Comparative analysis of mycobiota and mycotoxins contaminating corn trench silos and silo bags. **Journal of the Science Food Agriculture**, v. 91, n. 8, p.1474-1481, 2011.
- GONZÁLEZ PEREYRA, M. L. et al. Evaluation of zearalenone, α -zearalenol, β -zearalenol, zearalenone 4-sulfate and β -zearalenol 4-glucoside levels during the ensiling process. **World Mycotoxin Journal**, v. 7, n. 3, p. 291-295, 2014.
- GONZÁLEZ PEREYRA, M. L. et al. Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 4, p. 1034-1041, 2008.
- GRUM, D. E.; SHOCKEY, W. L.; WEISS, W. P. Electrophoretic examination of alfalfa silage proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 1, p. 146-154, 1991.
- HALLADA, C. M.; SAPIENZA, D. A.; TAYSOM, D. Efeito da duração do tempo ensilado na matéria seca, amido e digestibilidade da fibra em toda a silagem de planta de milho. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 1, p. 30, 2008.
- HAMZA, N. B. et al. MicroRNA expression profiles in response to drought stress in Sorghum bicolor. **Gene Expression Patterns**, v. 20, n. 2, p. 88-98, 2016.
- HARPER, M. T. et al. Using brown midrib 6 dwarf forage sorghum silage and fall-grown oat silage in lactating dairy cow rations. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 7, p. 5250-5265, 2017.
- HILDEBRAND, B. et al. Effect of Fusarium toxin contaminated triticale and forage-to-concentrate ratio on fermentation and microbial protein synthesis in the rumen. **Journal of Animal Physiology Animal Nutrition**, v. 96, n. 2, p. 307-318, 2012.
- HOFFMAN, P. C. et al. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2465-2474, 2011.
- HOLDING, D. R. Recent advances in the study of prolamin storage protein organization and function. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 276, p. 1-9, 2014.
- HORN, M. B. et al. Qualidade de silagens de milho para gado leiteiro produzidas na Região Sul do Brasil quanto às micotoxinas. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 8, n. 2, p. 1-30, 2014.
- HRISTOV, A. N. et al. Effects of ensiling time on corn silage neutral detergent fiber degradability and relationship between laboratory fiber analyses and in vivo digestibility. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 3, p. 1-14, 2020.
- HUSSAIN, A. et al. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four Mentha species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 11, p. 1827-1836, 2010.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Summary of data reported and evaluation. In: IARC. **Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans**. Lyon, France: Int. Agency Res. Cancer, 2002. v. 82, p. 171-175.

IMAMURA, K. B.; TONI, J.; GIANNONI, J. Ocorrência de aflatoxinas no amendoim (*Arachis hypogaea* L) beneficiado no estado de São Paulo. **Revista Analytica**, v. 1, n. 75, p. 49-57, 2015.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 635-709.

JENSEN, T. et al. Effect of ensiling duration on the fate of deoxynivalenol, zearalenone and their derivatives in maize silage. **Mycotoxin Research**, v. 36, p. 127-136, 2019.

JEONG, J. S. et al. Effects of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol on in vitro rumen fermentation. **Animal Feed Science Technology**, v. 162, n. 3-4, p. 144-148, 2010.

JOBIM, C. C.; GONÇALVES, G. D.; SANTOS, G. T. Qualidade Sanitária de Grãos e de Forragens Conservadas “versus” Desempenho Animal e Qualidade de seus Produtos. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 2001, Maringá. **Anais...** Maringá: [s.n.], 2001. p. 242-261.

JOUANY, J. P.; DIAZ, D. E. Effects of mycotoxins in ruminants. In: DIAZ, D. E. (ed.). **The mycotoxin blue book**. Nottingham: Nottingham University Press, 2005. p. 295-321.

JUNGES, D. et al. Short communication: Influence of various proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 11, p. 1-4, 2017.

KELLER, L. A. M. et al. Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: monitoring risk before and after fermentation. **Journal of Stored Products Research**, v. 52, p. 42-47, 2013.

KELLER, L. A. M. et al. Gliotoxin contamination in and pre- and postfermented corn, sorghum and wet brewer's grain silage in Sao Paulo and Rio de Janeiro State Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 5, p. 865-873, 2012.

KELLER, L. et al. Zearalenone and Its Derivatives α -Zearalenol and β -Zearalenol Decontamination by *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Bovine Forage. **Toxins**, v. 7, n. 8, p. 3297-3308, 2015.

KHOSRAVI, M. et al. Total replacement of corn silage with sorghum silage improves milk fatty acid profile and antioxidant capacity of Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 12, p. 10953-10961, 2018.

KIESSLING, K. et al. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, p. 1070-1073, 1984.

KLEINSCHMIT, D. H.; KUNG JR, L. The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage during various stages of ensiling. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 10, p. 3999-4004, 2006.

KROONEMAN, J. et al. *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 639-646, 2002.

KUNG JR, L. et al. Microbial populations, fermentation end-products, and aerobic stability of corn silage treated with ammonia or a propionic acid-based preservative. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 7, p. 1479-1486, 2000.

KUNG, JR. L. et al. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 4020-4033, 2018.

KUNG, JR. L. The effects of length of storage on the nutritive value and aerobic stability of silages. In: DANIEL, J. L. P.; SANTOS, M. C.; NUSSIO, L. G. (ed.). INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 3., 2013, Campinas. **Proceeding...** Campinas: [s.n.], 2013. p. 7-19.

KUNG, JR. L.; WINDLE, M. C.; WALKER, N. The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of highmoisture corn. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1707-1712, 2014.

LAMIC. Laboratório de Análises Micotoxicológicas. Universidade Federal de Santa Maria. **Tabelas de resultados**. Santa Maria, RS: LAMIC, 2018. Disponível em: <<https://www.lamic.ufsm.br/site/>>. Acesso em: 29 jan. 2021.

LANZAS, C. et al. A revised CNCPS feed carbohydrate fractionation scheme for formulating rations for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 136, n. 3-4, p. 167-190, 2007.

LATORRE, A. et al. Occurrence and stability of masked fumonisins in corn silage samples. **Food Chemistry**, v. 189, p. 38-44, 2015.

LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2. ed. [S.l.]: Revista dos Tribunais, 1997. 148 p.

LEPOM, P.; BAATH, H.; KNABE, O. Occurrence of *Fusarium* species and their mycotoxins in maize. 3. The influence of silaging on the zearalenone content of CCM maize. **Archives of Animal Nutrition**, v. 38, n. 9, p. 817-823, 1988.

LESLIE, J. F. et al. *Fusarium* species from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. **Phytopathology**, v. 80, n. 4, p. 343-350, 1990.

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T. M.; VAN SOEST, P. J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 57, n. 4, p. 347-358, 1996.

LINDGREN, S. E.; DOBROGOSZ, W. J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **FEMS Microbiology Review**, v. 87, p. 149-164, 1990.

LYONS, S. E. et al. Optimal harvest timing for brown midrib forage sorghum yield, nutritive value, and ration performance. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 8, p. 1-16, 2019.

- MACÊDO, A. J. da S.; SANTOS, E. M. Princípios básicos para produção de silagem. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 22, n. 4, p. 147-156, 2019.
- MACÊDO, A. J. da S. et al. Microbiology of silages: Literature Review. **Revista Electronica de Veterinaria**, v. 18, n. 9, p. 1-11, 2017.
- MAGALHAES, P. C.; DURAES, F. O. M.; SCHAFFERT, R. E. 2003. **Fisiologia da planta de sorgo**. Sete Lagoas, MG: EMBRAPA, CNPMS, 2003. 4p. (Boletim técnico-86).
- MALLMANN, C. A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos**. Santa Maria: Pallotti, 2007. 238 p.
- MALLMANN, C. A.; DILKIN, P.; MALLMANN, A. Panorama das Micotoxinas. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 6., 2014, São Pedro, SP. **Anais...** São Pedro, SP: CBNA, AMENA, 2014.
- MARTINS, M. L. H.; MARTINS, M. Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of deoxynivalenol and zearalenone in corn (*Zea mays*) by *Fusarium graminearum*. **Food Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 315-318, 2002.
- MATHUR, S. et al. Fumonisin B1 Is Hepatotoxic and Nephrotoxic in Milk-Fed Calves. **Toxicological Sciences**, v. 60, n. 2, p. 385-396, 2001.
- MCCUISTION, K. et al. Forage Mass, Nutritive Value, and In situ Degradation of Sorghum Silage Treated with Fibrolytic Enzymes. **Forage e Turfgrass Management**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2017.
- MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. 2. ed. [S.l.]: Chalcombe Publications, 1991.
- MIN, B. R. et al. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 106, n. 1-6, p. 3-19, 2003.
- MUCK, R. E. et al. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 3980-4000, 2018.
- MUCK, R. E. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, supl. esp., p. 183-191, 2010.
- NAEINI, S. Z. et al. Influence of ensiling time on chemical composition, fermentation characteristics, gas production and protein fractions of sweet sorghum silage. **Research Opinions in Animal and Veterinary Sciences**, v. 4, n. 6, p. 286-293, 2014.
- NERI, J. et al. Silagem de TMR (total mixed ration) e PMR (partial mixed ration) para vacas leiteiras: desafios e oportunidades. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO E NUTRIÇÃO DE GADO DE LEITE, 10-16, 2019, Uberlândia. **Anais...** Belo Horizonte: FEPMVZ, 2019. Disponível em: <http://www.eventos.ufu.br/sites/eventos.ufu.br/files/documentos/anais_simnutrileite_2019.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2020.
- NONES, J. et al. Evaluation of fungi and fumonisins in swine feed and its ingredients on a farm in Santa Catarina, Brazil. **Revista eletrônica Nutritime**, v. 11, n. 2, p. 3238-3245, 2014.

NOVINSKI, C. O. **Composição de micotoxinas e bromatologia de silagens de milho em silos de grande porte utilizando imagens em infravermelho**. 2013. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2013.

NOVISNKI, C. O.; SCHMIDT, P. Limites aceitáveis de micotoxinas em silagens de milho. **Portal Acadêmico da Ensilagem**, 2011. Disponível em: <<http://www.ensilagem.com.br>>. Acesso em: 05 out. 2020.

OKUMA, T. A.; HUYNH, T. P.; HELLBERG, R. S. Use of enzyme-linked immunosorbent assay to screen for aflatoxins, ochratoxin A, and deoxynivalenol in dry pet foods. **Mycotoxin Research**, v. 34, n. 1, p. 69-75, 2018.

OLIVEIRA, C. A. F. et al. Determinação de aflatoxina B1 em rações e aflatoxina M1 no leite de propriedades do Estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 221-225, 2010.

OLIVER, A. L. et al. Comparison of brown midrib-6 and -18 forage sorghum with conventional sorghum and corn silage in diets of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 3, p. 637-644, 2004.

OSWEILER, G. D. et al. Effects of fumonisincontaminated corn screenings on growth and health of feeder calves. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 2, p. 459-466, 1993.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H. et al. Anaerobic Conversion of Lactic Acid to Acetic Acid and 1,2-Propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 125-132, 2001.

PAHLOW, G.; MUCK, R. E.; DRIEHUIS, F. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H (ed.). **Silage Science and Technology**. Madison, WI: American Society of Agronomy, 2003. p. 31-93.

PEREIRA FILHO, I. A. P. et al. Avaliação de cultivares de sorgo sacarino *Sorghum bicolor* (L.) Moench em diferentes densidades de semeadura visando a características importantes na produção de etanol. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 12, n. 2, p. 118-127, 2013.

QUEIROZ, O. C. M. et al. Silage review: Foodborne pathogens in silage and their mitigation by silage aditives. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p.4132-4142, 2018.

QUEIROZ, O. C. M., A. T. et al. Can bacterial inoculants improve the quality of rust-infested corn silage? **Journal of Animal Science**, v. 87, suppl. esp., p. 543, 2009.

QUEIROZ, O. C. M.; RABAGLINO, M. B.; ADESOGAN, A. T. Mycotoxins in silage. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2., 2011, São Pedro. **Proceedings...** São Pedro: [s.n.], 2011. p. 105-126.

QUEIROZ, V. A. V. et al. **Boas práticas e sistema APPCC na fase de pós-colheita de milho**. Sete Lagoas, MG: EMBRAPA, dez. 2009. 28 p., Circular Técnica 122.

RAMOS, J. C. P. et al. Effect of replacing forage sorghum silage with biomass sorghum silage in diets for F1 Holstein × Zebu lactating cows. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, n. 99, p. 1-12, 2021.

RICHARD, E. et al. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature maize silage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 12, p. 2420-2425, 2007.

RICHARD, J. L. et al. Absence of detectable fumonisin in the milk cows fed *Fusarium proliferatum* (Nirenberg) culture material. **Mycopathologia**, v. 133, p. 123-126, 1996.

ROBLEDO, A. et al. Production of thermostable xylanase by thermophilic fungal strains isolated from maize silage. **CYTA- Journal of Food**, v. 14, p. 302-308, 2015.

RODRIGUES, J. A. S. Produção e utilização de silagem de sorgo. In: **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. Governador Valadares: AgroMinas, 2014.

RODRIGUES, P. H. M. et al. Sorghum silage quality as determined by chemical–nutritional factors. **Grass and Forage Science**, v. 75, n. 4, p. 462-473, 2020.

RUSSELL, J. B. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluation cattle diets: Ruminant fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3551-3581, 1992.

SÁNCHEZ-DUARTE, J. I. et al. Short communication: Meta-analysis of dairy cows fed conventional sorghum or corn silages compared with brown midrib sorghum silage. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 1, p. 419-425, 2019.

SANTOS, C. G. et al. Storage time and condensed tannin content of high-moisture sorghum grains: Effects on in vitro fermentation and mold populations. **Animal Nutrition Journal**, v. 6, n. 1, p. 92-97, 2020.

SANTOS, W. P. et al. The effect of length of storage and sodium benzoate on the nutritive value of reconstituted sorghum grain silages for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 10, p. 9028-9038, 2019.

SCHAARSCHMIDT, S.; FAUHL-HASSEK, C. The fate of mycotoxins during the processing of wheat for human consumption. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 3, p. 556-593, 2018.

SCHMIDT, P. et al. Concentration of mycotoxins and chemical composition of corn silage: A farm survey using infrared thermography. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 9, p. 1-11, 2015.

SCHMIDT, P. et al. Níveis de micotoxinas em silagens de milho em cinco bacias leiteiras do Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 48., Belém, 2011. **Anais...** Belém: UFRA, 2011.

SCHOLLENBERGER, M. et al. Occurrence and Distribution of 13 Trichothecene Toxins in Naturally Contaminated Maize Plants in Germany. **Toxins**, v. 4, n. 10, p. 778-787, 2012.

SCOTT, P. M. et al. Determination of fumonisins in milk. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 29, n. 5, p. 989-998, 1994.

SCUSSEL, V. M.; BEBER, M.; TONON, K. M. Efeitos da infecção por *Fusarium/Giberella* na qualidade e segurança de grãos, farinhas 53 e produtos derivados. In: REIS, E. M. (org). **Seminário sobre Giberella em cereais de inverno**. 1. ed. Passo Fundo: Berthier, 2011. p. 131-175.

SHARMA, R. P. Immunotoxicity of mycotoxins. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 3, p. 892-897, 1993.

SILVA, J. B. da et al. Mycoflora and Occurrence of Aflatoxin B1 and Fumonisin B1 during Storage of Brazilian Sorghum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 9, p. 4352-4356, 2000.

SILVA, J. B. da et al. Production of aflatoxins by *Aspergillus Flavus* and of fumonisins by *Fusarium* species isolated from Brazilian sorghum. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 182-186, 2004.

SILVA, N. C. et al. Influence of storage length and inoculation with *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of high-moisture corn and rehydrated corn grain silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 251, p. 124-133, 2019.

SOBROVA, P. et al. Deoxynivalenol and its toxicity. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 3, n. 3, p. 101-106, 2010.

TANGNI, E. K.; PUSSEMIER, L.; HOVE F. V. Mycotoxin Contaminating Maize and Grass Silages for Dairy Cattle Feeding: Current State and Challenges. **Journal of Animal Science Advances**, v. 3, n. 10, p. 492-511, 2013.

TELLER, R. S. et al. Effect of physical damage to ears of corn before harvest and treatment with various additives on the concentration of mycotoxins, silage fermentation, and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 3, p. 1428-1436, 2012.

TINYIRO, S. E. et al. Adsorption and degradation of zearalenone by *Bacillus* strains. **Folia Microbiologica**, v. 56, p. 321-332, 2011.

TOLEDO, E. A. et al. Does compaction degree and particle size influence bromatological composition and mycotoxin levels in corn silage? **Scientia Plena**, v. 16, n. 7, p. 1-7, 2020.

TOLEDO, E. A. **Quantificação de micotoxinas e análise bromatológica de silagens de milho na microrregião geográfica Apucarana, no norte do Paraná**. 2018. 73 p. Dissertação – (Mestrado em Saúde e Produção de Ruminantes) – Universidade Norte do Paraná, Araçongas, PR, 2018.

UDÉN, P. Fresh and ensiled forage plants—total composition, silage losses and the prediction of silage composition from the crop. **Grass and Forage Science**, v. 73, n. 2, p. 1-12, 2017.

VENTURINI, T. **Caracterização da silagem do sorgo forrageiro agri 002e e utilização na alimentação de bovinos**. 2019. 148 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, PR, 2019.

VIANA, P. T. et al. Fracionamento de carboidratos e de proteína das silagens de diferentes forrageiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 2, p. 292-297, 2012.

WEAVER, G. A. et al. Effect of zearalenone on dairy cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, p. 1826-1828, 1986.

WHITLOW L.W.; HAGLER, W.M. Mycotoxins: A Review of Dairy Concerns. **Mid-South Ruminant Nutr. Conf.**, EUA, p. 47-58, 2005.

WHITLOW, L. W.; NEBEL, R. L.; HAGLER, JR. W. M. The association of deoxynivalenol in grain with milk production loss in dairy cows. In: LLEWELLYN, G. C.; DASHEK, W. V.; O'REAR, C. E. (ed.). **Biodeterioration Research 4**. New York: Plenum Press, 1994. p. 131-139.

WILKINSON, J. M.; DAVIES, D. R. Review Paper: The aerobic stability of silage: key findings and recent developments. **Grass and Forage Science**, v. 68, p. 1-19. 2012.

WINKLER, J. et al. Residues of zearalenone (ZEN), deoxynivalenol (DON) and their metabolites in plasma of dairy cows fed Fusarium contaminate maize and their relationships to performance parameters. **Food and Chemical Toxicology**, v.65, p.196–204, 2014

YANG, Y. et al. Production performance, nutrient digestibility, and milk fatty acid profile of lactating dairy cows fed corn silage- or sorghum silage-based diets with and without xylanase supplementation. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 3, p. 1-9, 2019.

YI, P. J.; PAI, C. K.; LIU, J. R. Isolation and characterization of a *Bacillus licheniformis* strain capable of degrading zearalenone. **World Journal of Microbiology Biotechnolgt**, v. 27, p. 1035-1043, 2011.

ZHANG, S. J. et al. Associative effects of ensiling mixtures of sweet sorghum and alfalfa on nutritive value, fermentation and methane characteristics. **Animal Feed Science and Technology**, v. 206, p. 29-38, 2015.

ZHONG, R. Z. et al. Effects of substituting finely ground sorghum for finely ground corn on feed digestion and meat quality in lambs infected with *Haemonchus contortus*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 211, p. 31-40, 2016.