

VANESSA PAULA DA SILVA

**BACTÉRIAS LÁTICAS EM SILAGEM DE ALFAFA E DESEMPENHO DE
BOVINOS DE CORTE ALIMENTADOS COM SILAGENS DE
ESTILOSANTES OU MILHO, COM E SEM CONCENTRADO PROTEICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

S586b
2018
Silva, Vanessa Paula da, 1988-
Bactérias lácticas em silagem de alfafa e desempenho de bovinos
de corte alimentados com silagens de estilosantes ou milho, com e sem
concentrado proteico / Vanessa Paula da Silva. - Viçosa, MG, 2018.
xi, 60 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Odilon Gomes Pereira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Silagem. 2. Bovinos de corte - Alimentação e rações. 3.
Leguminosa. 4. Rúmen - Fermentação. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.20862

VANESSA PAULA DA SILVA

BACTÉRIAS LÁTICAS EM SILAGEM DE ALFAFA E DESEMPENHO DE BOVINOS DE CORTE ALIMENTADOS COM SILAGENS DE ESTILOSANTES OU MILHO, COM E SEM CONCENTRADO PROTEICO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 31 de julho de 2018.


Sebastião de Campos Valadares Filho


Karina Guimarães Ribeiro


André Soares de Oliveira


Eliana dos Santos Leandro


Odilon Gomes Pereira
(Orientador)

À minha amada mãe Aparecida,
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, força e amor.

À minha mãe, exemplo de força, coragem e pelo apoio e amor incondicional.

À minha família por sempre acreditarem em mim e não me deixarem desistir.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Zootecnia, ao Laboratório de Forragicultura e a todos os professores pelos conhecimentos ministrados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao INCT-CA pelo financiamento parcial desta pesquisa.

Ao professor Odilon Gomes Pereira pela orientação, confiança e apoio para a realização deste trabalho.

Aos professores Sebastião de Campos Valadares Filho, Karina Guimarães Ribeiro, André Soares de Oliveira e Eliana dos Santos Leandro.

Aos irmãos científicos que estiveram presente a todo o momento, demonstrando que somos uma equipe e acima de tudo grandes amigos: Mariele, João Paulo, Tâmara, Iana, Felipe, Néia, Carla, Leidy, Thiago e Leandro.

Aos estagiários Andréia, Yago e Jaína e aos amigos pela ajuda e risadas que fizeram dos meus dias mais felizes.

A toda equipe da CEPET, especialmente Zé Maria, Marquinhos, Beto, Luiz Guilherme e Tião, pela ótima acolhida e ajuda durante o experimento.

Aos Funcionários do Departamento de Zootecnia Faustino Monteiro, Raimundo e Mário pela colaboração e auxílio sempre que necessário.

BIOGRAFIA

Vanessa Paula da Silva, filha de Aparecida Natal da Costa e Ulisses Gonzaga da Silva, nasceu em 9 de agosto de 1988, na cidade de Ribeirão Pires, São Paulo.

Em janeiro de 2012 formou-se no curso de Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa – Viçosa.

Em agosto de 2012 ingressou no mestrado em zootecnia, no curso de Pós-Graduação em Zootecnia, pela Universidade Federal de Viçosa-MG, concluindo em julho de 2014.

Em agosto de 2014, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado, em Zootecnia – na área de Forragicultura e Pastagens – da UFV, submetendo-se à defesa da Tese em 31 de julho de 2018.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	4

Capítulo I

EFEITO DA ADIÇÃO DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM*, *LACTOBACILLUS BREVIS* E *PEDIOCOCCUS ACIDILACTI* ISOLADOS DE SILAGEM DE ALFAFA SOBRE O PERFIL FERMENTATIVO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE SILAGENS DE ALFAFA

Resumo	7
Abstract.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1. Área experimental e condições climáticas.....	13
2.2. Preparo do inoculante microbiano.....	14
2.2.1. Isolados de silagem de alfafa.....	13
2.2.2. Inoculante comercial.....	14
2.3. Ensilagem e delineamento experimental.....	14
2.4. Composição química	15
2.5. Perfil fermentativo e recuperação de matéria seca.....	15
2.5.1. pH, ácidos orgânicos, nitrogênio amoniacal e carboidratos solúveis em água.....	15
2.5.2. Recuperação de matéria seca.....	16
2.6. Quantificação das populações microbianas.....	16
2.7. Análises estatísticas	16
3. RESULTADOS	17
3.1. Planta antes da ensilagem.....	17
3.2. Composição química das silagens	18
3.3. Perfil fermentativo	19
3.4. Quantificação das populações microbianas.....	21
4. DISCUSSÃO	22
4.1. Composição química.....	22
4.2. Perfil fermentativo	23

4.3. Populações microbianas.....	25
5. CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS	27

Capítulo II

PARÂMETROS NUTRICIONAIS E DESEMPENHO DE BOVINOS DE CORTE ALIMENTADOS COM SILAGEM DE *STYLOSANTHES* SPP. OU SILAGEM DE MILHO E DOIS TIPOS DE CONCENTRADO

Resumo	33
Abstract.....	35
1.INTRODUÇÃO.....	36
2.MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1. Área experimental e condições climáticas.....	37
2.2. Animais, delineamento experimental e dietas.....	37
2.3. Análises laboratoriais.....	41
2.4. Análises estatísticas	43
3.RESULTADOS	44
3.1. Consumo dos nutrientes (Experimento 1).....	44
3.2. Digestibilidades total, ruminal e intestinal (Experimento1)	44
3.3. Fermentação ruminal	46
3.4. Utilização do nitrogênio	46
3.5. Consumo dos nutrientes, digestibilidade total e desempenho (Experimento 2)..	47
3.6. Avaliação bioeconômica	49
4. DISCUSSÃO.....	50
4.1. Consumo dos nutrientes e digestibilidade (Experimento 1).....	50
4.2. Fermentação ruminal	52
4.3. Utilização do nitrogênio	52
4.4. Consumo dos nutrientes, digestibilidade total e desempenho (Experimento 2)..	53
4.5. Avaliação bioeconômica.....	54
5. CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS	55
CONCLUSÕES GERAIS	60

RESUMO

SILVA, Vanessa Paula da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Bactérias lácticas em silagem de alfafa e desempenho de bovinos de corte alimentados com silagens de estilosantes ou milho, com e sem concentrado proteico.** Orientador: Odilon Gomes Pereira.

Objetivou-se com esse trabalho avaliar o perfil de fermentação e a utilização de silagens de leguminosas em dietas de bovinos de corte. Para isso, foram conduzidos três experimentos. O primeiro experimento (capítulo I) foi realizado para avaliar o perfil fermentativo, a composição química e as populações microbianas de silagens de alfafa tratadas com inoculantes microbianos (I) em dois cortes (C). Foi utilizado um esquema fatorial 4×2 (quatro inoculantes e dois cortes), em um delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os inoculantes avaliados foram: 1. Sem inoculante (Controle); 2. *Lactobacillus plantarum* (AV 14.17); 3. Mistura de *L. plantarum*, *L. brevis* e *P. acidilactici* (Combo); e 4. Inoculante comercial (IC). Todos os inoculantes foram aplicados na taxa de 10^6 UFC/g MN de forragem. Os inoculantes usados nos tratamentos 2 e 3 foram selecionados de estudo prévio com silagens de alfafa. Os cortes foram realizados em janeiro (corte 1) e março (corte 2) de 2016. Foram usados os mesmos inoculantes e procedimentos para ensilagem em ambos os cortes. O menor pH foi encontrado para as silagens tratadas com a cepa AV 14.17, enquanto o teor de nitrogênio amoniacal foi maior para a silagem controle no corte 2. O pH e a concentração de nitrogênio amoniacal foram menores nas silagens do corte 2, com médias de 4,34 e 59,86 g/kg N total, respectivamente. No corte 2 a silagem tratada com a cepa AV 14.17 apresentou maior teor de carboidratos solúveis residual. Foi observada maior recuperação de matéria seca na silagem controle no corte 1 em relação ao corte 2 (974,4 vs. 950,4 g/kg MS). Na avaliação da composição química, o teor de matéria seca foi maior para as silagens tratadas com os inoculantes microbianos em relação à silagem controle e o teor de proteína bruta apenas diferiu entre os cortes, com maiores valores para o corte 2. Houve efeito de interação $I \times C$ sobre os teores de FDN e FDA. Silagens produzidas no corte 1 apresentaram menores valores de FDN e FDA quando tratadas com o inoculante comercial e o combo, respectivamente. O teor de NIDA não diferiu entre as silagens. Foi observado maior teor de ácido láctico e menor teor de ácido acético nas silagens produzidas no corte 2. Houve efeito de interação $I \times C$ sobre a relação ácido láctico: ácido acético, sendo registrado maior valor na silagem tratada com a cepa AV 14.17 no corte 2. Houve efeito de interação $I \times C$ na população de leveduras, com menor contagem para o inoculante comercial no corte 2. As contagens de bactérias

láticas foram maiores e de fungos menores no corte 1. A cepa AV 14.17 reduz o pH e o teor de nitrogênio amoniacal e aumenta a relação ácido lático: ácido acético em silagens de alfafa produzidas em condições tropicais, apresentando potencial de uso como inoculante. Nos outros dois experimentos (capítulo II), foram avaliados a digestibilidade, fermentação ruminal, utilização do nitrogênio e o desempenho de bovinos de corte alimentados com dietas contendo silagem de *Stylosanthes* cv. Campo Grande (StS) ou de milho (SM) e dois concentrados, sem (C1) ou com farelo de soja (C2). Foi utilizada relação forragem: concentrado de 50:50, na base da matéria seca. No primeiro experimento, quatro bovinos com peso médio de $200 \pm 15,7$ kg, fistulados no rúmen e abomaso, foram distribuídos em delineamento em quadrado latino, em arranjo fatorial 2×2 , sendo dois volumosos (StS ou SM) e dois concentrados (C1 ou C2). O experimento foi constituído de quatro períodos experimentais com duração de 16 dias cada. No segundo experimento, dietas semelhantes foram avaliadas em 48 bovinos da raça Nelore com peso médio de 358 ± 30 kg, distribuídos em arranjo fatorial 2×2 , no delineamento inteiramente casualizado, com 12 repetições. O período experimental teve 99 dias de duração, dos quais 15 dias foram para a adaptação e 84 para a coleta de dados. No primeiro experimento, as digestibilidades ruminal, intestinal e total dos nutrientes não foram influenciadas pelas dietas ($P > 0,05$). Os consumos de CNF e NDT foram maiores ($P < 0,05$) para as dietas contendo SM. O consumo de FDNi foi maior para as dietas contendo StS ($P < 0,05$). Houve tendência ($P < 0,10$) de maior consumo de MS, PB, MO e FDN para as dietas contendo SM. O tipo de concentrado afetou o consumo de nitrogênio, sendo maior valor obtido para a dieta contendo C2 ($P = 0,03$). O balanço de nitrogênio foi maior para a dieta contendo SM ($P = 0,047$). Houve tendência ($P < 0,10$) de maior síntese de proteína microbiana para as dietas contendo SM e de interação para a eficiência microbiana, sendo maior para a SM com o C2. No segundo experimento, os consumos de MS, MO, PB e FDN foram afetados pelo concentrado, sendo maiores ($P < 0,05$) para o C2. Os consumos de FDNi e de EE foram maiores ($P < 0,05$) para as dietas com StS. As dietas contendo SM apresentaram maior consumo de CNF ($P < 0,05$) e tendência de maior consumo de FDN ($P = 0,06$). A digestibilidade aparente total dos nutrientes não foi afetada ($P > 0,05$) pelas dietas. Os ganhos médios diários de peso e de carcaça foram maiores ($P < 0,05$) para as dietas contendo C2, com médias de 1,3 kg e 0,81 kg, respectivamente. No entanto, houve tendência ($P = 0,07$) de maior eficiência alimentar para as dietas contendo SM. O rendimento de carcaça não foi afetado ($P > 0,05$) pelas dietas. Desta forma, conclui-se que a StS não altera os GMD e

GMDC em bovinos de corte na fase de terminação, podendo substituir a silagem de milho, sem alterar a amônia e o pH ruminal. No entanto, deve-se manejar a fonte de concentrado de forma a não prejudicar os parâmetros produtivos.

ABSTRACT

SILVA, Vanessa Paula da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Lactic acid bacteria in alfalfa silage and beef cattle performance fed *Stylosanthes* spp. or corn silages, with and without protein concentrate.** Adviser: Odilon Gomes Pereira.

The objective of this work was to evaluate the fermentation profile and the use of legume silages in beef cattle diets. Three experiments were developed: The first experiment (chapter I) was carried out to evaluate the changes on the fermentation profile, chemical composition and microbial populations of alfalfa silages treated with microbial inoculants (I) in two cuts (C). The experiment was conducted according to the completely randomized design in a 4×2 factorial scheme (four microbial inoculants and two cuts), with four replicates. The inoculants evaluated were: 1. No inoculant (Control); 2. *Lactobacillus plantarum* (AV 14.17); 3. Mixture of *L. plantarum*, *L. brevis* and *P. acidilactici* (Combo); and 4. Commercial inoculant (CI). All inoculants were applied at the rate of 10^6 CFU/g fresh matter. The inoculants used in the treatments 2 and 3 were selected from a previous study with alfalfa silages. The cuts were performed in January (cut 1) and March (cut 2), 2016. The same inoculants and procedures were used for ensiling in both cuts. The silages treated with the strain AV 14.17 showed the lowest pH while ammonia nitrogen content was higher for the control silage in the cut 2. The pH and ammonia nitrogen concentration were lower in the silages produced in the cut 2, with averages of 4.34 and 59.86 g/kg total N, respectively. In the second cut, the strain AV 14.17 resulted in higher concentration of residual water-soluble carbohydrates in the silage. The dry matter recovery was higher in the control silage in the cut 1 compared to the cut 2 (974.4 vs. 950.4 g/kg DM). In the chemical composition evaluation, the dry matter content was higher for the silages treated with microbial inoculants compared to the control silage and the crude protein content was different only between cuts, where the cut 2 showed the highest value. The NDF and ADF contents were affected by the $I \times C$ interaction. The silages produced in the cut 1 showed lower values of NDF and ADF when treated with the commercial inoculant and the combo, respectively. The ADIN content did not differ between silages. It was observed higher lactic acid content and lower acetic acid content in the silages produced in the cut 2. There was an $I \times C$ interaction effect for the lactic acid to acetic acid ratio, with the highest value found for the silage treated with the strain AV 14.17 in the cut 2. There was an $I \times C$ interaction effect on the yeast population with the lower number for the commercial inoculant in the cut 2. The lactic acid bacteria number was higher and

the mold number was lower for the silages in the cut 1. The strain AV 14.17 reduce the pH and ammonia nitrogen content and increase the lactic acid to acetic acid ratio in alfalfa silages produced in tropical regions, presenting potential of use as inoculant. In the other two experiments (chapter II) were evaluated the digestibility, ruminal fermentation, nitrogen utilization and performance of beef cattle fed diets containing *Stylosanthes* cv. Campo Grande silage (StS) or corn silage (CS) and two concentrates, without (C1) or with soybean meal (C2). A 50:50 forage: concentrate ratio was used, on a DM basis. In the first experiment, four bulls with an average initial body weight (BW) of 200 ± 15.7 kg, rumen and abomasum fistulated, were distributed to a latin square with a 2×2 factorial design, two silages (StS or CS) and two concentrates (C1 or C2). The experiment consisted of four experimental periods with a duration of 16 days each. In the second experiment, the same diets were evaluated and 48 Nellore bulls with an average initial BW of 358 ± 30 kg were distributed to a 2×2 factorial arrangement in a complete randomized design, with 12 replicates. The experimental period lasted 99 days: 15 days for adaptation and 84 days for data collection. In the first experiment, diets did not alter the ruminal, intestinal and total nutrient digestibility ($P > 0.05$). The NFC and TDN intake were higher ($P < 0.05$) for diets containing CS. The iNDF intake was higher for diets containing StS ($P < 0.05$). There was a tendency ($P < 0.10$) of higher intake of DM, CP, OM and NDF for diets containing CS. There was a concentrate effect on the nitrogen intake, and the diets containing C2 provided the highest value ($P = 0.03$). The nitrogen balance was higher for the CS-based diet ($P = 0.047$). There was a tendency ($P < 0.10$) of greater microbial protein synthesis for the CS-based diet and a $S \times C$ interaction for microbial efficiency, with higher value for the CS with the C2. In the second experiment, the C2 showed the highest values for DM, OM, CP and NDF intakes ($P < 0.05$). The iNDF and EE intakes were higher ($P < 0.05$) for the StS-based diet, while diets containing CS showed higher ($P < 0.05$) NFC intake and a tendency ($P < 0.06$) of higher NDF intake. The total apparent digestibility of the nutrients was not affected ($P > 0.05$) by diets. The ADG and CADG were higher ($P < 0.05$) for the diets containing the C2, with averages of 1.3 kg and 0.81 kg, respectively. The dressing was not affected ($P > 0.05$) by diets. The CS-based diet tended ($P = 0.07$) to improve feed efficiency. Thus, it is concluded that StS-based diet does not alter the ADG and CADG of beef cattle in the finishing phase, being able to replace corn silage diets without altering the ammonia and ruminal pH. However, the concentrate source must be handled in a way that does not affect production parameters.

INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, mais de 94% do rebanho bovino são destinados à produção de carne, e a intensificação tem como objetivo reduzir o tempo de abate bem como as áreas destinadas à pastagem, colaborando também para a redução na emissão de gases do efeito estufa (Berndt e Tomkins, 2013).

Os alimentos conservados na forma de silagem constituem uma das principais fontes de volumosos para animais em confinamento, proporcionando alimentos de bom valor nutricional e possibilitando o aproveitamento do excedente de forragem produzida no verão. A silagem é o produto da fermentação de forragens úmidas, sob condições anaeróbicas, pelas bactérias do ácido lático, resultando na produção de ácidos orgânicos e redução do pH, que juntos, impedem o crescimento de fungos, leveduras e bactérias capazes de utilizar os carboidratos da biomassa ensilada (Muck e Harrison, 2003).

Muitas plantas perenes e anuais podem ser utilizadas para a produção de silagem, no entanto, no Brasil, o milho é uma das culturas mais relevantes devido a sua alta produtividade, facilidade de cultivo e por possuir características adequadas ao processo de fermentação no silo. Embora tais características sejam primordiais para a produção de silagem, o milho possui baixo teor de proteína, limitando sua utilização de forma exclusiva para animais de alta produção.

O avanço nas tecnologias de produção de silagem, tornou possível a ensilagem de uma ampla variedade de forrageiras não convencionais, como as leguminosas (Keady et al., 2012). As leguminosas constituem uma alternativa para aumentar o teor de proteína e o suprimento de cálcio e fósforo da dieta (Pereira et al., 2008). Além disso, são importantes fixadoras de nitrogênio atmosférico, e, em rotação de culturas, podem contribuir para aumentar a disponibilidade de nutrientes no solo. Ainda, quando inseridas no sistema de produção de ruminantes, podem possibilitar a redução nos custos com adubação nitrogenada e servir de suplemento proteico aos animais na forma de forragem conservada (Keplin, 2004).

O aumento do sequestro de carbono e a redução das emissões de N_2O , devido a diminuição da utilização de fertilizantes nitrogenados sintéticos, são altamente recomendados como estratégias para reduzir as emissões de gases do efeito estufa pelos solos agrícolas (Smith et al., 2008), e dessa forma, a leguminosa é uma alternativa importante para manter o equilíbrio na pecuária. Segundo o IPCC (2007), sistemas que

contribuem para a redução de gases do efeito estufa são considerados importantes mitigadores.

No entanto, quando se refere à produção de silagem, as leguminosas apresentam alguns entraves ao processo de fermentação, como a baixa concentração de carboidratos solúveis em água e elevada capacidade tampão após a colheita, o que torna seu processo de fermentação mais complicado quando comparado às gramíneas (McDonald et al., 1991), e por consequência, resulta em silagens com elevado pH e nitrogênio amoniacal (Liu et al., 2012). Essas particularidades tornaram a ensilagem de leguminosas um paradigma, que tem sido quebrado devido aos resultados satisfatórios encontrados no desempenho animal e na qualidade da silagem produzida (Da Silva et al., 2016; Rigueira et al., 2017; Da Silva et al., 2018).

A Alfafa (*Medicago sativa*) é uma leguminosa com destaque mundial devido a sua alta qualidade e ampla adaptação às diferentes regiões edafoclimáticas. Embora capaz de se desenvolver bem em diferentes condições ambientais, sua utilização no Brasil ainda é tímida e os estudos são escassos. Assim como as demais leguminosas, é uma planta com importante papel na conservação do solo e na fixação simbiótica de nitrogênio atmosférico, onde a fixação de N pode variar de 50 a 463 kg/ha/ano (Vance et al., 1988).

Além do elevado teor de proteína, a alfafa é rica em vitaminas A, E e K e minerais como o cálcio, potássio, magnésio e fósforo (Rassini et al., 2008). No Brasil, é principalmente utilizada na forma de feno, sendo a conservação na forma de silagem praticamente inexistente. Entretanto, a secagem das forrageiras para a produção de feno em condições tropicais é limitada pela alta umidade e frequência de chuvas no verão, portanto, a ensilagem poderia representar uma opção promissora.

Os estudos com silagem de alfafa são bem difundidos no exterior (Broderick, 2018; Ke et al., 2017; Kung Jr. et al., 2003), porém, em condições tropicais, ainda são pouco explorados e antigos (Rangrab et al., 2000; Ruggieri et al., 2001). Em razão disso, faz-se necessário entender como e qual o resultado da produção de silagem de alfafa em nossas condições, incluindo novas avaliações, como as de microbiologia.

O *Stylosanthes* cv. Campo Grande é uma leguminosa tropical com elevado potencial de produção de matéria seca e boa resistência a antracnose (Noble et al., 2000; Phaikaew e Hare, 2005). Estudos conduzidos no Brasil com silagem de *Stylosanthes* cv. Campo Grande proporcionaram aumento no consumo de matéria seca e desempenho similar ao obtido com a silagem de milho em animais alimentados com dietas contendo

relação forragem:concentrado de 50:50 (Souza et al., 2014 e Da Silva et al., 2016). Por outro lado, os resultados com relação a sua digestibilidade ainda são inconsistentes (Souza et al., 2014; Da Silva et al., 2015; Da Silva et al., 2016; Da Silva et al., 2017).

Diante da pequena amplitude dos trabalhos com silagem de leguminosas em condições tropicais, faz-se necessário estudos com relação ao perfil de fermentação das silagens e sua utilização na nutrição animal. Dessa forma objetivou-se com esse estudo:

- Avaliar a utilização de bactérias lácticas com potencial antimicrobiano isoladas de silagem de alfafa em condições tropicais sobre o perfil fermentativo, composição química e populações microbianas de silagens de alfafa.

- Avaliar as digestibilidades aparente total e parcial, a eficiência de utilização do nitrogênio, os parâmetros ruminais, bem como o consumo e o desempenho de bovinos de corte alimentados com silagens de *Stylosanthes* cv. Campo Grande ou milho e com ou sem concentrado proteico.

Os capítulos I e II foram escritos de acordo com as normas das revistas Journal of Dairy Science e Animal Feed Science and Technology, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- Berndt, A., Tomkins, N. W. 2013. Measurement and mitigation of methane emissions from beef cattle in tropical grazing system: a perspective from Australia and Brazil. *Animal*. v. 7. p. 363–372.
- Broderick, G. A. 2018. Utilization of protein in red clover and alfalfa silages by lactating dairy cows and growing lambs. *Journal of Dairy Science*. 101, 1190-1205.
- Da Silva, T. C., Pereira, O. G., Agarussi, M. C. N., Silva, V. P., Da Silva, L. D., Cardoso, L. L., Ribeiro, K. G., Valadares Filho, S. C. 2015. *Stylosanthes* cv. Campo Grande silage with or without concentrates in sheep diets: Nutritional value and ruminal fermentation. *Small Ruminant Research*. 126, 34-39.
- Da Silva, L. D., Pereira, O. G., Da Silva, T. C., Valadares Filho, S. C., Ribeiro, K. G. 2016. Effects of silage crop and dietary crude protein levels on digestibility, ruminal fermentation, nitrogen use efficiency, and performance of finishing beef cattle. *Animal Feed Science and Technology*. 220, 22-33.
- Da Silva, T. C., Pereira, O. G., Martins, R. M., Agarussi, M. C. N., Da Silva, L. D., Rufino, L. D., Valadares Filho, S. C., Ribeiro, K. G. 2017. *Stylosanthes* cv. Campo Grande silage and concentrate levels in diets for beef cattle. *Animal Production Science*. 58 (3), 539-545.
- Da Silva, J. S., Ribeiro, K. G., Pereira, O. G., Mantovani, H. C., Cecon, P. R., Pereira, R. C., Silva, J. L. 2018. Nutritive value and fermentation quality of palisadegrass and stylo mixed silages. *Anim Sci J*. 89 (1), 72-78.
- IPCC, 2007. *Climate change 2007: The physical science basis, Working Group I 691 Contribution to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on 692 Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New 693 York, NY, USA. 2007.
- Ke, W. C., Ding, W. R., Xu, D. M., Ding, L. M., Zhang, P., Li, F. D., Guo, X. S. 2017. Effects of addition of malic or citric acids on fermentation quality and chemical characteristics of alfalfa silage. *Journal of Dairy science*. 100, 8958-8966.

- Keady, T.W.J., Marley, C.M., Scollan, N.D. 2012. Grass and alternative forage silages for beef cattle and sheep: effects on animal performance. In: XVI International Silage Conference; Proceeding... Hämeenlinna, Finland.
- Keplin, L. A. S. Silagem de soja: uma opção para ser usada na nutrição animal. 2004. In: Simpósio sobre produção e utilização de forragens conservadas. Maringá-PR. Anais... p. 161-171.
- Kung Jr, L., Taylor, C. C., Lynch, M. P., Neylon, J. M. 2003. The Effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. Journal of Dairy science. 86, 336-343.
- Liu, Q.; Chen, M.; Zhang, J.; Shi, S.; Cai, Y. 2012. Characteristics of isolated lactic acid bacteria and their effectiveness to improve stylo (*Stylosanthes guianensis* Sw.) silage quality at various temperatures. Animal Science Journal. v. 83, p. 128 – 135.
- McDonald, P., Henderson, A. R., Heron, S. J. E. 1991. The Biochemistry of Silage. Second ed. Chalcombe Publications, Marlow, Buckinghamshire, UK. p. 109.
- Muck, R. E., Harrison. J. Silage science and technology. Madison, Wisconsin, USA: American Society of Agronomy, 2003.
- Noble, A. D., Orr, D. M., Middleton, C. H., Rogers, L. G. 2000. Legumes in native pasture - asset or liability? A case history with stylo. Tropical Grasslands. v. 34. p. 199–206.
- Pereira, O. G., Oliveira, A. S., Ribeiro, K. G., Rigueira, J. P. S., Melo Filho, O. L., Souza, W. F. 2008. Otimização de dietas à base de soja. In: VI Simcorte – VI Simpósio de Produção de Gado de Corte e II Simpósio Internacional de Gado de Corte. Viçosa. Anais... p. 213-244.
- Phaikaew, C., Hare, M. D. 2005. Stylo adoption in Thailand: three decades of progress. Tropical Grasslands. v. 39. p. 216.
- Rangrab, L. H., Mühlbach, P. R. F., Berto, J. L. 2000. Silagem de alfafa colhida no início do florescimento e submetida ao emurchecimento e à ação de aditivos biológicos. Revista Brasileira de Zootecnia. 29 (2), 349-356. 2000.

- Rassini, J. B., Ferreira, R. P., Camargo, A. C. Cultivo e estabelecimento da alfafa. 2008. In: Ferreira, R. P.; Rassini, J. B.; Rodrigues, A. A.; Freitas, A. R.; Camargo, A. C.; Mendonça, F. C. (Ed.). Cultivo e utilização da alfafa nos trópicos. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste. p. 3979.
- Rigueira, J. P. S., Pereira, O. G. Ribeiro, K. G., Valadares Filho, S. C., Cezário, A. S., Silva, V. P., Agarussi, M. C. N. 2017. Silage of Marandu Grass with Levels of Stylo Legume Treated or Not with Microbial Inoculant. *J Agri Sci.* 9 (9) 241.
- Ruggieri A. C., Tonani F. L., Andrade P., Silveira. A. C. 2001. Efeito do emurchecimento e da adição de fubá na degradabilidade in situ da silagem de alfafa (*Medicago sativa* L.). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.* 53 (1), 94-99.
- Smith, P., Martino, D., Cai, Z., Gwary, D., Janzen, H., Kumar, P., McCarl, B., Ogle, S., O'Mara, F., Rice, C., Scholes, B., Sirotenko, O., Howden, M., McAllister, T., Pan, G., Romanenkov, V., Schneider, U., Towprayoon, S., Wattenbach, M., Smith, J., 2008. Greenhouse gas mitigation in agriculture. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 363, 789-813.
- Souza, W. F., Pereira, O. G., K. Ribeiro, K.G., Santos, S. A., Valadares Filho, S. C. 2014. Intake, digestibility, nitrogen efficiency, and animal performance of growing and Stylosantes + Stylosantes capitata finishing beef cattle fed warm-season legume (Stylosantes + Stylosantes capitata) silage replacing corn silage macrocephala. *J Anim Sci.* 92 (9), 4099-4107.
- Vance, C. P., Heichel, G. H., Phillips, D. A. 1988. Nodulation and symbiotic dinitrogen fixation. In: Hanson, A. A., Barnes, D. K.; Hill, R. R. Alfalfa and alfalfa improvement. Madison: Society of Agronomy. 229-257.

Capítulo I

Efeito da adição de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* e *Pediococcus acidilacti* isolados de silagem de alfafa sobre o perfil fermentativo e composição química de silagens de alfafa

Resumo: Avaliaram-se o perfil fermentativo, a composição química e as populações microbianas de silagens de alfafa tratadas com inoculantes microbianos (I) em dois cortes (C). Foi utilizado um esquema fatorial 4×2 (quatro inoculantes e dois cortes), em um delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os inoculantes avaliados foram: 1. Sem inoculante (Controle); 2. *Lactobacillus plantarum* (AV 14.17); 3. Mistura de *L. plantarum*, *L. brevis* e *P. acidilactici* (Combo); e 4. Inoculante comercial (IC). Todos os inoculantes foram aplicados na taxa de 10^6 UFC/g MN de forragem. Os inoculantes usados nos tratamentos 2 e 3 foram selecionados de estudo prévio com silagens de alfafa. Os cortes foram realizados em janeiro (corte 1) e março (corte 2) de 2016. Foram usados os mesmos inoculantes e procedimentos para ensilagem em ambos os cortes. O menor pH foi encontrado para as silagens tratadas com a cepa AV 14.17, enquanto o teor de nitrogênio amoniacal foi maior para a silagem controle no corte 2. O pH e a concentração de nitrogênio amoniacal foram menores nas silagens do corte 2, com médias de 4,34 e 59,86 g/kg N total, respectivamente. No corte 2 a silagem tratada com a cepa AV 14.17 apresentou maior teor de carboidratos solúveis residual. Foi observada maior recuperação de matéria seca na silagem controle no corte 1 em relação ao corte 2 (974,4 vs. 950,4 g/kg MS). Na avaliação da composição química, o teor de matéria seca foi maior para as silagens tratadas com os inoculantes microbianos em relação à silagem controle e o teor de proteína bruta apenas diferiu entre os cortes, com maiores valores para o corte 2. Houve efeito de interação $I \times C$ sobre os teores de FDN e FDA. Silagens produzidas no corte 1 apresentaram menores valores de FDN e FDA quando tratadas com o inoculante comercial e o combo, respectivamente. O teor de NIDA não diferiu entre as silagens. Foi observado maior teor de ácido lático e menor teor de ácido acético nas silagens produzidas no corte 2. Houve efeito de interação $I \times C$ sobre a relação ácido lático: ácido acético, sendo registrado maior valor na silagem tratada com a cepa AV 14.17 no corte 2. Houve efeito de interação $I \times C$ na população de leveduras, com menor contagem para o inoculante comercial no corte 2. As contagens de bactérias lácticas foram maiores e de fungos

menores no corte 1. A cepa AV 14.17 reduz o pH e o teor de nitrogênio amoniacal e aumenta a relação ácido lático: ácido acético em silagens de alfafa produzidas em condições tropicais, apresentando potencial de uso como inoculante.

Effect of the use of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* and *Pediococcus acidilacti* isolated from alfalfa silage on the fermentation profile, chemical composition and microbial population of alfalfa silages

Abstract: It was evaluated the changes on the fermentation profile, chemical composition and microbial populations of alfalfa silages treated with microbial inoculants (I) in two cuts (C). The experiment was conducted according to the completely randomized design in a 4×2 factorial scheme (four microbial inoculants and two cuts), with four replicates. The inoculants evaluated were: 1. No inoculant (Control); 2. *Lactobacillus plantarum* (AV 14.17); 3. Mixture of *L. plantarum*, *L. brevis* and *P. acidilactici* (Combo); and 4. Commercial inoculant (CI). All inoculants were applied at the rate of 10^6 CFU/g fresh matter. The inoculants used in the treatments 2 and 3 were selected from a previous study with alfalfa silages. The cuts were performed in January (cut 1) and March (cut 2), 2016. The same inoculants and procedures were used for ensiling in both cuts. The silages treated with the strain AV 14.17 showed the lowest pH while ammonia nitrogen content was higher for the control silage in the cut 2. The pH and ammonia nitrogen concentration were lower in the silages produced in the cut 2, with averages of 4.34 and 59.86 g/kg total N, respectively. In the second cut, the strain AV 14.17 resulted in higher concentration of residual water-soluble carbohydrates in the silage. The dry matter recovery was higher in the control silage in the cut 1 compared to the cut 2 (974.4 vs. 950.4 g/kg DM). In the chemical composition evaluation, the dry matter content was higher for the silages treated with microbial inoculants compared to the control silage and the crude protein content was different only between cuts, where the cut 2 showed the highest value. The NDF and ADF contents were affected by the $I \times C$ interaction. The silages produced in the cut 1 showed lower values of NDF and ADF when treated with the commercial inoculant and the combo, respectively. The ADIN content did not differ between silages. It was observed higher lactic acid content and lower acetic acid content in the silages produced in the cut 2. There was an $I \times C$ interaction effect for the lactic acid to acetic acid ratio, with the highest value found for the silage treated with the strain AV 14.17 in the cut 2. There was an $I \times C$ interaction effect on the yeast population with the lower number for the commercial inoculant in the cut 2. The lactic acid bacteria number was higher and the mold number was lower for the silages in the cut 1. The strain AV 14.17 reduce the

pH and ammonia nitrogen content and increase the lactic acid to acetic acid ratio in alfalfa silages produced in tropical regions, presenting potential of use as inoculant.

1. INTRODUÇÃO

O processo de ensilagem envolve a colheita e o armazenamento de forragens úmidas, em condições de anaerobiose, resultando em um material fermentado. Os compostos resultantes do metabolismo das bactérias láticas pela fermentação dos açúcares, em conjunto com o ambiente anaeróbio, são responsáveis por controlar a atividade microbiana que ocorre durante o armazenamento (Muck, 2010). No entanto, o sucesso da fermentação depende do múltiplo e complexo perfil de microrganismos presentes, bem como da disponibilidade de substratos adequados.

A utilização de forragens de maior qualidade, em termos de proteína bruta, pode ser uma alternativa para reduzir os custos com alimentos concentrados tradicionais (ex: farelo de soja). Dessa forma, a utilização de silagem de leguminosas pode ser estratégia competitiva para tornar os sistemas produtivos mais eficientes, sustentáveis e economicamente viáveis.

A alfafa (*Medicago sativa*) é uma leguminosa perene, amplamente distribuída e utilizada no mundo, que destaca-se pelo seu alto valor nutricional. Entretanto, é uma forrageira com baixo teor de carboidratos solúveis em água, alta capacidade tampão e suas propriedades físicas dificultam o estabelecimento da condição de anaerobiose durante o processo de ensilagem (Schmidt et al., 2009; Muck 2012). O baixo teor de matéria seca, é outro fator limitante na produção de silagem de alfafa, que é susceptível a fermentações clostrídicas quando ensilada com umidade $\geq 70\%$ (Muck e Kung, 2007). Fermentações secundárias, como as resultantes do metabolismo de clostrídeos, são indesejáveis por gerar grandes perdas de matéria seca e baixa recuperação de energia (Kung Jr., et al 2018).

A utilização de aditivos químicos ou microbianos tem sido empregada com a finalidade de favorecer a fermentação homolática e reduzir fermentações indesejáveis provocadas por microrganismos deterioradores, que levam a maiores perdas de matéria seca. Os inoculantes microbianos são compostos por espécies de bactérias láticas heterofermentativas facultativas ou obrigatórias, ou suas combinações. As espécies heterofermentativas facultativas mais conhecidas são o *L. plantarum*, *Pediococcus* sp., *E. faecium* e *L. casei*, enquanto as heterofermentativas obrigatórias são o *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. diolivorans*, *L. hilgardii*, *L. kefir* e *L. parafarraginis* (Muck et al., 2017).

As bactérias heterofermentativas obrigatórias agem na fase final da fermentação, aumentando o pH e melhorando a estabilidade aeróbia (Muck et al., 2017). Ao

contrário, as bactérias heterofermentativas facultativas agem nas fases iniciais e aceleram o processo de fermentação, e então, a fase de estabilidade das silagens é atingida mais cedo devido a rápida queda no pH.

As bactérias lácticas adicionadas na ensilagem de alfafa têm proporcionado reduções no pH, nitrogênio amoniacal e ácido butírico das silagens, assim como aumento nos teores de ácido láctico (Jatkauskas et al., 2015; Liu et al., 2016; Silva et al., 2016; Oliveira et al., 2017), evidenciando a melhoria na sua qualidade.

O êxito na utilização de inoculantes está na capacidade das bactérias inoculadas em superar os microrganismos epifíticos, na presença de substrato adequado e na taxa de inoculação adequada (Muck, 1988). A escolha do inoculante, de acordo com a composição de bactérias nele presentes, vai depender do tipo de forragem e dos objetivos almejados (acelerar a fermentação ou evitar perdas de matéria seca). Segundo Oliveira et al. (2017), o tipo de forragem é o fator que mais afeta o efeito da inoculação com bactérias lácticas na qualidade da silagem.

O ácido láctico é o composto produzido em maior quantidade molar pela fermentação realizada pelas bactérias lácticas, sendo o principal responsável pela redução no pH. Esse ácido permite que o pH alcance valores entre 4; 5 e abaixo de 4 em silagens de gramíneas, alfafa e milho, respectivamente (Muck, 2010). O baixo pH, juntamente com a ação antimicrobiana dos ácidos orgânicos são responsáveis pela inibição de bactérias indesejáveis, mofo e leveduras (Scudamore e Livesey, 1998). Outros produtos do metabolismo das bactérias lácticas também estão associados com o controle de microrganismos deterioradores tais como o etanol, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, ácidos graxos e as bacteriocinas (Reis et al., 2012).

A disponibilidade dos inoculantes microbianos desenvolvidos para aplicação em forrageiras de clima tropical ainda é limitada. A maioria, se não todos os inoculantes comerciais constituem-se de bactérias lácticas isoladas de forrageiras de clima temperado (Heinritz et al., 2012). Os estudos conduzidos no Brasil, baseados em isolar e testar bactérias lácticas em nossas condições são escassos e a maioria dos trabalhos avaliaram produtos comerciais no perfil fermentativo e desempenho animal (Rangrab et al., 2000; Magalhães et al., 2003; Manginelli et al., 2005).

O desenvolvimento de inoculantes específicos para cada espécie e região (tropical ou temperada) poderia reduzir a variabilidade nas respostas encontradas com o uso de inoculantes microbianos. Além disso, a utilização de estirpes eficientes na produção de compostos antimicrobianos, selecionadas com base na sua capacidade em

tolerar condições desfavoráveis ao crescimento microbiano (temperatura, pH, estresse osmótico), nas quais o ambiente está susceptível, podem favorecer essas espécies em relação aos demais microrganismos presentes nesse mesmo nicho. Desta forma, nós hipotetizamos que a utilização de bactérias lácticas isoladas de silagem de alfafa melhora o perfil fermentativo de silagens desta cultura em condições tropicais. Portanto, objetivou-se com este estudo avaliar o efeito da adição de *Lactobacillus plantarum* ou uma mistura composta de *L. plantarum*, *L. brevis* e *P. acidilactici* sobre a composição química, perfil fermentativo e quantificação das populações microbianas de silagens de alfafa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área experimental e condições climáticas

O experimento foi conduzido nos laboratórios de Forragicultura e de Microbiologia da Silagem do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, localizada no município de Viçosa, Minas Gerais. A cidade de Viçosa está situada a 20° e 45' de latitude sul, 42° e 51' de longitude oeste e 657 metros de altitude, com precipitação média anual de 1341 mm.

2.2. Preparo do inoculante microbiano

2.2.1. Isolados de silagem de alfafa

As culturas de bactérias lácticas isoladas de silagem de alfafa (*L. plantarum* AV 14.17, *L. brevis* AV 14.2 e *P. acidilactici* AV. 56.13) utilizados nesse estudo, pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia da Silagem do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. As cepas foram selecionadas com base em resultados prévios, onde estas apresentaram inibição contra cinco diferentes microrganismos indicadores (*Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* K12, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* ATCC 4904 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923). Além disso, as cepas apresentaram crescimento em diversas condições ambientais (pH, temperatura, concentrações de sal) (Silva et al., 2015).

As cepas, estocadas a -80 °C, foram cultivadas em caldo MRS e incubadas a 37 °C por 48 horas. As culturas ativas foram submetidas à centrifugação (1000 g, 10 minutos, 4 °C), e, imediatamente, o sobrenadante foi eliminado e o sedimento de células

obtido foi ressuspenso em 50 mL de água destilada. Na inoculação da forragem, foi utilizada a cepa 14.17 e a mistura das cepas, *L. plantarum* AV 14.17, *L. brevis* AV 14.2 e *P. acidilactici* AV. 56.13 (combo).

2.2.2. Inoculante comercial

O inoculante comercial Sil-All® 4x4 W.S. (Alltech, Brasil) foi utilizado neste estudo. O inoculante é composto por *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus salivarius* subesp. *Salivarius*, dióxido de silício, sacarose, amilase, celulase, enzima hemicelulolítica e xilanase. Foi utilizado 50 mL de água destilada para a reidratação do inoculante. A mesma quantidade de água foi aplicada ao tratamento controle (sem inoculante).

O inoculante comercial e a população microbiana das cepas microbianas foram padronizadas para uma taxa de inoculação de 1×10^6 UFC/g de forragem, com base na matéria natural. A taxa foi ajustada pela determinação prévia da população de bactérias lácticas presentes nos inoculantes, com o uso da contagem de bactérias lácticas epifíticas em MRS ágar.

2.3. Ensilagem e delineamento experimental

A alfafa cv. Crioula foi colhida no setor de Agrostologia do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em uma área de 1000 m², com cinco anos de plantio. Foram realizados dois cortes, um em janeiro (corte 1) e o outro em março (corte 2) de 2016. Após os cortes, a alfafa foi emurhecida por seis horas no campo e, em seguida, foi picada em máquina forrageira estacionária (modelo PN Plus 2000, Nogueira S.A., São João da Boa Vista, Brasil) em partículas de 1,5 cm. Após a picagem, a forragem de ambos os cortes foi tratada com inoculantes microbianos.

Foi usado um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4×2 (quatro inoculantes e dois cortes) com quatro repetições. Os inoculantes microbianos avaliados foram: 1. Sem inoculante (Controle); 2. *Lactobacillus plantarum* (AV 14.17); 3. *Lactobacillus plantarum* (AV 14.17) + *Lactobacillus brevis* (AV 14.2) + *Pediococcus acidilactici* (AV 56.13) (Combo); e 4. Inoculante comercial (Sil-All® 4x4 W.S., Alltech, Brasil) (IC).

Após a aplicação dos inoculantes, foram ensilados aproximadamente sete kg de forragem em baldes plásticos de 10 L de capacidade, selados com tampas de pressão. Os silos experimentais foram mantidos em galpão e abertos 90 dias após a ensilagem.

2.4. Composição química

Amostras da planta e das silagens foram coletadas e submetidas a secagem em estufa de ventilação forçada de ar a 55°C por 72 horas, e, em seguida, foram moídas em moinho tipo “Willey” com peneira de 1mm. As amostras moídas foram utilizadas para a determinação dos teores de matéria seca (método 934,01), proteína bruta (método 984,13), FDA (método 973,18) e matéria mineral (método 942,05), como descrito pela AOAC (1990). As concentrações de fibra em detergente neutro (FDN) foram determinadas com a adição de α – amilase termoestável, sem a utilização de sulfito de sódio. Os resíduos da análise de FDN e FDA foram submetidos à análise de cinzas (Mertens, 2002) e compostos nitrogenados (Licitra et al., 1996) para a obtenção dos valores corrigidos.

2.5. Perfil fermentativo e recuperação de matéria seca

2.5.1. pH, ácidos orgânicos, nitrogênio amoniacal e carboidratos solúveis em água

Um extrato aquoso foi obtido a partir de 25 g da amostra de forragem ou silagem homogeneizados em 225 mL de solução estéril (Ring Solution®, Oxoid, England, Hampshire) por 1 minuto em liquidificador industrial. Em seguida, o pH foi mensurado com o uso de um potenciômetro digital (Tecnal, SP, Brasil), e, logo após, o extrato foi filtrado em papel filtro Whatman 54 (Whatman, Florham, NJ) e acidificado com solução de ácido sulfúrico 1:1 para determinação das concentrações de ácidos orgânicos, nitrogênio amoniacal e carboidratos solúveis em água.

As amostras para a quantificação dos teores de ácidos orgânicos foram tratadas com hidróxido de cálcio e sulfato cúprico e analisadas em HPLC de acordo com Siegfried et al. (1984). O aparelho de HPLC (SPD-10 AVP, Shimadzu) foi equipado com um detector de índice de refração e foi utilizada uma coluna Aminex HPX-87H (BIO-RAD, CA, EUA) com a fase móvel contendo H₂SO₄ 0,005 M e uma vazão de 0,6 mL/min a 50°C.

A quantificação da concentração de nitrogênio amoniacal nas silagens foi realizada pelo método do fenol-hipoclorito (Weatherburn et al., 1967), sendo obtida por colorimetria (Chaney e Marbach, 1962).

A análise para a determinação da concentração de carboidratos solúveis em água das plantas e das silagens foi realizada de acordo com Nelson et al. (1944).

2.5.2. Recuperação de matéria seca

Para a estimativa da recuperação de matéria seca, os baldes foram pesados após o fechamento no dia da ensilagem e no momento da abertura conforme Jobim et al. (2007) usando a equação: $RMS = MS_{ab}/MS_{fe} \times 100$, onde: RMS = Recuperação de matéria seca (%); MS_{ab} = Matéria seca da silagem na abertura (quantidade de silagem em kg \times % MS); MS_{fe} = Matéria seca da forragem no fechamento (quantidade de forragem em kg \times % MS).

2.6. Quantificação das populações microbianas

Amostras de 25 g de forragem ou silagem foram homogeneizadas em 225 mL de solução Ringer solution e, em seguida, foram realizadas diluições seriadas. As diluições seriadas foram plaqueadas pela técnica *Pour plate* em placas contendo MRS ágar (Difco™ Lactobacilli MRS Agar®), VRB ágar (Violet Red Bile Ágar®) e BDA (Batata Dextrose Ágar® com 1,5% de ácido tartárico 10% (pH3,5%)) para as quantificações de bactérias do ácido láctico (BAL), enterobactérias (ENT) e mofos e leveduras, respectivamente.

Para o crescimento de bactérias lácticas e enterobactérias, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e para mofos e leveduras a 25°C por 5 dias. Foram consideradas passíveis de contagem as placas com valores entre 30 e 300 unidades formadoras de colônias (UFC).

2.7. Análises estatísticas

Os dados foram analisados de acordo com o delineamento inteiramente casualizado em um fatorial 4 \times 2, por intermédio do procedimento GLM do SAS 9.3 (SAS System Inc., Cary, NC, USA). Os inoculantes, os cortes e a interação entre os fatores, foram considerados efeitos fixos no modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + I_i + C_j + (I \times C)_{ij} + e_{ijk}$$

Onde, Y_{ijk} = variável dependente; μ = média geral; I_i = efeito de inoculante; C_j = efeito de corte; $(I \times C)_{ij}$ = interação entre os fatores; e_{ijk} = erro aleatório, assumindo uma distribuição normal independente (NID), $(0; \sigma^2 \epsilon)$.

A homogeneidade das variâncias entre os tratamentos foi assumida e as variáveis referentes ao perfil fermentativo e a composição química foram submetidos à análise de variância e à comparação múltipla de médias pelo teste Tukey, sendo considerado 0,05 como nível crítico para ocorrência do erro tipo I e 0,10 para tendência.

As variáveis referentes à quantificação microbiana foram transformadas para a base logarítmica (Log_{10} UFC) para verificação da adequação à distribuição normal. Em seguida, foram submetidas aos mesmos procedimentos descritos para as demais variáveis.

3. RESULTADOS

3.1. *Planta antes da ensilagem*

A composição química (g/kg MS) e as populações de bactérias lácticas, enterobactérias, mofos e leveduras da alfafa antes da ensilagem nos dois cortes estão apresentadas na Tabela 1. O teor de MS e carboidratos solúveis em água foram maiores para a alfafa no corte 2. O teor de FDN e a população de enterobactérias foram maiores para a alfafa no corte 1.

Tabela 1- Composição química e população microbiana da alfafa antes da ensilagem.

Item ^a	Corte ^b	
	1	2
MS, g/kg	331,4	435,2
PB	146,7	149,5
FDN	532,3	458,6
FDA	348,1	355,6
MM	147	144,4
CHOs solúveis	17,3	34
Populações microbianas, log UFC/g		
BAL	6,72	6,14
ENT	7,15	6,42
Mofos	4,58	4,90
Leveduras	5,21	5,03
pH	6,12	6,24

^aMS = Matéria seca; PB = Proteína bruta; FDN = Fibra insolúvel em detergente neutro; FDA = Fibra insolúvel em detergente ácido; MM = Matéria mineral; CHOs solúveis = Carboidratos solúveis; BAL = Bactéria do ácido láctico; ENT = Enterobactérias.

^bCorte 1: realizado em janeiro de 2016; Corte 2: realizado em março de 2016.

3.2. Composição química das silagens

Os teores de matéria seca das silagens foram afetados ($P < 0,05$) pelos inoculantes e pelos cortes. As silagens tratadas com os inoculantes apresentaram maior teor de matéria seca em relação à controle ($P < 0,001$), assim como as silagens do corte 2 em relação ao 1 ($P < 0,001$). A proteína bruta foi afetada pelos cortes, com os maiores teores encontrados nas silagens produzidas no corte 2 ($P = 0,003$).

Houve efeito da interação $I \times C$ sobre os teores de FDN e FDA ($P < 0,05$). O menor teor de FDN foi encontrado na silagem tratada com o inoculante comercial no corte 1 ($P < 0,05$), sendo que, as silagens resultantes desse corte, apresentaram maiores teores em relação ao corte 2 ($P < 0,05$). No corte 2, não houve efeito ($P > 0,05$) de inoculantes sobre os teores de FDN das silagens. Comportamento similar foi observado para o teor de FDA, que não apresentou diferença entre os inoculantes no corte 2 ($P > 0,05$). No entanto, no corte 1, a silagem tratada com o combo de bactérias lácticas apresentou menor ($P < 0,05$) teor de FDA. Houve diferença ($P < 0,001$) entre os cortes, com os maiores valores de FDA observados para o corte 1, com exceção das silagens tratadas com o combo, que apresentou valor similar ($P > 0,05$) em ambos os cortes.

A matéria mineral diferiu entre os inoculantes ($P < 0,05$) e não foi influenciada pelos cortes ($P > 0,05$). O maior teor de matéria mineral foi encontrado com a utilização do inoculante comercial ($P = 0,01$).

Houve tendência de interação $I \times C$ ($P > 0,09$) para os teores de NIDA, no entanto, ao desdobrar esse efeito, não foi encontrada diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Composição química de silagens de alfafa tratadas com inoculantes microbianos.

Corte ^a	Inoculante ^b				Média	EPM ^c	P-valor ^d		
	Controle	AV 14.17	Combo	IC			I	C	I×C
	MS, g/kg					0,84	<0,001	<0,001	0,41
1	324,7	328,9	328,1	331,3	328,1 B				
2	417	422,9	423,4	424,8	422,0 A				
Média	370,9 b	375,9 a	375,8 a	378,1 a					
	PB					0,07	0,16	0,003	0,92
1	145,0	146,4	148,5	145,5	146,4 B				
2	149,3	150,9	152,6	148,5	150,3 A				
Média	147,15	148,65	150,55	147					
	FDN					0,87	0,004	<0,001	0,03
1	518,9 Aa	515,5 Aa	489,9 Aab	472,8 Ab	499,3				
2	420 Ba	405,2 Ba	408,5 Ba	407,8 Ba	410,4				
Média	469,5	460,4	449,2	440,3					
	FDA					0,65	0,01	<0,001	0,02
1	422,3 Aa	422,4 Aa	368,8 Ab	406,5 Aab	405				
2	343,4 Ba	355,5 Ba	347,2 Aa	343,2 Ba	347,3				
Média	382,9	389	358	374,9					
	MM					0,22	0,01	0,13	0,63
1	146,3	151,9	163,7	169,9	157,95				
2	156,2	164,3	164,5	171	164				
Média	151,25 b	158,1 ab	164,1 ab	170,45 a					
	NIDA, g/kg N total					0,70	0,67	0,70	0,09
1	194,9	148,9	154,1	210	176,98				
2	168,1	174,2	189,4	152,2	170,98				
Média	181,5	161,55	171,75	181,1					

^a Corte 1: Corte realizado em janeiro de 2016; Corte 2: Corte realizado em março de 2016.

^b Controle = Sem inoculante; AV 14.17 = *Lactobacillus plantarum*; Combo = *L. plantarum* + *L. brevis* + *P. acidilactici*; IC = Inoculante comercial.

^c EPM = Erro padrão da média

^d Probabilidade de efeito de inoculantes (I), cortes (C) e de interação de I com C (I × C).

Médias seguidas por letras iguais minúsculas na linha e maiúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade para o erro tipo I.

3.3. Perfil fermentativo

Foi observado efeito ($P < 0,05$) de inoculante e corte sobre o pH (Tabela 3). O menor ($P = 0,04$) pH foi encontrado para as silagens tratadas com a estirpe AV 14.17. Além disso, os valores de pH das silagens do corte 2 foram menores ($P < 0,001$) quando comparadas ao corte 1.

Houve tendência ($P = 0,06$) de interação I × C para o teor de nitrogênio amoniacal. No corte 1, as silagens tratadas com os inoculantes microbianos apresentaram menores concentrações de nitrogênio amoniacal ($P < 0,05$) comparadas a silagem não tratada. No entanto, para o corte 2, essa variável não foi afetada pelos inoculantes ($P > 0,05$). As silagens do corte 1 apresentaram maior concentração de nitrogênio amoniacal ($P < 0,05$) comparadas ao corte 2.

Os teores de ácido lático e ácido acético foram afetados ($P < 0,05$) apenas pelos cortes. As silagens do corte 2 apresentaram maior ($P < 0,001$) teor de ácido lático e menor ($P < 0,001$) teor de ácido acético. Além disso, foi observado efeito de interação $I \times C$ sobre a relação ácido lático: ácido acético ($P < 0,001$), com maior ($P < 0,05$) valor para a estirpe AV 14.17 e para o combo no corte 2. No corte 1, os inoculantes foram similares para essa variável ($P > 0,05$).

Houve efeito da interação $I \times C$ sobre os teores de carboidratos solúveis em água e para a recuperação de matéria seca ($P < 0,05$). No estudo do desdobramento da interação, o teor de carboidratos solúveis foi similar ($P < 0,05$) entre os inoculantes no corte 1. No entanto, o maior valor foi encontrado para a estirpe AV 14.17 no corte 2 ($P < 0,05$). Dentro do mesmo corte, os inoculantes não alteraram a recuperação de matéria seca, porém, a silagem controle do corte 1 apresentou maior recuperação de matéria seca quando comparada a do corte 2 ($P < 0,05$) (Tabela 3).

O maior teor de matéria seca nas silagens tratadas com inoculantes pode estar associado a menores perdas durante o processo de fermentação. Liu et al. (2018) encontraram menor teor e maior perda de matéria seca em silagens de alfafa sem aditivo comparadas as silagens tratadas com inoculantes microbianos ou químicos. No entanto, tal hipótese não se aplica ao nosso estudo, uma vez que a recuperação de matérias seca não foi afetada pelos inoculantes.

O teor médio de proteína bruta das silagens (148,35 g/kg MS) encontrado no nosso trabalho está abaixo dos valores reportados para silagem de alfafa em condições de clima tropical e temperado (~200 g/kg MS) (Silva et al., 2016; Jatkauskas et al., 2015). No entanto, o valor obtido nesse estudo pode ser devido à perda de folhas durante a colheita da planta, uma vez que as folhas apresentam maior teor de proteína bruta em relação ao colmo. A maior concentração de proteína bruta nas silagens produzidas no corte 2, bem como menor pH, nitrogênio amoniacal e ácido acético dessas silagens, demonstra a predominância de fermentação homolática. O baixo pH inativa as enzimas proteolíticas da planta (Kung and Bedrosian, 2010) e inibe microrganismos proteolíticos, portanto a redução nos teores de proteína devido a sua degradação, resultou em aumento no nitrogênio amoniacal nas silagens produzidas no corte 1.

A redução dos teores de FDN das silagens tratadas com inoculante comercial no corte 1 se deve provavelmente à presença de enzimas hemicelulolíticas e celulolíticas neste produto, as quais, atuam na hidrólise da parede celular e, por consequência, reduzem a fração fibrosa. Embora o teor de FDN não tenha sido afetado pelas estirpes, o teor de FDA foi menor nas silagens tratadas com o combo. Esse efeito pode ser resultante da hidrólise ácida da hemicelulose (Mc Donald et al., 1991) causada pelos ácidos orgânicos resultantes da fermentação. No entanto, é importante destacar que os teores de ácido lático e acético não foram afetados pelos inoculantes.

4.2. Perfil fermentativo

O teor de matéria seca da planta antes da ensilagem nos dois cortes avaliados, bem como a população epifítica de bactérias do ácido lático, podem ser considerados adequados para uma boa fermentação. Apesar de relativamente alto, o teor de matéria seca da planta no corte 2 não restringiu a fermentação das silagens, que podem ser consideradas de boa qualidade. Segundo Kung Jr. et al. (2018) teores de matéria seca entre 40-45% levam ao aumento no pH das silagens, no entanto, esse comportamento

não foi observado no nosso trabalho, em que as silagens produzidas no corte 2, com maior teor de matéria seca, apresentaram menor pH.

O corte altera o metabolismo de carboidratos, e dessa forma, estimula a mobilização de monossacarídeos em relação aos polímeros de açúcar e a hidrólise das reservas de amido em açúcares solúveis (Tschaplinski and Blake 1989). Isso pode ter ocorrido na alfafa no corte 2, que foi rebrota do corte 1, e apresentou maior teor de carboidratos solúveis em água.

O baixo teor de carboidratos solúveis na alfafa do primeiro corte 1 pode ter limitado a disponibilidade de substratos em quantidade suficiente para a adequada produção de ácido, e dessa forma, as silagens estabilizaram em pH mais alto. Esse comportamento corrobora com os baixos teores de ácido lático encontrados para essas silagens. Embora o pH final das silagens tenha sido afetado pelos cortes, os valores encontrados para a silagem controle nos dois experimentos foram inferiores aos reportados por Chilson et al. (2016) e Silva et al. (2016), em estudos com silagens de alfafa.

A estirpe de *Lactobacillus plantarum* (AV 14.17) proporcionou melhor fermentação das silagens, devido aos valores mais baixos de pH nos dois cortes, menor concentração de nitrogênio amoniacal e maior concentração de carboidratos solúveis em água residual nas silagens produzidas no corte 2. Vários estudos também reportaram redução do pH em silagens de alfafa tratadas com *Lactobacillus plantarum* (Ely et al., 1981; Kung Jr et al., 1993; Filya et al., 2007; Zhange et al., 2009; Liu et al., 2018).

A maior concentração de carboidratos solúveis residuais pode estar relacionada ao maior controle de bactérias deterioradoras, uma vez que as estirpes utilizadas no nosso estudo apresentam propriedades antimicrobianas, bem como a eficiência da estirpe AV 14.17 na conversão do substrato a ácido lático. Liu et al. (2016) e Ogunade et al. (2016) sugeriram que o controle de bactérias indesejáveis pode ser atribuído a rápida queda do pH, devido a maior produção de ácidos orgânicos. No entanto, Ogunade et al. (2016) também associaram parte desses resultados ao efeito antimicrobiano causado pela presença de bacteriocinas ou outros compostos inibitórios produzidos pelas bactérias do ácido lático.

Os teores de ácido lático e ácido acético foram similares entre os inoculantes, porém a maior relação ácido lático:ácido acético nas silagens tratadas com a estirpe AV 14.17 e com o combo pode ser considerada um indicador de boa fermentação das silagens (Jalč et al., 2009; Contreras-Govea et al., 2013). O maior teor de carboidratos

solúveis em água da alfafa do corte 2 proporcionou maior concentração de ácido láctico nessas silagens, e os valores estão próximos aos reportados por Silva et al. (2016), embora baixos quando comparado aos valores encontrados para silagens de leguminosas (Kung Jr et al., 2018). O alto teor de ácido acético nas silagens do corte 1 demonstra uma fermentação predominantemente acética. Embora esse perfil seja comumente encontrado em silagens com alta umidade (> 70%) (Kung Jr et al., 2018), o maior número de enterobactérias na planta do corte 1 poderia explicar esse resultado.

A utilização do combo de bactérias lácticas também apresentou efeito benéfico na fermentação, com redução no teor de nitrogênio amoniacal. Esse comportamento pode ser resultado do efeito sinérgico dos produtos da fermentação das diferentes cepas, atuando de forma mais acentuada no controle de microrganismos proteolíticos, como por exemplo as enterobactérias e espécies do gênero *Clostridium*. Segundo Xu et al. (2017) para o desenvolvimento de inoculantes microbianos efetivos ambas bactérias homofermentativas e heterofermentativas deveriam ser utilizadas, ajustando-se à taxa de cada microrganismo de acordo com sua produção de ácido láctico e ácido acético de modo a inibir o crescimento de bactérias indesejáveis.

Em geral, silagens com maior teor de umidade apresentam maiores teores de nitrogênio amoniacal (Muck, 1987; Kung Jr et al., 2018), fato este observado para as silagens produzidas no corte 1. Apesar das diferenças observadas para o teor de nitrogênio amoniacal, os valores encontrados para todas as silagens estão dentro da faixa (8-11%) preconizada para uma silagem de boa qualidade (Oshima e McDonald, 1978).

4.3. Populações microbianas

As contagens de bactérias lácticas nas plantas no momento da ensilagem (7,15 e 6,42 log UFC/g) podem ser consideradas relativamente altas, tendo como base os estudos de Schmidt et al. (2009) e Silva et al. (2016), com silagem de alfafa. Segundo Muck (1991) a contagem de 5 log UFC/g de bactérias lácticas seria o mínimo necessário para garantir adequada fermentação das silagens.

A ausência de efeito de inoculantes sobre a população de bactérias lácticas após os 90 dias de ensilagem pode ser em decorrência do baixo pH final das silagens e da ausência de substratos fermentáveis essenciais para o crescimento, que resulta em morte das bactérias (McDonald et al., 1991). Além disso, quando o crescimento é limitado,

independente da forma como isso acontece, a fase exponencial termina e o microrganismo entra na fase estacionária.

O controle de enterobactérias é essencial para a preservação da silagem, uma vez que esses microrganismos competem com as bactérias lácticas pelo mesmo substrato. A ausência de detecção deste grupo microbiano na silagem após 90 dias de fermentação, provavelmente se deve as condições de ambiente desfavoráveis ao seu crescimento devido ao baixo pH. Em silagens de boa qualidade a presença de enterobactérias não foi detectada após 7 dias de ensilagem, momento a partir do qual as bactérias lácticas passaram a ser dominantes (Luis e Ramirez, 1988). Entretanto, Silva et al. (2016) observaram decréscimo na população de enterobactérias em silagens de alfafa até o 14º dia do período de fermentação e aumento levemente pronunciado a partir desse ponto, além de detectar a presença desse microrganismo após 56 dias de ensilagem.

A atividade antimicrobiana dos isolados utilizados nesse estudo não foi caracterizada, e portanto, não se sabe ao certo qual produto está envolvido nesse processo. Por isso, pode-se especular que a ausência de diferença entre os inoculantes com relação ao controle de fungos e leveduras pode estar relacionada à produção de bacteriocinas, que quando produzidas por espécies gram-positivas são pouco efetivas contra microrganismos gram-negativos (Smaoui et al., 2010). Vale ressaltar que as contagens de fungos e leveduras foram baixas nas silagens, como também observado nos trabalhos com silagens de alfafa de Bolsen et al. (1992) e Ding et al. (2013).

5. CONCLUSÃO

A estirpe AV 14.17 (*Lactobacillus plantarum*) apresenta potencial como inoculante em silagem de alfafa por melhorar a qualidade da silagem, favorecendo as reduções do pH e das concentrações de nitrogênio amoniacal e o aumento da relação ácido láctico:ácido acético. Além disso, a mistura de bactérias lácticas apresentou tendência na melhora da fermentação, devido à redução dos teores de nitrogênio amoniacal, sugerindo potencial para avaliações em estudos futuros.

REFERÊNCIAS

- Association of Official Analytical Chemistry (AOAC), 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. AOAC International, Arlington.
- Bolsen, K. K., Brent, B. E., Feyerherm, A. M., Urban, J. E., Aimutis, W. R. 1992. Effect of Silage Additives on the Microbial Succession and Fermentation Process of Alfalfa and Corn Silages. *Journal of Dairy Science*. 75, 3066-3083.
- Chaney, A.L., Marbach, E.P., 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8, 130–132.
- Chilson, J. M., Rezamand, P., Drewnoski, M. E., Price, W., Hunt, C. W. 2016. Effect of homofermentative lactic acid bacteria and exogenous hydrolytic enzymes on the ensiling characteristics and rumen degradability of alfalfa and corn silages. *The Professional Animal Scientist*. 32, 598–604.
- Contreras-Govea, F. E., Muck, R. E., Broderick, G. A., Weimer, P. J. 2013. *Lactobacillus plantarum* effects on silage fermentation and in vitro microbial yield. *Animal Feed Science and Technology*. 179 (2013) 61–68.
- Ding, W. R., Long, R. J., Guo, X. S. 2013. Effects of plant enzyme inactivation or sterilization on lipolysis and proteolysis in alfalfa silage. *J. Dairy Sci.* 96, 2536–2543.
- Ely, L. O., Sudweeks, E. M., Moon, N. J. 1981. Inoculation with *Lactobacillus plantarum* of Alfalfa, Corn, Sorghum, and Wheat Silages. *Journal of Dairy Science*. 64, 2378-2387.
- Filya, I.; Muck, R. E.; Contreras-Govea, F. E. 2007. Inoculant Effects on Alfalfa Silage: Fermentation Products and Nutritive Value. *Journal of Dairy Science*. v. 90, p. 5108-5114.
- Heinritz, S. N., Martens, S. D., Avila, P., Hoedtke, S. 2012. The effect of inoculant and sucrose addition on the silage quality of tropical forage legumes with varying ensilability. *Animal Feed Science and Technology*. 174, 201-210.

- Jalč D., Lauková, A., Simonová, M., Váradyová, Z., Homolka, P. 2009. The use of bacterial inoculants for grass silage: their effects on nutrient composition and fermentation parameters in grass silages. *Czech J Anim Sci.* 54, 84–91.
- Jatkauskas, J., Vrotniakiene, V., Lanckriet, A. 2015. The effect of different types of inoculants on the characteristics of alfalfa, ryegrass and red clover/ryegrass/timothy silage. *Zemdirbyste-Agriculture.* 102 (1), 95-102.
- Jobim, C.C.; Nussio L.G.; Reis, R.A.; Schmidt P. 2007. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, suplemento especial, p.101-119.
- Kung, L. Jr., J. H. Chen, E. M. Kreck, and K. Knutsen. 1993. Effect of microbial inoculants on the nutritive value of corn silage for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76:3763–3770.
- Kung, L., Jr., and M. D. Bedrosian. 2010. How well do we really understand silage fermentation? *Proceedings of the Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers.* Cornell University, Ithaca, NY. p. 87–93.
- Kung Jr, L., Shaver, R. D., Grant, R. J., Schmidt, R. J. 2018. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *J Dairy Sci.* 101, 4020-4033.
- Licitra, G., Hernandez, T. M., Van Soest., P. J., 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology.* 57, 347-358.
- Liu, C., Lai, Y., Lu, X., Guo, P., Luo, H. 2016. Effect of lactic acid bacteria inoculants on alfalfa (*Medicago sativa* L.) silage quality: assessment of degradation (in situ) and gas production (in vitro). *Journal of Integrative Agriculture.* 15 (12), 2834-2841.
- Liu, Q. H., Li, X. Y., Seare., T. D., Zhang, J. G., Shao, T. 2016. Effects of *Lactobacillus plantarum* and fibrolytic enzyme on the fermentation quality and in vitro digestibility of total mixed rations silage including rape straw. *Journal of Integrative Agriculture.* 15 (9), 2087–2096.

- Liu, Q. H., Dong, Z. H., Shao, T. 2018. Effect of additives on fatty acid profile of high moisture alfalfa silage during ensiling and after exposure to air. *Animal Feed Science and Technology*. Acesso online.
- Luiz, L.; Ramirez, M. 1988. Evolución de la flora microbiana en ensilaje de king grass. *Pastos y Forrajes*. 11, 249-253.
- Magalhães, V. J. A., Rodrigues, P. H. M. 2003. Desempenho produtivo de vacas leiteiras alimentadas com silagem pré-seca de alfafa adicionada de inoculante microbiano. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 32 (6), 2016-2022.
- Manginelli, S., Magalhães, V. J. A., Rodrigues, P. H. M. 2005. Inoculação microbiana da alfafa para silagem sobre a digestibilidade total e ruminal em bovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 34 (3), 926 -933.
- McDonald, P., Henderson, A. R., Heron, S. J. E. 1991. *Biochemistry of silage*. 2.ed. Marlow: Chalcombe Publication. p. 340.
- Mertens, D. R., 2002. Gravimetric determination of amylase treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. *Journal of AOAC International*. 85 (6), 1217-1240.
- Muck, R. E. 1987. Dry matter level affects alfalfa silage quality I. Nitrogen transformations. *American Society of Agricultural and Biological Engineers (ASABE)*. 30 (10), 7-14.
- Muck, R. E. 1988. Factors influencing silage quality and their implications for management. *Journal of Dairy Science*. 71, 2992-3002.
- Muck, R. E. Silage fermentation. In: *Mixed cultures in biotechnology*. 1991. New York: McGraw Hill Inc. p.171-204.
- Muck, R. E.; Kung, L. Jr. Silage production. *Forages*. 2007. *The Science of Grassland Agriculture*. 2, 617-633.
- Muck, R. E. 2010. Silage microbiology and its control through additives. *R. Bras. Zootec*. 39, 183-191.

- Muck R. 2012. Microbiology of ensiling. 16th International Silage Conference. Hameenlinna, Finland, p. 75–86.
- Muck, R. E., Nadeau, E. M. G., McAllister, T. A., Contreras-Govea, F. E., Santos, M. C., Kung Jr, L. 2017. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *J Dairy Sci.* 101, 3980-4000.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153, 375-380.
- Ogunade, I. M., Kim, D. H., Jiang, Y., Weinberg, Z. G., Jeong, K. C., Adesogan, A. T. 2016 Control of *Escherichia coli* O157:H7 in contaminated alfalfa silage: Effects of silage additives. *J. Dairy Sci.* 99, 1–10.
- Ohshima, M., McDonald, P. 1978. A Review of Changes in Nitrogenous compounds in herbage during ensiling. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London. 29 (6), 497- 505.
- Oliveira, A. S., Weinberg, Z. G., Ogunade, I. M., Cervantes, A. A. P., Arriola, K. G., Jiang, Y., Kim, D., Li, X., Gonçalves, M. C. M., Vyas, D., Adesogan, A. T. 2017. Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. *J Dairy Sci.* 100, 4587-4603.
- Rangrab, L. H., Mühlbach, P. R. F.; Berto, J. L. 2000. Silagem de alfafa colhida no início do florescimento e submetida ao emurchecimento e à ação de aditivos biológicos. *Revista Brasileira de Zootecnia.* 29 (2), 349-356.
- Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., Penna, A. L. B. 2012. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Eng Rev.* 4, 124-140.
- Schmidt R., Hu W., Mills J., Kung L. 2009. The development of lactic acid bacteria and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation of alfalfa silage. *Journal of Dairy Science.* 92, 5005–5010.

- Scudamore, K. A., Livesey, C. T. 1998. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 77, 1-17.
- Silva, V. P., Pereira, O. G., Leandro, E. S., Da Silva, T. C., Ribeiro, K. G., Mantovani, H. C., Santos, S. A. 2016. Effects of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential on the fermentation profile and chemical composition of alfalfa silage in tropical conditions. *J Dairy Sci*. 99, 1-8.
- Silva, V. P., Pereira, O. G., Mantovani, H. C., Ribeiro, K. G., Silva, T. C., AGARUSSI, M. C. N., Leandro, E. S. 2015. Potential effects of lactic acid bacteria with antimicrobial activity on spoilage microorganisms in alfalfa silage. In: XVII International Silage Conference. Piracicaba. XVII International Silage Conference.
- Smaoui, S., Elleuch, L., Bejar, W., Karray-Rebai, I., Ayadi, I., Jaouadi, B., Mathieu, F., Chouayekh, H., Bejar, S., Mellouli, L. 2010. Inhibition of Fungi and Gram-Negative Bacteria by Bacteriocin BacTN635 Produced by *Lactobacillus plantarum* sp. TN635. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 162, 1132-1146.
- Siegfried, V.R., Ruckemann, H., Stumpf, G., 1984. Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. *Landwirtsch. Forsch*. 37, 298–304.
- Tschaplinski, T. J. e T. J. Blake. 1989. Photosynthetic reinvigoration of leaves following shoot decapitation and accelerated growth of coppice shoots. *Physiol. Plant*. 75,157–165.
- Universidade Federal de Viçosa – UFV. Departamento de Engenharia Agrícola. Estação Climatológica Principal de Viçosa. Boletim meteorológico 2018. Viçosa, 2018.
- Weatherburn, M.W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem*. v.39, p. 971-974.
- Xu Z, He H, Zhang S, Kong J. 2017. Effects of inoculants *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus parafarraginis* on the fermentation characteristics and microbial communities of corn stover silage. *Scientific Reports*. 7, 13614.

Zhang, T., Li, L., Wang, X., Zeng, Z., Hu, Y., Cui, Z. 2009. Effects of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on fermentation, aerobic stability, bacteria diversity and ruminal degradability of alfalfa silage. *World J Microbiol Biotechnol.* 25, 965-971.

Capítulo II

Parâmetros nutricionais e desempenho de bovinos de corte alimentados com silagem de *Stylosanthes* spp. ou silagem de milho e dois tipos de concentrado

Resumo: Foram realizados dois experimentos para avaliar a digestibilidade, fermentação ruminal, utilização do nitrogênio e o desempenho de bovinos de corte alimentados com dietas contendo silagem de *Stylosanthes* cv. Campo Grande (StS) ou de milho (SM) e dois concentrados, sem (C1) ou com farelo de soja (C2). Foi utilizada relação forragem: concentrado de 50:50, na base da matéria seca. No primeiro experimento, quatro bovinos com peso médio de $200 \pm 15,7$ kg, fistulados no rúmen e abomaso, foram distribuídos em delineamento em quadrado latino, em arranjo fatorial 2×2 , sendo dois volumosos (StS ou SM) e dois concentrados (C1 ou C2). O experimento foi constituído de quatro períodos experimentais com duração de 16 dias cada. No segundo experimento, as mesmas dietas do experimento 1 foram avaliadas em 48 bovinos da raça Nelore com peso médio de 358 ± 30 kg, distribuídos em arranjo fatorial 2×2 , no delineamento inteiramente casualizado, com 12 repetições. O período experimental teve 99 dias de duração, dos quais 15 dias foram para a adaptação e 84 para a coleta de dados. No primeiro experimento, as digestibilidades ruminal, intestinal e total dos nutrientes não foram influenciadas pelas dietas ($P > 0,05$). Os consumos de CNF e NDT foram maiores ($P < 0,05$) para as dietas contendo SM, enquanto o consumo de EE foi similar ($P > 0,05$) entre as dietas. O consumo de FDNi foi maior para as dietas contendo StS ($P < 0,05$). Houve tendência ($P < 0,10$) de maior consumo de MS, PB, MO e FDN para as dietas contendo SM. O tipo de concentrado afetou o consumo de nitrogênio, sendo maior valor obtido para a dieta contendo C2 ($P = 0,03$). O balanço de nitrogênio foi maior para a dieta contendo SM ($P = 0,047$). Houve tendência ($P < 0,10$) de maior síntese de proteína microbiana para as dietas contendo SM e de interação para a eficiência microbiana, sendo maior para a SM com o C2. No segundo experimento, os consumos de MS, MO, PB e FDN foram afetados pelo concentrado, sendo maiores ($P < 0,05$) para o C2. Os consumos de FDNi e de EE foram maiores ($P < 0,05$) para as dietas com StS. As dietas contendo SM apresentaram maior consumo de CNF ($P < 0,05$) e tendência de maior consumo de FDN ($P = 0,06$). A digestibilidade aparente total dos nutrientes não foi afetada ($P > 0,05$) pelas dietas. Os ganhos médios diários de peso e de carcaça foram maiores ($P < 0,05$) para as dietas contendo C2, com médias de 1,3 kg e

0,81 kg, respectivamente. No entanto houve tendência ($P = 0,07$) de maior eficiência alimentar para as dietas contendo SM. O rendimento de carcaça não foi afetado ($P > 0,05$) pelas dietas. Desta forma, conclui-se que a StS não altera os GMD e GMDC em bovinos de corte na fase de terminação, podendo substituir a silagem de milho, sem alterar a amônia e o pH ruminal. No entanto, deve-se manejar a fonte de concentrado de forma a não prejudicar os parâmetros produtivos.

Nutritional parameters and performance of beef cattle fed *Stylosanthes* spp. or corn silages and two types of concentrate

Abstract: Two experiments were carried out to evaluate the digestibility, ruminal fermentation, nitrogen utilization and performance of beef cattle fed diets containing *Stylosanthes* cv. Campo Grande silage (StS) or corn silage (CS) and two concentrates, without (C1) or with soybean meal (C2). A 50:50 forage: concentrate ratio was used, on a DM basis. In the first experiment, 4 bulls with an average initial body weight (BW) of 200 ± 15.7 kg, rumen and abomasum fistulated, were distributed to a latin square with a 2×2 factorial design. The experiment consisted of 4 experimental periods with a duration of 16 days each. In the second experiment, the same diets were evaluated and 48 Nellore bulls with an average initial BW of 358 ± 30 kg were distributed to a 2×2 factorial arrangement in a complete randomized design, with twelve replicates. The experimental period lasted 99 days: 15 for adaptation and 84 for data collection. In the first experiment, diets did not alter ruminal, intestinal and total nutrient digestibility ($P > 0.05$). The NFC and TDN intake were higher ($P < 0.05$) for diets containing CS, while the EE intake was similar ($P > 0.05$) between diets. The iNDF intake was higher for diets containing StS ($P < 0.05$). There was a tendency ($P < 0.10$) of higher intake of DM, CP, OM and NDF for diets containing CS. There was a concentrate effect on the nitrogen intake, and the diets containing C2 provided the highest value ($P = 0.03$). Nitrogen balance was higher for the CS-based diet ($P = 0.047$). There was a tendency ($P < 0.10$) of greater microbial synthesis for the CS-based diet and an $S \times C$ interaction for microbial efficiency, with the higher value for the CS with the C2. In the second experiment, the total apparent digestibility of the nutrients was not affected ($P > 0.05$) by diets. The C2 showed the highest values for DM, OM and CP intake ($P < 0.05$). The iNDF and EE intake were higher ($P < 0.05$) for the StS-based diet, while diets containing CS showed higher ($P < 0.05$) NFC intake and a tendency ($P < 0.06$) of higher NDF intake. The ADG and CADG were higher ($P < 0.05$) for the diets containing the C2, while the dressing was not affected ($P > 0.05$) by diets. The CS-based diet tended ($P = 0.07$) to improve feed efficiency. Thus, it is concluded that StS-based diet does not alter the ADG and CADG of beef cattle in the finishing phase, being able to replace corn silage diets without altering the ammonia and ruminal pH. However, the concentrate source must be handled in a way that does not affect production parameters.

1. INTRODUÇÃO

O desafio da pecuária nas regiões tropicais está associado principalmente à disponibilidade de alimentos. A sazonalidade na oferta de forragem ao longo do ano devido às mudanças climáticas, bem como o intenso grau de degradação das pastagens são entraves para se produzir de forma eficiente.

A intensificação dos sistemas de produção contribui para aumentos da produtividade e da sustentabilidade, e, neste contexto, a utilização de silagem é uma estratégia competitiva que garante estabilidade no fornecimento de alimento em quantidade e qualidade durante o ano. Por outro lado, produzir de forma sustentável requer a manutenção da biodiversidade dos ecossistemas, sendo esse um ponto importante para a longevidade dos sistemas agropecuários (Maikhuri et al., 2016).

Frente a esse cenário, a utilização de forrageiras não convencionais para a produção de silagem, como as leguminosas, é uma interessante alternativa, haja vista sua capacidade em aumentar o input de nitrogênio via fixação simbiótica, melhorar a estrutura do solo, reduzir a incidência de doenças, aumentar a disponibilidade de nutrientes e, conseqüentemente, reduzir dos custos com fertilizantes. Além de seu alto teor de proteína bruta e considerável concentração de energia e cálcio (Ružić-Muslić, et al., 2014)

O *Stylosanthes* cv. Campo Grande é uma leguminosa resultante de uma mistura física de sementes, contendo 80% de *Stylosanthes capitata* e 20% de *Stylosanthes macrocephala*, cujo uso tem aumentado devido ao desenvolvimento de tecnologias de produção (Fernandes et al., 2005). Estudos conduzidos no Brasil com essa leguminosa têm demonstrado que o desempenho e o consumo de bovinos de corte na fase de terminação não são comprometidos quando comparados com a silagem de milho (SM) (Souza et al., 2014; Da Silva, et al., 2016). No entanto, vale ressaltar que a maioria dos estudos envolvendo silagem de leguminosas está restrita a silos laboratoriais, com poucos resultados a nível de resposta animal. Ainda, deve-se considerar a vantagem de usar estrategicamente a leguminosa para reduzir o uso de concentrado proteico nas dietas e assim reduzir os custos de produção.

Diante do exposto, hipotetizamos que a silagem de *Stylosanthes* cv. Campo Grande (StS) fornecida na proporção 50:50 na base da matéria seca, pode reduzir a quantidade de farelo de soja no concentrado em dietas de bovinos de corte na fase de terminação, sem comprometer o desempenho animal e parâmetros ruminais. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da utilização de silagem de StS ou de SM,

associada a dois concentrados, sem (C1) ou com farelo de soja (C2) sobre o consumo, digestibilidade parcial e total dos nutrientes, fermentação ruminal, utilização do nitrogênio e desempenho de bovinos de corte.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos cirúrgicos e de manejo dos animais realizados nesse estudo foram aprovados pelo Comitê Institucional de Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa – CEUAP – UFV, sob o número de protocolo 023/2016.

2.1. Área experimental e condições climáticas

Os experimentos foram conduzidos na Central de Experimentação, Pesquisa e Extensão do triângulo mineiro (CEPET) da Universidade Federal de Viçosa. A CEPET está localizada no município de Capinópolis, na Região do Pontal do Triangulo Mineiro do estado de Minas Gerais, com altitude média de 620,2 m, latitude Sul de 18,41° e longitude Oeste de 49,34°.

2.2. Animais, delineamento experimental e dietas

Dois experimentos foram conduzidos simultaneamente no período de agosto a dezembro de 2015. Os animais foram confinados em baias individuais, dotadas de bebedouro e comedouro, com área total de 20 m², sendo 6 m² cobertos com telhas de amianto. A alimentação foi fornecida duas vezes ao dia, às 9:00 e às 16 h, de modo a proporcionar 10% de sobras. Todos os animais foram vermifugados com ivermectina (Bayer, SP, Brasil), na dose de 1 mL / 50 kg de peso corporal para controle de parasitas.

Experimento 1 – Digestibilidades total e parcial, parâmetros ruminais e eficiência de utilização do nitrogênio

Quatro bovinos Nelore, não castrados, com peso vivo inicial médio de 200 ± 15,7 kg, fistulados no rúmen e abomaso foram distribuídos em um delineamento em quadrado latino 4 × 4 em esquema fatorial 2 × 2 (duas silagens e dois concentrados), com 4 animais e 4 períodos. Os animais receberam quatro dietas balanceadas, contendo, na base da matéria seca, 50% de silagem e 50% de concentrado.

As dietas experimentais foram constituídas por silagens de *Stylosanthes* cv. Campo Grande ou de milho em combinação com dois concentrados, contendo fubá de milho e mistura mineral (C1) ou fubá de milho, farelo de soja e mistura mineral (C2). As dietas foram formuladas de acordo com o Sistema Brasileiro de Exigências Nutricionais de Zebuínos Puros e Cruzados – BR CORTE (Valadares et al., 2010), de modo a permitir ganho de 1,2 kg/dia. O teor de proteína bruta das dietas foi ajustado para 11,5% na matéria seca. O concentrado 1 apresentou 480 g/kg de fubá de milho, enquanto o concentrado 2 apresentou 423 g/kg de fubá de milho e 57 g/kg de farelo de soja. Dessa forma, a mistura de ureia:SA foi utilizada para tornar as dietas isoproteicas.

A StS apresentou maior teor de proteína em relação a SM, e portanto, não foi necessário adicionar a mistura ureia:SA na dieta contendo StS e o C2. A ureia: SA foi adicionada à silagem no momento da alimentação dos animais.

A composição química das silagens e dos ingredientes dos concentrados bem como a proporção dos ingredientes nas dietas estão apresentados nas Tabela 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1

Composição química das silagens e dos ingredientes do concentrado (EXP 1).

Itens ^a	StS ^b	SM ^c	Fubá de milho	Farelo de soja
Matéria seca ,g/kg	226	322	894	904
Composição química g/kg de matéria seca				
Matéria orgânica	875	962	982	934
Proteína bruta	96	73,5	73,1	483
FDN	647	555	206	195
FDA	548,9	368,4	40	121,3
FDNi	455	193	14,6	9,3
Extrato etéreo	13,2	19,7	45,8	15,7
CNF	172	385	657,4	240,2
Frações da proteína bruta				
a, g/kg NT	351	650,9	232,7	196,8
b, g/kg NT	221	269,3	553,7	783,4
Kd,%/h	3,49	5,90	2,68	8,60
PDR, g/kg MS	42,4	58,9	31,1	334,4
NIDA g/kg NT	396,8	183	94,5	141,9

^aPDR: Proteína degradável no rúmen (Teores de PDR de silagem de milho, fubá de milho e farelo de soja calculados com base nas frações a, b e kd da proteína presentes na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos para Bovinos - CQBAL 3.0 (Valadares Filho et al., 2018), com Kp = 0,05); Os teores de PDR da silagem de *Stylosanthes* spp. Foi calculado de acordo com as frações a, b e kd da proteína descrito por Da Silva et al. (2016); PB: Proteína bruta; FDN: Fibra insolúvel em detergente neutro; FDA: Fibra insolúvel em detergente ácido; FDNi: Fibra indigestível em detergente neutro; CNF: Carboidratos não fibrosos; NIDA: Nitrogênio insolúvel em detergente ácido.

^bStS: Silagem de *Stylosanthes* spp.; SM: Silagem de milho

Tabela 2

Proporção dos ingrediente e composição química das dietas (g/kg MS) (EXP 1).

Itens ^a	Tratamentos ^b			
	StS		SM	
	C1	C2	C1	C2
Proporção dos ingredientes				
Silagem de <i>Stylosanthes</i> spp.	490,5	500	-	-
Silagem de milho	-	-	485	494,3
Fubá de milho	480	423	480	423
Farelo de soja	-	57	-	57
Ureia:SA	9,5	-	15	5,8
Premix	20	20	20	20
Composição química das dietas, g/kg MS				
Matéria seca, g/kg	560,9	561,3	608,12	608,5
Matéria orgânica	908,9	906,1	952,4	949,6
Proteína bruta	115,17	113,6	113,9	117,1
PDR	68,7	60,7	92,6	88,7
FDN	416,2	421,8	368,1	372,6
FDA	288,7	298,3	197,9	205,9
FDNi	230,19	234,21	100,62	102,11
Extrato etéreo	28,45	26,86	31,53	30
CNF	430,08	377,77	502,28	482,93

^aUreia: SA: 9 partes de ureia e 1 parte de sulfato de amônio; Premix: 150g/kg cálcio, 65 g/kg fósforo, 160 g/kg sódio, 11g/kg magnésio, 670 mg/kg cobalto, 979 mg/kg cobre, 685.5 mg/kg iodo, 944 mg/kg manganês, 23.3 mg/kg selênio, 3.6 g/kg zinco, 160 g/kg enxofre; PDR: Proteína degradável no rúmen; FDN: Fibra insolúvel em detergente neutro; FDA: Fibra insolúvel em detergente ácido; FDNi: Fibra indigestível em detergente neutro; CNF: carboidratos não fibrosos.

^bStS C1: Dieta contendo silagem de *Stylosanthes* spp. e concentrado 1; StS C2: Dieta contendo silagem de *Stylosanthes* spp. e concentrado 2; SM C1: Dieta contendo silagem de milho e concentrado 1; SM C2: Dieta contendo silagem de milho e concentrado 2.

Cada período experimental teve duração de 16 dias, sendo 12 dias para adaptação às condições experimentais e às dietas e quatro dias para coletas. As coletas de fezes, digesta abomasal, líquido ruminal e urina foram realizadas a cada 9 h, utilizando-se o esquema: 13º dia coletas as 00:00, 9:00, 18:00, 14º dia coleta as 03:00, 12:00, 21:00 e no 15º dia coleta as 06:00 e 15:00. No 16º dia, 4 horas após a alimentação, foi realizada a coleta de sangue através da punção da veia jugular. As amostras foram armazenadas em freezer a -15°C e ao final de cada período experimental foram feitas amostras compostas por animal e por período, com exceção das amostras de líquido ruminal.

As amostras de digesta abomasal foram obtidas pela cânula de abomaso, sendo coletados 500 mL e armazenados a -15 °C. Ao final do período experimental, as amostras para avaliação do fluxo ruminal foram descongeladas à temperatura ambiente

e uma amostra composta foi feita para cada animal, resultando em uma amostra de 4 L de digesta.

O líquido ruminal foi coletado, homogeneizado e o pH foi mensurado imediatamente por um medidor digital de pH (Tecnal, SP, Brasil). Em seguida, uma alíquota de 50 mL foi retirada e acidificada com 1 mL de solução de ácido sulfúrico e água destilada na concentração 1:1, para posterior análise de nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_3\text{-N}$).

Para estimar os fluxos de matéria seca abomasal e fecal foi utilizada a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi). As fezes foram coletadas diretamente do reto e, em seguida, foram congeladas.

A urina foi coletada com o auxílio de coletores adaptados aos animais e ao final do período de coleta, duas alíquotas da amostra composta de cada animal foram retiradas: Uma alíquota contendo 10 ml de urina foi diluída com 40 ml de ácido sulfúrico 0,036 N, para impedir a destruição bacteriana dos derivados de purina e a precipitação do ácido úrico, bem como estimar os teores de creatinina, e outra alíquota composta de 50 ml de urina concentrada para a determinação do nitrogênio total. Ambas as amostras foram armazenadas a -15°C .

A coleta de sangue foi realizada quatro horas após a alimentação dos animais, via punção da veia jugular, utilizando-se tubos de ensaio com gel separador e acelerador de coagulação. As amostras foram imediatamente centrifugadas a $2,700 \times g$ por 20 minutos para a separação do plasma. Após separação, o soro foi armazenado a -15°C para posteriores análises de nitrogênio ureico no plasma.

Experimento 2 – Desempenho animal

Um total de 48 bovinos da raça Nelore, não castrados, com peso médio inicial de 358 ± 30 kg foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em um esquema fatorial 2×2 , com 12 repetições. O experimento teve duração de 99 dias, 15 para adaptação às condições experimentais e às dietas e 84 para coleta de dados e amostras.

Quatro animais referência foram abatidos após o período de adaptação para a determinação do rendimento de carcaça inicial, usado para a estimativa do ganho de carcaça dos animais experimentais.

Após os 15 dias de adaptação e ao final do experimento, os animais foram submetidos a 16 horas de jejum de sólidos e pesados para a estimativa do ganho médio diário de peso corporal e de carcaça.

Amostras dos alimentos fornecidos e das sobras de cada animal foram pesadas e amostradas diariamente e amostras compostas foram feitas por animal ao final do experimento e mantidas a -15°C. No 30º dia do período de coleta de dados foi realizada uma coleta de fezes para a determinação da digestibilidade aparente total dos nutrientes, como descrito para o experimento 1.

Ao final do experimento, todos os animais foram abatidos para a determinação do rendimento de carcaça e ganho médio diário de carcaça, os quais foram calculados pela razão percentual entre o peso da carcaça quente e o peso vivo final em jejum e pela equação: $GMDC \text{ (kg/d)} = \{[PCF \times (PCQf/1000)] - [PCI \times (PCQi/1000)]\}/n$, respectivamente, onde: GMDC = Ganho médio diário de carcaça; PCF = Peso corporal final após jejum; PCQf = Peso de carcaça quente final; PCI = Peso corporal inicial após jejum; PCQi = Peso de carcaça quente inicial; n = número de dias avaliados.

2.3. Análises laboratoriais

As amostras de alimentos fornecidos, sobras, fezes e digesta abomasal foram submetidas a secagem em estufa de ventilação forçada de ar a 55° por 72 horas e em seguida moídas em moinho tipo “Willey” com peneira de 1 e 2 mm. As amostras moídas a 1 mm foram utilizadas para a determinação dos teores de matéria seca (MS) pelo método 934.01, proteína bruta (PB) pelo método 984.13, extrato etéreo (EE) pelo método 920.39 e matéria mineral (MM) pelo método 942.05 (AOAC, 1990).

O teor de matéria orgânica (MO) foi obtido por diferença (MO + MM = 100) e as concentrações de fibra em detergente neutro (FDN) foram determinadas com a adição de α amilase termoestável e sem a utilização de sulfito de sódio. Posteriormente a FDN foi corrigida para as contaminações de cinzas e proteína (FDNcp), sendo os resíduos submetidos à análise de cinzas (Mertens, 2002) e compostos nitrogenados (Licitra et al., 1996). A fibra em detergente ácido (FDA) foi determinada nas amostras de alimentos (método 973.18; AOAC, 1990).

As amostras moídas a 2 mm foram incubadas *in situ* por 288 horas para a determinação da concentração de FDNi (Valente et al., 2015). Após a remoção, os sacos foram lavados e secos a 55°C por 48 horas, em seguida, a análise da FDN foi realizada conforme descrito anteriormente.

Os teores de carboidratos não fibrosos (CNF) foram calculados segundo equação proposta por Detmann e Valadares Filho (2010), onde: $CNF_{cp} = 100 - [(\%PB - \%PB \text{ derivada da uréia} + \%uréia) + \%FDN_{cp} + \%EE + \%Cinzas]$.

A concentração de nitrogênio amoniacal das amostras de líquido ruminal foi determinada de acordo com o método descrito por Chaney and Marbach (1962).

Nas amostras de urina diluída foram utilizados o método de ponto final usando picrato e acidificantes para a obtenção das concentrações de creatinina (creatinina, Labtest Diagnóstica, MG, Brasil), e o volume urinário estimado pela razão entre as excreções urinárias diárias de creatinina e a concentração de creatinina na urina.

A estimativa da excreção diária de creatinina (ECU) foi calculada pela equação $ECU \text{ (g/dia)} = 0,0345 \times PCJ^{0,9491}$, onde: PCJ = peso corporal em jejum para bovinos em crescimento (Silva et al., 2012). As concentrações de ácido úrico também foram determinadas (ácido úrico; Labtest Diagnóstica, MG, Brasil) e a alantoína foi obtida por método colorimétrico de acordo com Fujihara et al. (1987), descrito por Chen e Gomes (1992).

A análise de nitrogênio total foi obtida na amostra de urina concentrada pelo método mencionado previamente. A excreção diária de todos os componentes analisados na urina foi obtida através da multiplicação da concentração de cada composto pelo volume urinário diário estimado.

O balanço de compostos nitrogenados foi obtido pela diferença entre o nitrogênio total ingerido e o nitrogênio total excretado nas fezes e urina. O cálculo da excreção total de derivados de purina foi obtido pela soma das quantidades de alantoína e ácido úrico excretados na urina em mmol/dia. O cálculo das purinas absorvidas (X, mmol/dia) foi feito a partir da excreção dos derivados de purina (Y, mmol/dia) usando a equação $Y = [X - (0,30 \times PC^{0,75})]/0,80$, onde, 0,80 corresponde a recuperação de purinas absorvidas como derivados de purina e $0,30 \times PC^{0,75}$ representa a contribuição endógena para a excreção de purinas (Barbosa et al., 2011).

A síntese microbiana foi calculada pela seguinte equação: $N_{mic} \text{ (g N/d)} = 70 \times DP/(0,93 \times 1000 \times 0,137)$, onde: 70 é o teor de nitrogênio das purinas (mg N/mmol), 0,93 é a digestibilidade verdadeira das purinas e 0,137 é a relação média de nitrogênio nas purinas: nitrogênio total na bactéria que foi isolada do rúmen (Barbosa et al., 2011). A análise de ureia no sangue foi realizando por método colorimétrico – enzimático (ureia; Labtest Diagnóstica, MG, Brasil).

2.4. Análises estatísticas

As análises dos dados foram obtidas pelo programa estatístico SAS 9.3 (SAS System Inc., Cary, NC, USA), considerando 0.05 de probabilidade para o erro tipo I. A homogeneidade das variâncias entre os tratamentos foi assumida e os dados foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste F. Os dados de consumo, digestibilidade total e parcial, eficiência de utilização do nitrogênio e fermentação ruminal (pH e amônia), do experimento 1, foram analisados segundo o delineamento em quadrado latino em esquema fatorial 2×2 através do seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + a_k + P_1 + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijkl}$$

Onde: Y_{ijkl} = Variável resposta, μ = Média geral, α_i = Efeito fixo da silagem i , β_j = Efeito fixo do concentrado j , a_k = Efeito aleatório do animal K , P_1 = Efeito aleatório do período 1, $(\alpha\beta)_{ij}$ = Interação entre silagem e concentrado, ε_{ijkl} = Erro aleatório, assumindo uma distribuição normal independente (NID), $(0; \sigma^2\varepsilon)$.

Os dados de consumo de nutrientes, digestibilidade total, ganho de peso, ganho de carcaça e eficiência alimentar do experimento 2 foram analisados segundo o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×2 com 12 repetições. O método box plot foi utilizado para a remoção de outlier e o peso inicial dos animais foi utilizado como covariável, seguindo o modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \gamma (X_k - \bar{X}) + \varepsilon_{ijk}$$

Onde: Y_{ijkl} = Variável resposta, μ = Média geral, α_i = Efeito fixo da silagem i , β_j = Efeito fixo do concentrado j , $(\alpha\beta)_{ij}$ = Interação entre silagem e concentrado, γ = Coeficiente de regressão ou relação funcional com a covariável, X_k = Valor observado da covariável aplicada à unidade experimental k , \bar{X} = Valor médio da covariável, ε_{ijk} = Erro aleatório, assumindo uma distribuição normal independente (NID), $(0; \sigma^2\varepsilon)$.

3. RESULTADOS

3.1. Consumo dos nutrientes (Experimento 1)

Houve tendência de interação $S \times C$ sobre os consumos de MS, MO, PB e FDN ($P < 0,10$). O mesmo ocorreu para os consumos de MS e FDN quando expressos como função do peso corporal. No estudo da interação, os consumos desses nutrientes foram maiores para a dieta contendo SM e o C2 ($P < 0,05$). Houve tendência de maior consumo de EE ($P < 0,10$) para as dietas contendo SM.

Os consumos de CNF e NDT foram maiores ($P < 0,05$) para as dietas contendo SM, enquanto o consumo de FDNi foi maior ($P = 0,01$) para as dietas com StS (Tabela 3).

Tabela 3

Efeitos das dietas experimentais no consumo de nutrientes de bovinos de corte na fase de terminação (EXP 1).

Item ^a	StS ^b		SM ^c		EPM ^d	P-valor ^e		
	C1	C2	C1	C2		S	C	S×C
Consumo, kg/dia								
MS	4,64	4,53	4,79	6,12	0,24	0,052	0,16	0,09
MO	4,35	4,22	4,62	5,92	0,24	0,02	0,15	0,08
PB	0,50	0,51	0,54	0,68	0,02	0,004	0,03	0,07
FDN	1,70	1,54	1,46	2,22	0,14	0,34	0,27	0,09
FDNi	0,83	0,74	0,43	0,56	0,06	0,01	0,81	0,29
EE	0,16	0,20	0,25	0,24	0,02	0,06	0,63	0,42
CNF	2,29	1,89	2,97	3,06	0,14	<0,001	0,34	0,13
NDT	3,06	2,83	3,82	4,44	0,21	0,002	0,52	0,18
Consumo, g/kg PC								
MS	18,2	17,5	18,1	23,3	0,09	0,09	0,18	0,08
FDN	6,6	5,9	5,5	8,6	0,05	0,47	0,28	0,08

^aMS: Matéria seca; MO: Matéria orgânica; PB: Proteína bruta; FDN: Fibra insolúvel em detergente neutro; FDNi: Fibra indigestível em detergente neutro; EE: Extrato etéreo; CNF: Carboidratos não fibrosos, NDT: Nutrientes digestíveis totais; PC: Peso corporal.

^bStS C1: Dieta contendo silagem de *Stylosanthes* spp. e concentrado 1; StS C2: Dieta contendo silagem de *Stylosanthes* spp. e concentrado 2.

^cSM C1: Dieta contendo silagem de milho e concentrado 1; SM C2: Dieta contendo silagem de milho e concentrado 2.

^dEPM: Erro padrão da média.

^eProbabilidade de efeito de silagem (S), concentrado (C) e de interação de S com C ($S \times C$).

3.2. Digestibilidades total, ruminal e intestinal (Experimento 1)

As digestibilidades ruminais da MS, MO, PB e FDN não foram afetadas pelas dietas ($P > 0,05$) com médias de 392,15 g/kg, 448,03 g/kg MS, -41,95 g/kg MS e 541,25

g/kg MS, respectivamente. (Tabela 4). O mesmo comportamento foi observado para a digestibilidade intestinal ($P > 0,05$).

Houve tendência de maior digestibilidade total da proteína bruta para as dietas contendo SM ($P = 0,06$) e interação ($P = 0,003$) para a digestibilidade total do extrato etéreo (Tabela 4). Nas dietas contendo StS, o C2 proporcionou maior digestibilidade ($P < 0,05$) do EE. No entanto, comportamento oposto foi encontrado para as dietas a base de SM, onde a digestibilidade foi maior ($P < 0,05$) quando fornecida com o C1.

A digestibilidade total dos demais constituintes foi similar ($P > 0,05$) entre as dietas.

Tabela 4

Efeitos das dietas experimentais nas digestibilidades ruminal, intestinal e total dos nutrientes (g/kg MS) de bovinos de corte na fase de terminação (EXP 1).

Item ^a	StS ^b		SM ^c		EPM ^d	P-valor ^e		
	C1	C2	C1	C2		S	C	S×C
Ruminal^f								
MS	372,5	396,4	334,8	464,9	3,05	0,81	0,25	0,42
MO	432,6	467,4	387,9	504,2	2,94	0,95	0,24	0,52
PB	-119,5	-15,6	-112,3	79,6	4,52	0,57	0,12	0,62
FDN	562,7	559,5	471,3	571,5	2,17	0,38	0,29	0,26
Intestinal^g								
MS	258,5	264,8	355,0	220,3	2,50	0,60	0,21	0,17
MO	235,3	236,3	324	199,9	2,39	0,81	0,12	0,32
PB	638,7	594,9	797,2	554,8	4,76	0,53	0,15	0,30
FDN	25,5	30,3	85	29,6	2,12	0,54	0,60	0,54
Total^h								
MS	630,9	661,2	689,8	685,2	1,95	0,35	0,77	0,69
MO	667,9	703,7	711,9	704,1	1,84	0,60	0,74	0,60
PB	519,2	579,3	684,7	634,4	2,84	0,06	0,93	0,31
FDN	588,2	589,8	556,2	601,1	1,69	0,79	0,55	0,58
EE	707,2	805,9	852,7	766,8	1,76	0,05	0,80	0,003
CNF	770,7	803,8	859,1	811,6	1,90	0,23	0,85	0,32

^aMS: Matéria seca; MO: Matéria orgânica; PB: Proteína bruta; FDN: Fibra insolúvel em detergente neutro; EE: Extrato etéreo; CNF: Carboidratos não fibrosos.

^bStS C1: Dieta contendo silagem de *Stylosanthes* spp. e concentrado 1; StS C2: Dieta contendo silagem de *Stylosanthes* spp. e concentrado 2.

^cSM C1: Dieta contendo silagem de milho e concentrado 1; SM C2: Dieta contendo silagem de milho e concentrado 2.

^dEPM: Erro padrão da média.

^eProbabilidade de efeito de silagem (S), concentrado (C) e de interação de S com C (S × C).

^fDigestibilidade aparente ruminal (g/kg): (consumo de nutriente – fluxo abomasal do nutriente/ consumo de nutriente) × 1000.

^gDigestibilidade aparente intestinal (g/kg): (fluxo abomasal do nutriente – nutriente excretado/ consumo de nutriente) × 1000.

^hDigestibilidade aparente total (g/kg): (consumo de nutriente – nutriente excretado)/consumo de nutriente) × 1000.

3.3. Fermentação ruminal

Os teores de nitrogênio amoniacal e os valores de pH do líquido ruminal não foram influenciados pelas dietas ($P > 0,05$), com médias de 7 mg/dL e 6,31, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5

Efeitos das dietas experimentais na fermentação ruminal de bovinos de corte na fase de terminação (EXP 1).

Item ^a	StS ^b		SM ^c		EPM ^d	P-valor ^e		
	C1	C2	C1	C2		S	C	S×C
pH	6,47	6,38	6,12	6,28	0,07	0,15	0,82	0,40
NH ₃ -N	7,83	7,69	4,99	7,21	0,71	0,27	0,49	0,43

^a NH₃-N: Nitrogênio amoniacal (mg/dL);

^bStS C1: Dieta contendo silagem de *Stylosanthes* spp. e concentrado 1; StS C2: Dieta contendo silagem de *Stylosanthes* spp. e concentrado 2.

^cSM C1: Dieta contendo silagem de milho e concentrado 1; SM C2: Dieta contendo silagem de milho e concentrado 2.

^dEPM: Erro padrão da média.

^eProbabilidade de efeito de silagem (S), concentrado (C) e de interação de S com C (S × C).

3.4. Utilização do nitrogênio

As concentrações de nitrogênio nas fezes e urina não foram afetadas pelas dietas ($P > 0,05$). No entanto, houve efeito de silagem ($P = 0,047$) sobre o balanço de compostos nitrogenados, e as dietas contendo StS apresentaram menor valor médio (14,73 x 29,17 g).

Houve tendência de maior síntese de nitrogênio microbiano ($P = 0,08$) para as dietas contendo SM, e de interação ($P = 0,08$) para a eficiência microbiana. A dieta contendo SM e o C2 apresentou maior eficiência microbiana ($P < 0,05$).

Tabela 6

Efeitos das dietas experimentais no balanço de nitrogênio de bovinos de corte na fase de terminação (EXP 1).

Item ^a	StS ^b		SM ^c		EPM ^d	P-valor ^e		
	C1	C2	C1	C2		S	C	S×C
Balanço N, g								
Consumo de N	79,28	81,36	86,84	108,52	3,72	0,004	0,03	0,07
N - fezes	43,52	39,36	32,21	47,68	3,64	0,84	0,46	0,21
N - urina	30,20	31,31	31,18	25,95	1,87	0,59	0,61	0,44
BN	14,57	14,89	23,44	34,89	3,61	0,047	0,38	0,40
Plasma sanguíneo, mg/dL								
NUP	11,27	10,51	10,40	7,32	0,74	0,17	0,19	0,42
Síntese microbiana								
PB mic	293,73	284,30	335,03	419,81	22,15	0,08	0,19	0,41
Eficiência mic	98,28	79,25	82,46	117,87	7,59	0,44	0,58	0,08

^aBN: Balanço de nitrogênio; NUP: Nitrogênio ureico no plasma sanguíneo; N mic: Nitrogênio microbiano (g N/dia); PB mic: Proteína microbiana (g PB/dia); Eficiência mic: Eficiência microbiana (g PB mic/NDT).

^bStS C1: Dieta contendo silagem de *Stylosanthes* spp. e concentrado 1; StS C2: Dieta contendo silagem de *Stylosanthes* spp. e concentrado 2.

^cSM C1: Dieta contendo silagem de milho e concentrado 1; SM C2: Dieta contendo silagem de milho e concentrado 2.

^dEPM: Erro padrão da média.

^eProbabilidade de efeito de silagem (S), concentrado (C) e de interação de S com C (S × C).

3.5. Consumo dos nutrientes, digestibilidade total e desempenho (Experimento 2)

Não houve efeito de interação sobre as variáveis do experimento 2. Os consumos de MS, MO e PB foram afetados ($P < 0,05$) apenas pelo concentrado, sendo registrado maiores valores para o C2 (Tabela 7). O mesmo comportamento foi observado quando os consumos de MS e FDN foram expressos como porcentagem do peso corporal ($P < 0,05$). Houve tendência ($P = 0,06$) de maior consumo de FDN para as dietas contendo SM.

O consumo de FDNi foi afetado ($P < 0,05$) pelas silagens e pelos concentrados. Os animais alimentados com dietas contendo StS apresentaram maior consumo de FDNi ($P < 0,001$). O mesmo foi observado para as dietas contendo o C2 ($P < 0,001$).

Maiores ingestões de EE e CNF ($P < 0,001$) foram obtidos para a StS e SM, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7

Efeitos das dietas experimentais no consumo e digestibilidade total dos nutrientes de bovinos de corte na fase de terminação (EXP 2).

Item ^a	StS ^b		SM ^c		EPM ^d	P-valor ^e		
	C1	C2	C1	C2		S	C	S×C
Consumo (kg/dia)								
MS	8,37	9,51	8,29	9,37	0,16	0,60	<0,001	0,87
MO	7,71	8,72	7,99	9,02	0,15	0,14	<0,001	0,98
PB	0,93	1,07	0,96	1,09	0,018	0,22	<0,001	0,70
FDN	3,11	3,53	3,30	3,69	0,07	0,06	<0,001	0,87
FDNi	1,62	1,83	0,94	1,04	0,07	<0,001	0,001	0,23
EE	0,34	0,35	0,28	0,29	0,007	<0,001	0,25	0,93
CNF	3,93	3,77	4,43	4,38	0,07	<0,001	0,28	0,58
Consumo (g/kg PC)								
MS	19,0	20,4	18,4	19,9	0,02	0,14	0,0002	0,85
FDN	7,1	7,6	7,3	7,8	0,009	0,12	0,004	0,93
Digestibilidade Total (g/kg)								
MS	568	564	605	572	1,16	0,35	0,45	0,55
MO	619	605	620	587	1,14	0,73	0,34	0,68
PB	544	508	575	546	1,49	0,27	0,30	0,90
FDN	545	533	509	470	1,72	0,18	0,48	0,71

^aMS: Matéria seca; MO: Matéria orgânica; PB: Proteína bruta; FDN: Fibra insolúvel em detergente neutro; FDNi: Fibra indigestível em detergente neutro; EE: Extrato etéreo; CNF: Carboidratos não fibrosos; PC: Peso corporal.

^bStS C1: Dieta contendo silagem de *Stylosanthes* spp. e concentrado 1; StS C2: Dieta contendo silagem de *Stylosanthes* spp. e concentrado 2.

^cSM C1: Dieta contendo silagem de milho e concentrado 1; SM C2: Dieta contendo silagem de milho e concentrado 2.

^dEPM: Erro padrão da média.

^eProbabilidade de efeito de silagem (S), concentrado (C) e de interação de S com C (S × C).

O GMD e o GMDC foram maiores para os animais alimentados com as dietas contendo o C2 ($P < 0,05$), enquanto o rendimento de carcaça (RC) e a eficiência alimentar (EA) não diferiram ($P > 0,05$) entre as dietas (Tabela 8).

Tabela 8

Efeitos das dietas experimentais no desempenho de bovinos de corte na fase de terminação (EXP 2).

Item ^a	StS ^b		SM ^c		EPM ^d	P-valor ^e		
	C1	C2	C1	C2		S	C	S×C
GMD	0,96	1,27	1,08	1,33	0,04	0,16	<0,001	0,67
GMCD	0,64	0,79	0,70	0,83	0,04	0,25	0,001	0,80
RC	532,2	530,2	531,7	530,9	0,25	0,99	0,79	0,91
EA	75,91	82,34	82,71	89,40	3,44	0,11	0,13	0,97

^aGMD: Ganho médio diário (kg/dia); GMDC: Ganho médio diário de carcaça (kg/dia); RC: Rendimento de carcaça (g/kg); EA: Eficiência alimentar (g de ganho de carcaça/kg matéria seca consumida).

^bStS C1: Dieta contendo silagem de *Stylosanthes* spp. e concentrado 1; StS C2: Dieta contendo silagem de *Stylosanthes* spp. e concentrado 2.

^cSM C1: Dieta contendo silagem de milho e concentrado 1; SM C2: Dieta contendo silagem de milho e concentrado 2.

^dEPM: Erro padrão da média.

^eProbabilidade de efeito de silagem (S), concentrado (C) e de interação de S com C (S × C).

3.6. Avaliação bioeconômica

Na Tabela 9 encontram-se a composição química e o rendimento forrageiro das silagens de milho e estilosantes cv. Campo Grande.

Tabela 9

Composição química e rendimento forrageiro de silagens de milho e estilosantes cv. Campo Grande.

Forragem	Composição química ^c		Rendimento forrageiro ^d		
	MS	PB	MN	MS	PB
Silagem de milho ^a	30,9	7,26	40,0	12,4	0,90
Silagem de estilosantes ^b	26,5	12,2	30	8,0	0,98

^a: Fonte: Adaptado de Pereira et al. (2008).

^b: Composição química obtida por Da Silva et al. (2018).

^c: MS: Matéria seca (%); PB: Proteína bruta (%).

^d: Rendimento forrageiro: ton/ha/ano; MN: Matéria natural.

O custo de produção da silagem de milho foi menor em relação à silagem de estilosantes. No entanto, o custo por tonelada de proteína bruta foi menor para a silagem de estilosantes (Tabela 10).

Tabela 10

Custos de produção por área, por unidade de matéria natural (MN), matéria seca (MS) e proteína bruta (PB) de silagens de milho e estilosantes cv. Campo Grande.

Forragem	Custo total de produção			
	R\$/ha/ano	R\$/t MN	R\$/t MS	R\$/t PB
Silagem de milho	4447,29	111,19	359,58	4952,89
Silagem de estilosantes	3432,46	114,42	431,937	4499,375

Fonte adaptado de Pereira et al. (2018). Preços referentes a agosto de 2018.

Na Tabela 11 estão apresentados os custos da dieta dos animais experimentais alimentados com silagem de milho ou de estilosantes associados ou não ao concentrado proteico.

Tabela 11

Ingredientes da dieta e custos com alimentação de bovinos de corte na fase de terminação.

Item	Dietas ^c				Custo R\$/t MS
	StS		SM		
	C1	C2	C1	C2	
Alimentos					
SM ^a	49,05	50,0	-	-	359,58
StS ^b	-	-	48,5	49,43	431,94
Fubá de milho	48,0	42,3	48,0	42,3	1051,45
Farelo de soja	-	5,70	-	5,70	2544,25
Ureia:SA	0,95	-	1,5	0,58	1614,00
Premix	2,0	2,0	2,0	2,0	1976,67
Total	100	100	100	100	
Custo com alimentação					
Dieta consumida, R\$/ton de MS	771,43	845,29	735,92	809,37	
Animal - R\$/cab/dia	6,46	8,04	6,10	7,58	
Arroba produzida, R\$/@ de carcaça	151,33	152,63	130,73	137,03	

^aSM: Silagem de milho; StS: Silagem de de *Stylosanthes* spp.

^bStS C1: Dieta contendo silagem de *Stylosanthes* spp. e concentrado 1; StS C2: Dieta contendo silagem de *Stylosanthes* spp. e concentrado 2.

^cSM C1: Dieta contendo silagem de milho e concentrado 1; SM C2: Dieta contendo silagem de milho e concentrado 2. C1 = Concentrado contendo fubá e milho; C2 = Concentrado contendo fubá de milho e farelo de soja.

4. DISCUSSÃO

4.1. Consumo dos nutrientes e digestibilidade (Experimento 1)

A ingestão de MS é o fator que influencia diretamente a produção animal. A tendência de maiores consumos de PB, FDN e MO observados na dieta contendo a SM e o C2 estão associados ao maior consumo de MS, que por consequência, aumentou o consumo dos demais nutrientes.

A redução do consumo de MS observada na dieta contendo a SM e o C1 pode estar relacionada a deficiência de aminoácidos e ácidos graxos de cadeia ramificada

para atender as exigências dos microrganismos ruminais, e dessa forma, pode ter prejudicado a taxa de passagem e limitado o consumo. Ácidos graxos de cadeia ramificada são derivados da degradação de proteínas, são essenciais e estimulam o crescimento de bactérias celulolíticas ruminais (Cummins e Papas 1985; Liu et al., 2018; Wang et al., 2018). Esses compostos estão presentes em fontes de proteína verdadeira (Yang et al., 2002), tais como o farelo de soja presente no C2. Por outro lado, nas dietas contendo StS, a redução no consumo pode ser devido a sua maior concentração de FDNi, uma vez que esta fração tem sido relacionada como a maior responsável pela repleção ruminal (Vieira et al., 1997). Os maiores consumos de CNF e NDT das dietas a base de SM e de FDNi nas dietas a base de StS, refletem as maiores concentrações desses componentes nas respectivas silagens.

As digestibilidades ruminais negativas da proteína bruta encontrada nas dietas contendo StS e na dieta contendo SM e o C1, demonstram que a utilização dessas dietas demandou uma maior dependência da reciclagem de nitrogênio no rúmen, e desta forma, o fluxo de nitrogênio para o abomaso foi maior que o seu consumo. A deficiência dietética de nitrogênio está associada ao aumento da reciclagem de nitrogênio no rúmen (Batista et al., 2016; Rufino et al., 2016). No entanto, as dietas do presente estudo foram isonitrogenadas, indicando que nesse caso, o menor consumo observado nas dietas a base de StS e da dieta contendo SM e o C1, estaria relacionado ao menor aporte de nitrogênio no rúmen. A ausência de diferença na digestibilidade ruminal da proteína entre as dietas, com menor digestibilidade total para as dietas contendo StS também foi observado por Da silva et al. (2016). Esses autores atribuíram esse resultado ao maior teor de NNP nessas silagens devido à intensa proteólise que ocorre no processo de fermentação, e dessa maneira, aumentou a disponibilidade de nitrogênio no rúmen.

A tendência observada de menor digestibilidade total da proteína bruta para as dietas contendo silagem de StS pode estar associada ao alto teor de nitrogênio ligado a fração fibrosa, devido ao alto teor de NIDA dessa silagem quando comparado a silagem de milho (396,8 vs. 183,0 g/kg de NT). Outra explicação pode estar relacionada aos taninos condensados presentes em algumas leguminosas, que podem se ligar a proteína e diminuir sua digestibilidade (Makkar, 2003). Castro-Montoya e Dickhoefer (2018) em uma meta-análise avaliando o efeito da inclusão de diversas leguminosas na alimentação de ruminantes, também atribuíram a baixa digestibilidade total da proteína a esses constituintes. Além disso, os autores encontraram correlação negativa entre os

teores de FDN da forragem e a digestibilidade da proteína bruta, o que confirma os resultados encontrados no nosso estudo, em que a StS apresentou maior teor de FDN (647 vs. 555).

A exemplo do observado no nosso estudo, Da Silva et al. (2017) e Da Silva et al. (2016) também observaram menor digestibilidade da proteína bruta em dietas contendo StS comparadas aquelas com SM em dietas de bovinos de corte na fase de terminação. No entanto, Souza et al. (2014) não encontraram diferenças na digestibilidade total da PB com o aumento da proporção de StS em dietas de bovinos de corte na fase de terminação.

4.2. Fermentação ruminal

O aumento do suprimento de PDR geralmente está associado ao aumento de nitrogênio amoniacal no rúmen (Olmos Colmenero e Broderick, 2006; Pilachai et al., 2012). No nosso estudo, os teores de PDR das dietas contendo SM foram maiores que aqueles das dietas contendo StS. No entanto, essa diferença de aproximadamente 2.6% não foi suficiente para causar efeito nas concentrações de nitrogênio amoniacal. Savari et al. (2017) avaliaram o efeito da variação da relação PDR:PNDR em dietas para novilhas leiteiras e não encontraram aumentos no teor N-NH₃ no rúmen com o aumento de PDR da dieta. Os autores também associaram a ausência de efeito na fermentação ruminal devido as pequenas diferenças na relação PDR:PNDR das dietas. No entanto, a concentração de amônia média encontrada nesse estudo (7 mg/dL) está abaixo de 8,0 mg/dL, valor preconizado por Detmann et al. (2009) como mínimo necessário para não comprometer a digestibilidade da fibra e manter o equilíbrio de entrada e saída de nitrogênio em condições tropicais.

4.3. Utilização do nitrogênio

O consumo de nitrogênio foi similar entre as dietas a base de StS. No entanto, as dietas contendo SM, apresentaram maior valor com o C2. Em razão desse comportamento e da similaridade entre as dietas nas excreções de nitrogênio na urina e nas fezes, as dietas contendo StS apresentaram menor quantidade de nitrogênio retido (14,73g vs. 29,17g). Embora a dieta contendo SM e o C2 tenha proporcionado maior consumo de N, o balanço de nitrogênio não diferiu entre as dietas a base de SM. A

ausência de efeito nas excreções de nitrogênio possivelmente ocorreu porque as dietas foram isonitrogenadas.

Os valores encontrados para as dietas a base de StS foram semelhantes aos obtidos por Da Silva et al. (2016), de 15.1g, para dietas com 11% de PB a base de StS. Ao contrário do observado no presente estudo, esses autores não observaram diferenças no balanço de nitrogênio entre as dietas compostas por StS e SM.

A produção de proteína microbiana foi similar entre as dietas contendo StS, mas para os animais alimentados com SM, o concentrado C2 proporcionou maior valor, provavelmente devido ao melhor balanço de N degradado no rúmen desta dieta.

A eficiência microbiana das dietas contendo StS apresentou média de 88,75 g PB/kg NDT, valor abaixo do preconizado por Valadares filho et al. (2010) e pelo NRC (1996), de 120 g PB/Kg NDT e 130 g PB/Kg NDT, respectivamente. Entretanto, a eficiência microbiana encontrada para a SM com o C2, de 117,87 g PB/Kg NDT, está próximo ao preconizado por Valadares filho et al. (2010).

4.4. Consumo dos nutrientes, digestibilidade total e desempenho (Experimento 2)

O efeito nos consumos de MS, MO e PB demonstraram que as silagens apresentaram o mesmo comportamento quando foi utilizado o mesmo concentrado. A utilização do C2 possibilitou maiores consumos de MS, MO e PB, o que pode evidenciar melhor balanceamento entre proteína bruta e energia (PB:MOD) dessas dietas. As dietas contendo o C1 proporcionaram em média uma relação PB:MOD de 196.8 g de PB/kg MOD, valor abaixo do proposto por Reis et al. (2016), de 210-220 g PB/kg MOD, como adequado para a otimização do consumo voluntário, indicando excesso de energia. O excesso de energia pode limitar o consumo devido a maior produção de calor e a redução da eficiência de utilização da energia metabolizável (Popi e McLennan, 1995; De Oliveira Franco et al., 2017). As dietas com o C2 apresentaram em média 204.14 g PB/Kg MOD, próximo ao limite inferior dos valores reportados por Reis et al. (2016).

O efeito da SM sobre o consumo de CNF reflete o maior teor desse nutriente nessa silagem, e o mesmo ocorre para o consumo de FDNi nas dietas a base de StS. No entanto, diferente do que ocorreu no primeiro experimento, também houve efeito do concentrado utilizado sobre o consumo de FDNi. O C2 proporcionou os maiores consumos, que pode ser atribuído ao maior consumo de matéria seca obtidos por essas dietas, bem como a participação da FDNi do farelo de soja.

Os efeitos encontrados para as variáveis GMD e GMDC, quando fornecido o C2, foram consequência do maior consumo de nutrientes, pois seguiram o mesmo comportamento. Embora os resultados no desempenho animal com a utilização de leguminosas do gênero *Stylosanthes* tenham sido em decorrência do aumento no consumo (Cameron et al., 1993; Da Silva et al., 2016), no presente estudo não foram observadas diferenças nos consumos entre as dietas a base de StS e SM, e, possivelmente, devido à ausência de efeito na digestibilidade, as silagens proporcionaram similares efeitos nos GMD e GMDC.

Os resultados da digestibilidade total dos nutrientes corroboram com os encontrados para o primeiro experimento. Também, é importante ressaltar que, quando utilizado o C2 juntamente com a StS, não foi necessária a inclusão de ureia:SA para a correção do teor de proteína bruta da dieta. Portanto, o balanceamento de rações contendo o C2, similar ao utilizado nesse estudo, demandaria maiores quantidades de farelo de soja em dietas contendo SM, e por consequência, poderia aumentar os custos com o concentrado.

4.5. Avaliação bioeconômica

A silagem de estilosantes pode ser utilizada de forma estratégica na alimentação de bovinos de corte na fase de terminação devido ao elevado preço dos concentrados proteicos, que tradicionalmente contém farelo de soja. O menor custo de produção por tonelada de proteína bruta quando comparada a silagem de milho e o menor custo de produção total em relação à aquisição do farelo de soja, demonstra o potencial da silagem de estilosantes cv. Campo na terminação de bovinos de corte sem prejudicar o desempenho dos animais, uma vez que a eficiência alimentar no presente estudo foi semelhante entre as dietas.

5. CONCLUSÃO

Silagem de *Stylosanthes* cv. Campo Grande constituindo 50% da matéria seca total da dieta não altera os GMD, GMDC e EA em bovinos de corte na fase de terminação, podendo substituir a silagem de milho, sem alterar a fermentação ruminal. No entanto, a utilização do concentrado contendo o farelo de soja é necessária para atender de forma adequada as exigências dos animais.

REFERÊNCIAS

- Association of Official Analytical Chemistry (AOAC), 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. AOAC International, Arlington.
- Barbosa, A.M., Valadares, R.F., Valadares Filho, S.C., Pina, D.S., Detmann, E., Leão, M.I., 2011. Endogenous fraction and urinary recovery of purinederivatives obtained by different methods in Nellore cattle. *J. Anim. Sci.* 89, 510–519.
- Batista, E. D., Detmann, E., Titgemeyer, E. C., Valadares Filho, S. C., Valadares, R. F. D., Prates, L. L., Rennó, L. N., Paulino, M. F. 2016. Effects of varying ruminally undegradable protein supplementation on forage digestion, nitrogen metabolism, and urea kinetics in Nellore cattle fed low-quality tropical forage. *Journal of animal Science.* 94, 201-216.
- Cameron, D. F., C. P. Miller, L. A. Edey, and J. W. Miles. 1993. Advances in research and development with *Stylosanthes* and other tropical pasture legumes. *Proc. XVII Int. Grassl. Congr.* p. 2109.
- Castro-Montoya, J., Dickhoefer, U., 2018. Effects of tropical legume silages on intake, digestibility and performance in large and small ruminants: A review. *Grass and Forage Science.* 73, 26-39.
- Chaney, A.L., Marbach, E.P., 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8, 130–132.
- Chen, X. B., Gomes, M. J., 1992. Estimation of Microbial Protein Supply to Sheep and Cattle Based on Urinary Excretion of Purine Derivatives an Overview of the Technical Details. International Feed Resource Unit, Rowett Research Institute, Aberdeen, UK, 2–20, Occasional Publication.
- Cummins, K. A., Papas, A. H. 1985. Effect of isocarbon 4 and isocarbon 5 volatile fatty acids on microbial protein synthesis and dry matter digestibility in vitro. *Journal of Dairy Science.* 68, 2588–2595.
- Da Silva, L. D., Pereira, O. G., Da Silva, T. C., Valadares Filho, S. C., Ribeiro, K. G., 2016. Effects of silage crop and dietary crude protein levels on digestibility,

- ruminal fermentation, nitrogen use efficiency, and performance of finishing beef cattle. *Animal Feed Science and Technology*. 220, 22-33.
- Da Silva, T. C., Pereira, O. G., Martins, R. M., Agarussi, M. C. N., Da Silva, L. D., Rufino, L. D., Valadares Filho, S. C., Ribeiro, K. G., 2017. Stylosanthes cv. Campo Grande silage and concentrate levels in diets for beef cattle. *Animal Production Science*. 58 (3), 539-545.
- Da Silva, J. S., Ribeiro, K. G., Pereira, O. G., Mantovani, H. C., Cecon, P. R., Pereira, R. C., Silva, J. L. 2018. Nutritive value and fermentation quality of palisadegrass and stylo mixed silages. *Anim Sci J*. 89 (1), 72-78.
- De Oliveira Franco, M., Detmann, E., Valadares Filho, S. C., Batista, E. D., Rufino, L. M. A., Barbosa, M. M., Lopes, A. R. 2017. Intake, digestibility, and rumen and metabolic characteristics of cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogen and different levels of starch. *Asian-Australas J Anim Sci*. 30 (6) 797-803.
- Detmann, E., Paulino, M. F., Mantovani, H. C., Valadares Filho, S. C., Sampaio, C. B., Souza, M. A., Lazzarini, I., Detmann, K. S. C. 2009. Parameterization of ruminal fiber degradation in low quality tropical forage using Michaelis-Menten kinetics. *Livest. Sci*. 126, 136–146.
- Detmann, E., Valadares Filho S. C., 2010. On the estimation of non-fibrous carbohydrates in feeds and diets. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo*. 62 (4), 980-984.
- Fernandes, C. D., Grof, B., Chakraborty, S., Verzignassi, J. R., 2005. Estilosantes Campo Grande in Brazil: a tropical forage legume success story. *Tropical Grasslands*. 39 (4), 223-224.
- Fujihara, T., Ørskov, E. R., Reeds, P. J., 1987. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. *J. Agric. Sci*. 109, 7–12.
- Licitra, G., Hernandez, T. M., Van Soest., P. J., 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 57, 347-358.

- Liu, Q., Wang, C., Guo, G., Huo, W. J., Zhang, Y. L., Pei, C.X., Zhang, S. L., Wang, H. 2018. Effects of branched-chain volatile fatty acids supplementation on growth performance, ruminal fermentation, nutrient digestibility, hepatic lipid content and gene expression of dairy calves. *Animal Feed Science and Technology*. 237, 27-34.
- Maikhuri, R.K., Dangwal, D., Negi, S. V., Rawat, L. S., 2016. Evaluation of symbiotic nitrogen fixing ability of legume crops in Central Himalaya, India. *Rhizosphere*. 1, 26–28.
- Makkar, H. P. S., 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*, 49(3), 241–256.
- Mertens, D. R., 2002. Gravimetric determination of amylase treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. *Journal of AOAC International*. 85 (6), 1217-1240.
- NRC, 1996. *Nutrient Requirements of Beef Cattle*, 7th ed. National Academy of Sciences, Washington, DC, USA.
- Olmos Colmenero, J. J. e Broderick, G. A. 2006. Effect of dietary crude protein concentration on milk production and nitrogen utilization in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89, 1704–1712.
- Pereira, O. G., Oliveira, A. S., Ribeiro, K. G. 2007. Recurso forrageiro alternativo – viabilidade econômica de forragens conservadas. In: VI Simpósio de Forragicultura e Pastagens: Tema em Evidência - Relação Benefício Custo. Eds.: Evan-geista, A. R. et al. Lavras, MG. Anais p. 199-309.
- Pereira, O. G., Oliveira, A. S., Ribeiro, K. G. 2018. Conservação de forragem – Uma opção para gado de corte. In: XIII Jornada NESPro - Uso de tecnologias na pecuária de corte do passado ao presente, Porto Alegre. Anais. P. 53-61.
- Pilachai, R., Schonewille, J. Th., Thamrongyoswittayakul, C., Aiumlamai, S., Wachirapakorn, C., Everts, H., Hendriks, W. H. 2012. The effects of high levels of rumen degradable protein on rumen pH and histamine concentrations in dairy cows. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 96 (2), 206-213.

- Poppi, D. P., McLennan, S. R., 1995. Protein and energy utilization by ruminants at pasture. *J. Anim. Sci.* 73, 278–290.
- Reis, W. L. S., Detmann, E., Batista, E. D., Rufino, L. M. A., Gomes, D. I., Bento, C. B. P., Mantovani, H. C., Valadares Filho, S. C., 2016. Effects of ruminal and post-ruminal protein supplementation in cattle fed tropical forages on insoluble fiber degradation, activity of fibrolytic enzymes, and the ruminal microbial community profile. *Animal Feed Science and Technology*. 218, 1-16.
- Rufino, L. M. A., Detmann, E., Gomes, D. I., Reis, W. L. S., Batista, E. D., Valadares Filho, S. C., Paulino, M. F. 2016. Intake, digestibility and nitrogen utilization in cattle fed tropical forage and supplemented with protein in the rumen, abomasum, or both. *Journal of animal science and biotechnology*. 1, 1-10.
- Ružić-Muslić, D., Petrović, M. P., Petrović, M. M., Bijelić, Z., Caro Petrović, V., Maksimović, N., Mandić, V., 2014. Protein source in diets for ruminant. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 30 (2), 175-184.
- Savari, M., Khorvash, M., Amanlou, H., Ghorbani, G. R., Ghasemi, E., Mirzaei, M. 2017. Effects of rumen-degradable protein: rumen -undegradable protein ratio and corn processing on production performance, nitrogen efficiency, and feeding behavior of Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101, 1–12.
- Silva, L. F. C., Valadares Filho, S. C., Chizzotti, M. L., Rotta, P. P., Prados, L. F., Valadares, R. F. D., Zanetti, D., Braga, J. M. S., 2012. Creatinine excretion and relationship with body weight of Nellore cattle. *Rev. Bras. Zootec.* 41, 807–810.
- Souza, W. F., Pereira, O. G., K. Ribeiro, K. G., Santos, S. A., Valadares Filho, S. C., 2014. Intake, digestibility, nitrogen efficiency, and animal performance of growing and Stylosantes + Stylosantes capitata finishing beef cattle fed warm-season legume (Stylosantes + Stylosantes capitata) silage replacing corn silage macrocephala. *J ANIM SCI.* 92 (9), 4099-4107.
- Valadares Filho, S. C., Marcondes, M. I., Chizzotti, M. L., Paulino, P. V. R., 2010. *Nutrient Requirements of Zebu Beef Cattle—BR CORTE*. Suprema Grafica Ltda, Viçosa, MG, Brazil. Available online www.simcorte.com.br.

- Valadares Filho, S. C., Machado, P. A. S., Chizzotti, M. L. 2018. CQBAL 3.0. Brazilian feed composition tables for ruminants. cqbal.agropecuaria.ws/webcqbal/en/index.php.
- Valente, T. N. P., Detmann, E., Sampaio C. B., 2015. Review: Recent advances in evaluation of bags made from different textiles used in situ ruminal degradation. *Can. J. Anim. Sci.* 95(4), 493 - 498.
- Vieira, R. A. M., Pereira, J. C., Malafaia, P. A. M., Queiroz, A. C. 1997. The influence of elephant-grass (*Pennisetum purpureum* Schum. Mineiro variety) growth on the nutrient kinetics in the rumen. *Animal Feed Science Technology.* 67, 151-161.
- Wang, C., Liu, Q., Guo, G., Huo, W. J., Wang, Y. X., Zhang, Y. L., Pei, C. X., Zhang, S. L. 2018. Effects of fibrolytic enzymes and isobutyrate on ruminal fermentation, microbial enzyme activity and cellulolytic bacteria in pre- and post-weaning dairy calves. *Animal Production Science.*
- Yang, S. D., Liou, C. H., Liu, F. G. 2002. Effects of dietary protein level on growth performance, carcass composition and ammonia excretion in juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture.* 213, 363-372. 2002.

CONCLUSÕES GERAIS

A estirpe de bactéria láctica 14.17 (*Lactobacillus plantarum*) apresenta características promissoras para a utilização como inoculante na produção de silagens de alfafa em condições tropicais.

A silagem de *Stylosanthes* cv. Campo Grande pode ser utilizada na alimentação de bovinos de corte sem comprometer o GMD, GMDC e EA, no entanto, recomenda-se a utilização de fontes de proteína verdadeira no concentrado de modo a fornecer uma dieta balanceada.