

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DESEMPENHO DE NOVILHAS LEITEIRAS ALIMENTADAS  
COM SILAGEM DE MILHO TRATADA COM ÁCIDO  
PIPERONÍLICO

Autora: Ariane de Freitas Silva  
Orientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Julho-2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DESEMPENHO DE NOVILHAS LEITEIRAS ALIMENTADAS  
COM SILAGEM DE MILHO TRATADA COM ÁCIDO  
PIPERONÍLICO

Autora: Ariane de Freitas Silva  
Orientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel

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

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Julho-2024

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

S586d Silva, Ariane de Freitas  
Desempenho de novilhas leiteiras alimentadas com silagem de milho tratada com ácido Piperonílico / Ariane de Freitas Silva. -- Maringá, PR, 2024.  
59 f. : tabs.

Orientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2024.

1. Nutrição animal - Novilhas Nelore. 2. Digestibilidade. 3. Inibidor enzimático. 4. Lignina. I. Daniel, João Luiz Pratti, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 23.ed. 636.2085



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DESEMPENHO DE NOVILHAS LEITEIRAS ALIMENTADAS  
COM SILAGEM DE PLANTA DE MILHO TRATADA  
COM ÁCIDO PIPERONÍLICO

Autora: Ariane de Freitas Silva  
Orientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção  
Animal

APROVADA em 26 de julho de 2024.



---

Prof. Dr. Henrique Leal Perez



---

Prof. Dr. Wanderley Dantas dos  
Santos



---

Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel  
Orientador

*“Por isso não desanimamos. Embora exteriormente estejamos a desgastar-nos, interiormente estamos sendo renovados dia após dia,*

*Pois os nossos sofrimentos leves e momentâneos estão produzindo para nós uma glória que pesa mais do que todos eles.”*

*(2 Coríntios 4:16-17)*

*A Deus, criador da vida e fonte inesgotável de sabedoria plena, aos familiares e amigos pelo incentivo e compreensão.*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pelas oportunidades e por não me deixar desistir nos momentos difíceis;

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

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

Ao meu orientador, Professor Dr. João Luiz Pratti Daniel, pelo seu apoio e dedicação durante todos esses anos, sempre acreditando no meu potencial e sendo um guia para o meu desenvolvimento profissional.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pelos ensinamentos.

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

À equipe da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), por ter sido essencial na realização deste trabalho a nível de campo.

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

Aos amigos do Grupo de Pesquisa em Silagem e Feno (GESF), em especial meus companheiros de pós-graduação, Janaina, Matheus, Leonardo e Sara. Aos membros do grupo em nível de graduação, em especial, Alisson, Nailah, Emily, Gabriela, Diogo, Pamela, Regina, Ana Carolina, Matheus e Ismael por todo apoio, aprendizado, choros e risadas durante essa jornada.

Às minhas colegas, Ana Flávia Brunheira Pereira e a Janaina Macieiro Bragatto, em especial, que foram essenciais na execução deste trabalho.

Ao meu querido irmão, Alisson de Freitas Silva, que sempre foi meu maior incentivador e, à sua maneira, sempre se orgulhou de mim e confiou no meu trabalho. Agradeço profundamente por sua companhia nos finais de semana nos serviços na fazenda e laboratório, faça chuva, faça sol. Minha gratidão por tudo é imensurável.

A minha família, em especial aos meus pais Valfredo Gonçalves da Silva e Valdevina Feliciano de Freitas Gonçalves, por serem minha base, meus maiores exemplo de vida, por sempre me apoiarem, acreditarem no meu potencial e incentivarem durante toda minha vida. Além dos meus pais, os meus irmãos, Alisson e Alif, que sempre foram minha base, e qual quero ser referência um dia.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

## BIOGRAFIA

ARIANE DE FREITAS SILVA, filha de Valdevina Feliciano de Freitas e Valfredo Gonçalves da Silva, nasceu na cidade de Birigui, São Paulo, no dia 28 de abril de 1997. Em março de 2015, iniciou no curso de graduação em Zootecnia, pela Universidade Estadual de Maringá. Em maio de 2021, obteve o título de “Zootecnista” pela mesma instituição. Em março de 2022 iniciou no curso de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, em nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, realizando estudos sobre Nutrição de Ruminantes. Em julho de 2024, submeteu-se à banca examinadora para defesa da dissertação.

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
INTRODUÇÃO.....	1
1.0 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
1.1 PAREDE CELULAR VEGETAL.....	2
1.2 TECIDOS VEGETAIS.....	4
1.2.1 EPIDERME.....	4
1.2.2 MESÓFILO.....	5
1.2.3 BAINHA DO FEIXE VASCULAR (BFV).....	6
1.2.4 TECIDO VASCULAR.....	6
1.2.5 PARÊNQUIMA.....	7
1.2.6 COLÊNQUIMA.....	7
1.2.7 FIBRAS DO FLOEMA.....	7
1.2.8 ECLERÊNQUIMA.....	8
2.0 FIBRA.....	8
2.1 COMPONENTES DA FIBRA.....	8
2.1.1 CELULOSE.....	8
2.1.2 HEMICELULOSE.....	10

2.1.3 LIGNINA.....	10
2.1.4 PROTEÍNAS.....	11
3.0 COMPONENTES RELACIONADOS A DIGESTÃO DA FIBRA.....	11
3.1 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	13
3.2 LIGNINA.....	13
4.0 ESTRATÉGIAS PARA MELHORAR A DIGESIBILIDADE DA FIBRA.....	16
4.1 ÁCIDO PIPERONÍLICO.....	17
5. REFERÊNCIAS.....	19
II DESEMPENHO DE NOVILHAS LEITEIRAS ALIMENTADAS COM SILAGEM DE MILHO TRATADA COM ÁCIDO PIPERONÍLICO.....	29
RESUMO.....	30
INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
<i>Ensilagem</i> .....	32
<i>Avaliações nas silagens</i> .....	33
<i>Avaliações nos animais</i> .....	34
<i>Composição química e digestibilidade in vitro</i> .....	35
<i>Análise estatística</i> .....	35
RESULTADOS.....	36
DISCUSSÃO.....	36
CONCLUSÃO .....	38
REFERÊNCIAS.....	38

## LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Composição das dietas experimentais.....	42
TABELA 2. Características das forragens e silagens de milho.....	43
TABELA 3. Efeito do ácido piperonílico no consumo e digestibilidade de nutrientes de novilhas leiteiras em crescimento.....	44
TABELA 4. Digestibilidade aparente no trato total e parâmetros sanguíneos de novilhas leiteiras alimentadas com silagem de milho tratada com ácido piperonpilico.....	45

## RESUMO

O objetivo do trabalho é avaliar o desempenho de novilhas leiteiras, alimentadas com silagem de planta inteira de milho tratada com ácido piperonílico (PIP). O PIP é um inibidor da enzima cinamato-4-hidroxilase da via dos fenilpropanoides, capaz de regular a biossíntese dos monômeros de lignina e modificar a estrutura deste polímero presente na parede celular das plantas de milho para ensilagem. Vinte e quatro novilhas holandesas foram alojadas em baias individuais com piso de concreto (2 × 3 m) com cocho e bebedouro. O período de confinamento foi de 67 dias, sendo 7 dias de adaptação às instalações e 60 dias de comparação das dietas experimentais. Os consumos de matéria seca (MS), fibra em detergente neutro (FDN) e FDN indigestível foram semelhantes entre os tratamentos. A adição do PIP na cultura do milho causou aumento na digestibilidade aparente no trato total da FDN, conseqüentemente aumentando a digestibilidade aparente de MS. Em conclusão, o PIP não foi capaz de alterar o consumo e o ganho de peso de novilhas leiteiras em relação ao tratamento controle, embora tenha aumentado a digestibilidade aparente da fibra no trato total. Mais estudos são necessários para entender os mecanismos de ação do PIP em plantas de milho destinadas à silagem e as conseqüências no desempenho de animais.

**Palavras-chave:** digestibilidade, fibra, lignina, inibidor enzimático.

## ABSTRACT

The objective of this study is to evaluate the performance of dairy heifers fed whole-plant corn silage treated with piperonyl acid (PIP). PIP is an inhibitor of the cinnamate-4-hydroxylase enzyme in the phenylpropanoid pathway, capable of regulating the lignin monomers biosynthesis and modifying the structure of this polymer present in the cell wall. Twenty-four Holstein heifers were housed in individual pens with concrete floors (2 × 3 m) with a feedbunk and water bowl. The feeding period lasted 67 days, with 7 days for facilities adaptation and 60 days for comparison of experimental diets. Dry matter (DM) intake, neutral detergent fiber (NDF), and indigestible NDF were similar between treatments. PIP increased NDF the total-tract apparent digestibility, consequently increasing the DM apparent digestibility. In conclusion, PIP was not able to alter the intake and weight gain of dairy heifers compared to the control treatment, although it increased NDF total-tract apparent digestibility. Further studies are necessary to unveil the PIP action mechanisms in corn silage and its consequences for animal performance.

**Keywords:** digestibility, fiber, lignin, enzyme inhibition.

## INTRODUÇÃO

Dentre as forragens conservadas, a silagem de planta inteira de milho (*Zea mays* L.) é a mais utilizada nos sistemas de produção de ruminantes no Brasil (Bernardes e Rêgo, 2014; Oliveira e Millen, 2014) e no mundo (Wilkinson e Toivonen, 2003). A cultura do milho possui alta produtividade, alto teor de energia e ótima ensilabilidade, comparativamente a outras fontes de forragem, resultando em excelente potencial para produzir leite e carne.

A maior parte da planta de milho é constituída por fibra em detergente neutro (FDN) e amido. Os grãos de milho têm participação importante da planta inteira de milho, com cerca de 65% de energia, o conteúdo celular da fração vegetativa contribui com cerca de 10% e a fibra (FDN) com 25%, dependendo da composição da planta (Mahanna *et al.*, 2014). Então, quanto maior a proporção de grãos e quanto maior a digestibilidade da FDN, maior o valor nutricional da silagem. Além de alterar a disponibilidade de energia por kg de MS, a digestibilidade da FDN também tem função de regulação do consumo de matéria seca (CMS). Em revisão, Oba e Allen (2000) descobriram que o aumento de uma unidade percentual na digestibilidade da FDN de forragem (*in vitro* ou *in situ*) foi associado ao aumento de 0,17 kg de CMS e 0,25 kg de leite corrigido para 4% de gordura. É provável que o incremento da digestibilidade da FDN de forragem promova menor enchimento ruminal, possibilitando maior ingestão de nutrientes por reduzir a regulação física do CMS e, conseqüentemente, maior desempenho das vacas leiteiras (Allen, 2000).

Há décadas, a lignina tem sido reconhecida como o principal impedimento à digestão de fibra (Van Soest, 1994). A lignina é um composto fenólico que atua como barreira física contra o ataque dos microrganismos sobre a parede celular vegetal, tem função de sustentação e transporte de água e nutrientes. Sua ligação, principalmente com os polissacarídeos da parede

celular (Halpin, 2019), deixa-os indisponíveis para degradação ruminal (Raffrenato *et al.* 2017). A molécula da lignina é formada por hidroxicinamil álcoois (monolignóis): p-cumaril, coniferil e sinapil, correspondendo às unidades monoméricas H, G e S, respectivamente, formados na via dos fenilpropanoides. A lignina envolve as microfibrilas celulósicas e pode formar ligações covalentes com a hemicelulose, conferindo proteção à degradação da parede celular (Chiang, 2006).

O ácido ferúlico é um componente-chave na interligação dos polímeros da parede celular, desempenhando papel estrutural, assim como a lignina, podendo também interferir na digestibilidade da parede celular; O ácido ferúlico pode inibir a atividade de hidrolases ou como intermediário na síntese dos monômeros da lignina. Estudos de digestão *in vitro* sugerem que a digestibilidade da parede celular e o grau de interligação da parede com o ácido ferúlico são negativamente correlacionados (Grabber *et al.*, 1998). Desta forma, reduzir a disponibilidade do ácido ferúlico na parede celular utilizando inibidores químicos específicos da via dos fenilpropenoides pode contribuir para a melhoria da digestibilidade da biomassa lignocelulósica (dos Santos *et al.*, 2008).

O PIP é um inibidor da enzima cinamato-4-hidroxilase (C4H) da via dos fenilpropanoides, que poderia regular a biossíntese dos monômeros de lignina e modificar a estrutura deste polímero presente na parede celular das plantas de milho para ensilagem, facilitando o ataque de hidrolases (dos Santos *et al.*, 2008). Uma das estratégias com potencial para reduzir o impacto negativo da lignina na digestibilidade da fibra de forragens é a aplicação do ácido piperonílico (PIP).

Estudos realizados, aplicando o PIP a partir da aspersão foliar em plantas jovens de milho, demonstraram resultados positivos para o aumento da sacarificação da biomassa através das análises de digestibilidade enzimática. A sacarificação foi realizada por períodos de 4 h e 24 h utilizando celulases de um coquetel celulolítico comercial (Novozymes® - NS 22086). Após 30 d do tratamento com PIP frente ao controle, houve aumento na sacarificação de 27% e 10%, respectivamente, em colmo e folhas (W.D. Santos, dados não publicados). No entanto, não existem estudos de campo avaliando os efeitos do PIP sobre a composição e o valor alimentício da silagem de planta inteira de milho para animais.

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Parede celular vegetal

A principal característica da célula vegetal é a presença de parede celular. A parede celular vegetal é formada por polímeros e compostos secretados pela célula e que são interligados de forma organizada através de ligações covalente e não covalentes (Taiz e Zieger, 2002). Em geral a parede celular é composta pela combinação de polissacarídeos, proteínas, compostos fenólicos e sais minerais. Segundo Buckeridge (2010), a parede celular é uma matriz altamente ordenada e dinâmica, pode se tornar mais rígida quando atacada ou mais frouxa durante o crescimento ou conforme as necessidades da planta.

A parede celular vegetal pode ser classificada como primária ou secundária. A primária é formada principalmente de polissacarídeos como celulose, hemicelulose e pectina e a secundária que se forma após a interrupção do crescimento celular e muitas vezes está impregnada de lignina (Cheng *et al.*, 1979).

A parede celular primária é depositada durante o crescimento celular e deve apresentar característica mecanicamente estável e ao mesmo tempo flexível para permitir a expansão das células, evitando a ruptura. Nas paredes primárias, as microfibrilas de celulose são incorporadas em uma matriz altamente hidratada. As células com parede primária são separadas por uma lamela média, de material amorfo e não lignificado. Consequentemente apresentam menor resistência tanto para digestão, quanto para alteração física. Em leguminosas, em particular, a lamela média possui alto teor de substâncias pécticas e é facilmente digerida por bactérias ruminais (Cheng *et al.*, 1979). As células que desenvolvem apenas a parede primária, geralmente são importantes metabolicamente e fornecem rigidez tecidual por meio das propriedades de turgor.

A parede celular secundária é depositada dentro da primária, após a conclusão da expansão celular. É composta por três camadas S1, S2 e S3, compreendidas de fora para dentro, que se diferenciam pela ultraestrutura e orientação distinta das microfibrilas de celulose (Harris, 1990).

Vários tipos de células de gramíneas tornam-se lignificadas durante a maturação, enquanto nas leguminosas, o xilema é o principal tecido lignificado (Wilson, 1993). As paredes secundárias lignificadas das células das gramíneas são digestíveis quando os microrganismos têm acesso a essas paredes. As paredes primárias e lamela média não são lignificadas, entretanto, são digeridas rapidamente no rúmen (Harbers *et al.*, 1981). Em contraste, as paredes

secundárias lignificadas do xilema e das células traqueais nas leguminosas não são digeríveis (Wilson e Mertens 1995). A lignificação nessas células das leguminosas é muito maior do que nas gramíneas, e pode ser a razão pela qual as paredes secundárias das leguminosas não podem ser digeridas.

## **1.2 Tecidos vegetais**

### **1.2.1 Epiderme**

As células da epiderme formam uma camada contínua que reveste a superfície do corpo vegetal em estágio primário. Essas células apresentam características diversas relacionadas com sua posição superficial. A característica mais importante das células epidérmicas, da parte aérea da planta, é a presença de cutina na parte celular externa que fornece proteção mecânica e tem relação com a restrição de transpiração e aeração. Em contato com o meio ambiente apresentam parede mais espessa, lignificada, coberta por cutina e cutícula, tornando mais indigestível e atuando como barreira física à colonização por microrganismos do rúmen e conseqüentemente alguns patógenos, enquanto as paredes mais internas da epiderme é mais digestível (Akin *et al.*, 1983).

As células da epiderme abaxial e adaxial são células vivas e vacuoladas e podem conter várias substâncias, como taninos, mucilagem, cristais e pigmentos. (Alquini *et al.*, 2006). As células epidérmicas tornam-se espessas, lignificadas e cobertas de cera e cutícula, mais comum na haste da planta, epiderme abaxial e na bainha, quando comparada a epiderme adaxial e a folha. (Wilson, 1993). A superfície externa é impermeável a digestão e penetração microbiana (Monson *et al.*, 1972), com exceção por meio dos estômatos ou rupturas causadas pela mastigação e apreensão, sendo mais importante para a epiderme das hastes que se tornam espessas e lignificadas com aumento da maturidade (Wilson, 1993).

A epiderme é revestida pelas células mesofílicas, que são compostas por paredes finas e de fácil quebra e digestibilidade. No grupo de gramíneas, em geral, a epiderme está diretamente ligada a folha do canal vascular e feixes intermediários, por meio das células de esclerênquima de parede espessa diretamente para o feixe vascular e indiretamente para células do feixe de parede espessa, seguindo para o tecido vascular (Wilson e Hattersley, 1989).

O motivo pelo qual a epiderme das gramíneas tropicais não é facilmente quebrada ou dividida é que as células longas, na visão paradérmica, são 'curvadas', formando conexões fortes em formato de 'cauda de pombo' com as células adjacentes, de modo que a quebra ocorre pela divisão das paredes celulares, e não pela separação da lamela média (Wilson *et al.*, 1989).

A epiderme nas leguminosas, esta aderida ao mesófilo de forma frouxa, da mesma forma nas gramíneas C3, facilitando o rompimento pela mastigação e, conseqüentemente o acesso dos microrganismos. Já nas gramíneas C4 a epiderme é firmemente fixada aos vasos vasculares, o que dificulta o desprendimento da epiderme do restante da folha, causando maior resistência da planta a forças mecânicas e danos químicos (Wilson e Hattersley, 1989).

As células epidérmicas não apresentam espaços intracelulares, estando associados à função na planta, que é limitar a perda de água. O tecido epidérmico pode conter vários tipos de células com diferentes funções, como: células-guarda dos estômatos, silicosas, suberosas, buliformes e ainda podem apresentar tricomas. As células buliformes podem ocupar grande parte na lâmina foliar, refletindo negativamente na composição química da forragem, pois apresentam poucos nutrientes e causam lenta degradação no rúmen (Esaú, 1977).

### 1.2.2 Mesófilo

As células do mesófilo apresentam apenas parede celular primária, com espessura de 0,1 a 0,2  $\mu\text{m}$  e não são lignificadas (Cheng *et al.*, 1980). Akin *et al.* (1973) e Hanna *et al.* (1973) observaram que as bactérias do rúmen digerem primeiro as células do mesófilo e na maioria das vezes sem o ataque bacteriano, sendo então indicativo de alta digestibilidade destas células. Nas lâminas foliares das espécies forrageiras C4 de diferentes cultivares, a proporção de células do mesófilo é variável, podendo apresentar níveis de 45%, já nas gramíneas C3 apresentam a cerca de 60% e as leguminosas possuem de 70 a 90%. O desaparecimento dessa porção no rúmen é rápido, e leva a digestão completa após 12 a 24 horas de incubação (Akin *et al.*, 1983; Magai *et al.*, 1994).

Nas gramíneas C3 (10-35%) e nas leguminosas (41-51%) os espaços intracelulares são bem maiores em relação as C4 (3-12%), e as células aparecem bem compactadas (Byott, 1976). O mesófilo nas gramíneas C4 mesmo que sofram rápida degradação são mais lentamente digeridos que nas espécies C3, devido ao forte adensamento celular na C4.

### 1.2.3 Bainha do feixe vascular

A bainha do feixe vascular consiste em um grupo de células que contêm cloroplastos que circundam o tecido vascular das lâminas foliares de gramíneas C4. As gramíneas de metabolismo C3 também possuem uma bainha ao redor dos feixes vasculares, todavia essa bainha é pouco desenvolvida, pobre em cloroplasto e é facilmente degradada e digerida pela microbiota ruminal. Nas gramíneas C4, a digestão da bainha do feixe vascular é considerada lenta ou não digerida por completo, devido a parede celular espessada, com isso dificulta a entrada dos microrganismos ruminais aos nutrientes no interior das células, que contêm mais de 50% das reservas de carboidratos e proteínas da lâmina foliar (Wilson, 1994).

A bainha do feixe vascular compreende função nutricional importante para as folhas de gramíneas C4, representam parte significativa no volume da folha, sua presença aumenta o volume do feixe vascular em gramíneas C4 em até três vezes em relação ao tecido vascular isolado (Wilson, 1989).

### 1.2.4 Tecido vascular

O tecido vascular em gramíneas é formado por xilema, floema, fibras pericíclicas e bainha de mestoma, no entanto estes apresentam parede espessa e lignificada no caule e nas folhas, sendo consideradas paredes menos digestíveis (Wilson, 1993).

O tecido desempenha função estrutural nas folhas e são responsáveis pelo transporte de água e solutos dissolvidos na corrente transpiratória, além de absorver e transferir os produtos da fotossíntese para outras porções da planta, ou seja, tem função de “dreno morfológico”. Nas leguminosas, também ocorrem as fibras do floema, porém não são lignificáveis (Taiz e Zeiger, 2010).

Nas folhas de gramíneas tropicais possui mais presença de tecido vascular em relação as gramíneas temperadas e leguminosas. Geralmente a proporção de tecido vascular está relacionada com o acúmulo de biomassa da forrageira (Reis *et al.*, 2014). Tecidos como o vascular lignificado e o esclerênquima, formados por células de parede secundária, são os que mais contribuem para a baixa qualidade da forragem (Wilson, 1993).

### 1.2.5 Parênquima

As células do parênquima, são células com diâmetro relativamente grande, porém nas lâminas foliares não são tão significativas como nos caules, que nos caules jovens as células parenquimáticas são relativamente indiferenciadas e altamente digestíveis (Harker e Minson, 1981). Com o desenvolvimento do colmo, estas células desenvolvem espessa parede secundária, formando um rígido anel esclerenquimático ao redor dos feixes vasculares, representando problemas para a digestibilidade.

Nas gramíneas, essas células estão presentes na nervura central, enquanto nas leguminosas aparecem nos vasos, com paredes finas que proporcionam digestibilidade fácil e rápida. Na bainha da folha, caule de gramíneas e leguminosas, e pecíolo, o parênquima é considerável."

Nas plantas C4, as células do parênquima auxiliam dificultando a digestibilidade do caule da bainha, ocupando grande parte, podendo desenvolver parede secundária espessa e lignificada, apenas quando os caules são jovens as células do parênquima podem ser facilmente digeridas (Wilson, 1993).

### **1.2.6 Colênquima**

Esse tecido é composto por paredes celulares primárias ricas em pectina e com espessamentos irregulares. A função é dar sustentação às partes em crescimento de um caule ou folhas. Essas células estão presentes nas leguminosas em feixes compactos em posição hipodérmica abaixo do tecido vascular nas veias principais da folha, como única camada celular sobre a epiderme dos caules e poucas vezes como um aglomerado de células nos cantos dos caules (Wilson, 1993).

### **1.2.7 Fibras do floema**

As fibras do floema desenvolvem-se em leguminosas com a maturidade em parede celular espessa e depositam polissacarídeos rico em pectinas (Engels e Jung, 1998). As fibras não lignificam e poder ser digeridas (Wilson, 1993).

### **1.2.8 Esclerênquima**

Esclerênquima é uma célula de fibra longa e estreita, com parede secundária espessa e torna-se lignificado conforme a maturidade do tecido, principalmente nas C4 por apresentar um tecido de sustentação e ter alta lignificação da lamela média e parede primária, mesmo quando expostas ao líquido ruminal por um longo período, permanecem intactas (Wilson, 1993).

Nas lâminas foliares e nas bainhas de gramíneas apresentam-se mais discretamente, apenas com algumas manchas acima e abaixo dos feixes vasculares e nas margens das folhas e nos caules são mais semelhantes aos feixes vasculares, podendo formar também um anel de tecido ao redor da porção externa do caule, entre a epiderme e o tecido vascular. Já nas plantas de metabolismo C3 aparecem pouco, e influencia menos na digestibilidade e estão presente nas lâminas de gramíneas (Wilson, 1993).

## **2. Fibra**

Na nutrição animal a definição da fibra é intrinsecamente ligada ao método analítico utilizado para a identificação. A definição de fibra é dependente da espécie a qual está tratando. Quimicamente, a fibra é a combinação de compostos e não constitui entidade química purificada. Portanto, a composição química da fibra varia conforme a fonte e de acordo com a metodologia adotada para a análise laboratorial (Mertens, 1997).

### **2.1 Componentes da fibra**

A composição da fibra varia de acordo com o método de determinação, geralmente é composta pela parede celular dos vegetais, incluindo alguns polímeros, como celulose, hemicelulose, lignina, proteína e outros compostos em menor quantidade.

#### **2.1.1 Celulose**

A celulose é o polímero orgânico mais abundante na terra, é o principal constituinte das plantas, seu teor varia de 20 a 40% na base seca das plantas superiores (Van Soest, 1994) e a principal função é a manutenção estrutural.

A celulose é constituída por resíduos de D-glicopirranose conectados por ligações alfa 1-4, criando extensas cadeias lineares com elevado grau de polimerização e peso molecular (Giger-Reverdin, 1995). A unidade de repetição da celulose é o dissacarídeo chamado celobiose (D-

glicose + D-glicose) a cadeia deste dissacarídeo forma a molécula de celulose. Moléculas de celulose interagem entre si por meio de ligações de hidrogênio. Durante a síntese na membrana celular, as celulosas sintases agrupam-se em rosetas hexagonais com 36 proteínas ou mais, formando um feixe de celulosas que é denominado microfibrilas (Verbančič *et al.*, 2018). Essas microfibrilas enrolam-se para formar finas correntes, que por sua vez, podem enrolar-se como fios dentro de um “cabo”, chamada de macrofibrila. As macrofibrilas estão permeadas por uma matriz de moléculas não celulósicas. Muitas destas moléculas são polissacarídeos chamados de hemicelulose, as outras são substâncias pécticas, que quimicamente são semelhantes a hemicelulose (Raven *et al.*, 2001).

Essas cadeias têm a capacidade de unir-se por meio de pontes de hidrogênio, dando origem às microfibrilas de celulose. O nível de cristalinidade dessas fibrilas e a presença de outros polímeros na matriz celulósica são aspectos de grande relevância na avaliação de forragens. Essa interação pode impactar a susceptibilidade da molécula de celulose à hidrólise enzimática microbiana (Van Soest, 1994).

Para ocorrer a síntese de celulose, são utilizados resíduos de glicose de um doador de açúcar de nucleotídeo, chamada de uridina difosfato glicose (UDP-glicose). A fotossíntese fixa carbonos que por sua vez sofrem diversas transformações no citosol até chegar à UDP-glicose e frutose. A glicose usada para síntese de celulose é proveniente da sacarose (glicose + frutose), pela ação da enzima sacarose sintase, que faz a transferência da glicose (via UDP-glicose), proveniente da sacarose, para a cadeia de celulose em desenvolvimento (Verbančič *et al.*, 2018). A sacarose intracelular pode ser catabolizada pela sacarose sintase, produz UDP-glicose, que é substrato para a síntese de celulose e a grande maioria dos precursores de açúcares de nucleotídeos necessários para a síntese de hemicelulose e pectina. Entretanto, hemiceluloses e pectina necessitam de diversos outros açúcares para serem sintetizadas (Verbančič *et al.*, 2018).

As enzimas celulose sintase, nos complexos proteicos da membrana plasmática, desempenham papel importante na síntese das microfibrilas de celulose. As microfibrilas possuem papel de rigidez na parede e proporcionam direção de crescimento, enquanto a hemicelulose fornece capacidade de extensão e crescimento, adicionalmente, a matriz péctica mantém essas cadeias unidas (Braybrook e Jönsson, 2016).

### **2.1.2 Hemicelulose**

A hemicelulose, o segundo polissacarídeo mais prevalente na natureza, está sempre associada à celulose na parede celular das plantas. Trata-se de uma coleção heterogênea de polissacarídeos amorfos, com grau de polimerização consideravelmente menor do que o da celulose (Van Soest, 1994). Nas células maduras, as hemiceluloses, geralmente encontram-se mais ligadas à lignina por meio de ligações covalentes do que outros polissacarídeos, tornando-se menos disponíveis para solubilização. Essas hemiceluloses são classificadas em quatro subgrupos - xilanas, betaglucanas, xiloglicanas e mananas - exibindo diversidade estrutural e sendo nomeadas de acordo com o monossacarídeo predominante (Goodwin e Mercer, 1988).

A hemicelulose, assim como a celulose, desempenha papel estrutural vital e está intimamente ligada à lignina e à celulose, além de unir-se covalentemente à pectina. Conforme indicado por Hendriks e Zeeman (2009), a hemicelulose é composta por ampla gama de polissacarídeos (heteropolissacarídeos) formados por resíduos de açúcares, configurando uma molécula altamente ramificada. Esses açúcares incluem pentoses (L-arabinose, D-xilose), hexoses (D-galactose, L-galactose, D-manose, L-raminose) e ácidos urônicos (ácido D-galacturônico).

Dentre os polissacarídeos presentes na hemicelulose, destaca-se a xilana como o componente principal, constituindo um homopolímero linear composto por unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosil (xilose) unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4. Esses elementos são comumente encontrados na parede secundária e estão fortemente associados à celulose por meio de pontes de hidrogênio.

### **2.1.3 Lignina**

As ligninas são polímeros complexos cuja estrutura ainda não é totalmente compreendida. De maneira geral, são descritas como polímeros condensados resultantes da redução enzimática dos ácidos p-cumárico, ferúlico e sinápico para seus respectivos álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico. Esses álcoois condensam por meio de um processo oxidativo, formando macromoléculas reticuladas conhecidas como ligninas (Grenet e Besle, 1991). A composição, estrutura e quantidade das ligninas variam de acordo com o tecido, os órgãos, a origem botânica, a idade da planta e os fatores ambientais.

### **2.1.4 Proteínas**

Existem três principais grupos de proteínas presentes na parede celular: as extensinas, responsáveis pela função estrutural, as proteínas ricas em glicina (GRP), associadas à lignificação, e as proteínas ricas em prolina (PRP), que desempenham papel na formação dos nódulos radiculares em leguminosas. Além desses, há outros grupos menos proeminentes, porém, fundamentais para o desenvolvimento celular. Parte dessas proteínas é solubilizada durante a determinação da fibra, enquanto outra parte permanece como componente da fibra e é corrigida com a medição do nitrogênio na parede celular (NIDA). No entanto, alguns autores argumentam contra a correção dessas proteínas, pois estão indisponíveis para a digestão ou degradação bacteriana e absorção pelo trato gastrointestinal dos animais (Giger-Reverdin, 1995).

### **3. Componentes relacionados a digestão da fibra**

A digestibilidade da fibra é definida como a fração da fibra ingerida que não é eliminada nas fezes. A fibra, possui uma parte que não pode ser digerida e outra que tem potencialmente digestível. O processo de digestão da fibra envolve a quebra dos polissacarídeos e a conversão dos monossacarídeos resultantes em ácidos graxos voláteis (AGV), gases provenientes da fermentação e calor. Frequentemente, a taxa de quebra é o principal fator limitante na digestão ruminal da fibra, sendo restrita pela ação de enzimas no complexo lignina-polissacarídeos, responsáveis pela degradação da parede celular (Chesson e Forsberg, 1988).

A capacidade de digerir a fibra presente em forragens não se mantém uniforme entre todos os animais ou em todas as situações de alimentação. A principal causa de variação está associada às discrepâncias em sua estrutura, composição química e estágio de maturidade (Macedo e Zanine, 2006).

A porção não digerível da fibra detergente neutro (FDN) é a que mais impacta a utilização geral da fibra, podendo exceder mais da metade da FDN total no rúmen. De acordo com Khalili e Huhtanen (1986), existe uma relação inversa entre a digestibilidade da FDN no organismo vivo e a quantidade total de FDN no rúmen. Conforme a digestibilidade da FDN aumenta ao longo do tempo no rúmen, tanto a quantidade total de FDN quanto a parcela digerível diminuem em um ritmo similar, porém a fração não digerível diminui de forma mais gradual. Dessa forma, os elementos na dieta que influenciam o ambiente ruminal, reduzindo a degradação da FDN, ampliam a quantidade (*pool*) de FDN, especialmente da porção digerível. A diminuição na

digestibilidade da fibra pode reduzir a ingestão de fibra quando o enchimento ruminal é o fator limitante, como frequentemente ocorre no início da lactação.

Diversos fatores que compõem a dieta como a fração não digestível da FDN a interação com o limite de consumo e a velocidade de fermentação de carboidratos de rápida fermentação, desempenham papéis essenciais. A velocidade com que a FDN potencialmente disponível é fermentada também é fator crucial que impacta a utilização da fibra.

A anatomia vegetal e a composição química são os dois principais fatores vegetais que afetam a ingestão voluntária e a digestibilidade (Coleman *et al.*, 2004). As principais características químicas relacionadas a digestibilidade da fibra são a composição e relação entre carboidratos estruturais e concentração de lignina. Características físicas, como a densidade, capacidade de troca de cátions, poder tampão e hidratação de partículas, estão relacionadas ao tempo de colonização das partículas (*lag time*) e a taxa de digestão.

Durante a degradação da parede celular secundária, é pouco provável que ocorra a digestão superficial e o acúmulo de monômeros fenólicos em níveis tóxicos no interior da célula. No entanto, a lenta dispersão do complexo fenólico-carboidrato pode levar a concentrações tóxicas para as bactérias.

A capacidade de ingestão e digestão da matéria seca da forragem são características essenciais que impactam diretamente na produção animal (Minson, 1990). Esses dois aspectos são influenciados pela proporção da parede celular, pela resistência da forragem e pelas estruturas fibrosas que se desfazem em pequenas partículas durante o processo de mastigação e digestão.

A parede celular secundária constitui a maior parte, tanto em volume quanto em massa, do total da parede celular, representando aproximadamente 82% do volume total. Portanto, a capacidade dos ruminantes em digerir os componentes dessa parede torna-se crucial para a utilização de alimentos fibrosos, especialmente as gramíneas tropicais, que frequentemente possuem uma proporção maior de tecidos estruturais menos suscetíveis à digestão se comparadas às gramíneas de climas temperados (Wilson e Mertens, 1995).

O desenvolvimento de uma rígida e espessa parede ao redor do protoplasma celular representou evolução no processo de adaptação das plantas a vida terrestre, e nesse processo de evolução, a parede celular adquiriu variações na espessura, composição química e na distribuição de tecidos (Brett e Waldron, 1996).

Segundo Wilson (1993) as duas primeiras camadas da parede celular (primária e secundária) são as mais importantes, também caracterizou a parede terciária como uma camada membranosa extremamente delgada, localizada internamente à parede secundária, geralmente a parede terciária não tem sido considerada um problema de acesso dos microrganismos a parede secundária.

As interações dos componentes da parede, como os polifenóis e os carboidratos, desempenham maiores restrições à degradação da parede celular (Jung, 1989). Na composição química da parede celular, a lignina é o componente que possui maior limitação em relação a digestão dos polissacarídeos da parede celular no rúmen (Jung e Deetz, 1993). No início do século Whetten *et al.* (1998), realizaram os primeiros estudos de correlação negativa entre o conteúdo da lignina e a digestibilidade das forrageiras. Atualmente existem algumas imprecisões quanto a polimerização dos materiais de origem para a biossíntese de lignanas (monolignóis) na parede celular.

### **3.1 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos também conhecidos como fenóis, compreendem compostos químicos com grupo fenol agrupado a uma hidroxila funcional e são de modo geral derivados da fenilalanina, atuando como defesa química contra pragas e doenças (Taiz e Zeiger, 2004).

Os compostos fenólicos correspondem aos principais compostos secundários encontrados nas plantas e são classificados como, taninos, monolignóis, ácidos fenólicos, flavonoides e lignina. A lignina é um dos compostos fenólicos mais importantes relacionados aos estudos de fatores antinutricionais (Barry, 2001).

### **3.2 Lignina**

A lignina é uma importante substância que compõe a parede celular, é um fenilpropanoide, de alto peso molecular e possui quimicamente bloqueio enzimático e físico, que tem o papel de enrijecer a parede celular, porém limita a disponibilidade dos carboidratos da parede celular aos microrganismos (Van Soest, 1982).

Originário do latim, *lignum* não só denota "madeira", mas é um polímero altamente ramificado de fenilpropanoides. Após a celulose, é uma das substâncias orgânicas mais

prevalentes nas plantas, contribuindo com cerca de 30% do carbono orgânico presente na biosfera (Boerjan *et al.*, 2003).

É de grande importância ressaltar que sua formação inicia-se com o espessamento da parede celular secundária, dessa forma, seu conteúdo aumenta conforme acompanha o desenvolvimento do vegetal. É considerada uma macromolécula amorfa, resultado da condensação de unidades de fenilpropanoides (álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool p-cumarílico) derivadas do aminoácido fenilalanina, e representa um dos maiores grupos de constituintes orgânicos da parede celular nas plantas (Gallego-Giraldo *et al.*, 2016).

Esses álcoois que dão origem à lignina diferem entre si pelo grau de metoxilação. Quando são incorporados ao polímero de lignina, produzem, respectivamente, as unidades p-hidroxifenil que possui radical metoxi (OCH<sub>3</sub>), guaiacil, que possui 1 radical metoxi e siringil, que possui 2 radicais metoxi (Boerjan *et al.*, 2003).

Ainda não há clareza completa sobre os processos pelos quais ela reduz a digestão da parede celular, porém de acordo com Jung (1989) a composição química da lignina pode ter um papel mais significativo do que a quantidade na determinação da digestibilidade e a condensação dos ácidos fenólicos atua como precursores da lignina.

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

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

De modo geral, existem duas partes da lignina: core (parte central) e não core (parte periférica). A lignina core consiste em áreas altamente condensadas e mais resistentes a degradação dos compostos fenólicos que podem ser extraídos da amostra e é composta por

unidades p-hidroxifenila, guaiacila e siringila (Jung e Casler, 1991). A lignina não core é representada por ácidos p-hidroxicinâmicos éster-ligados e é composta por compostos fenólicos de baixo peso molecular e que são liberados da parede celular por meio de hidrólise, além disso, a ligação da lignina não core com a hemicelulose pode ser um fator que facilite a hidrólise.

As plantas forrageiras apresentam os dois tipos de lignina, porém, há diferença na distribuição da lignina nos tecidos de gramíneas e leguminosas. Nas leguminosas há mais lignina, mas está localizada em tecidos específicos, por exemplo nos caules; já nas gramíneas o conteúdo total de lignina é menor em relação as leguminosas, mas está mais distribuída pelos tecidos da planta. De forma geral, as plantas de metabolismo C4 depositam mais lignina do que as de metabolismo fotossintético C3.

Entre as espécies vegetais e nos genótipos dentro das espécies, existem diferenças consideráveis na composição e concentração de lignina (Getachew *et al.*, 2018). Akin *et al.* (1984) concluíram que a natureza dos compostos fenólicos presentes no parênquima e esclerênquima de caules de gramíneas é diferente. Além disso, a quantidade de compostos fenólicos presentes nos diferentes tecidos, tem sido relacionada com a digestibilidade (Akin *et al.*, 1990).

A lignificação tende a ser mais intensa em tecidos estruturais, como xilema e esclerênquima, e órgãos que contêm altas concentrações desses tecidos, como os caules (Getachew *et al.*, 2018). A lignina está presente principalmente em traqueídes e elementos de vaso, assim como na parede celular de vários tecidos de sustentação e vascular (Zhang *et al.*, 2011). A capacidade de fornecer rigidez aos caules e aos tecidos vasculares conferidos pela lignina, permite que a condução de água e sais minerais ocorram em pressão negativa sem o rompimento do xilema (Zhang *et al.*, 2011), e atua como barreira defensiva contra patógenos, lesões e herbívoros (Boerjan *et al.*, 2003).

A lignina desempenha papel vital para a regulação da síntese da parede celular secundária (Cui *et al.*, 2018). Contudo, a diminuição da digestão dos alimentos é efeito negativo da incorporação de lignina, pois esta dificulta o acesso de microrganismos e enzimas. Mesmo em materiais vegetais com a mesma concentração de lignina, a digestibilidade da fibra pode ser diferente devido a diferenças atribuídas ao tipo e à localização da deposição de lignina, que determina a abundância de ligações cruzadas entre a lignina e a celulose (Getachew *et al.*, 2018).

#### 4. Estratégias para melhorar a digestibilidade da fibra

A complexidade do material lignocelulósico presente na forragem representa uma das principais barreiras para a utilização dos nutrientes e da energia contidos nas fibras. Ao longo de décadas, diversas tecnologias foram testadas com o intuito de potencializar a utilização da fibra para ruminantes.

Existem algumas estratégias para aumentar a digestibilidade da fibra, como o processamento mecânico. O processamento físico ou mecânico tem o propósito de reduzir as dimensões das partículas da forragem, diminuindo o enchimento do trato digestório e, conseqüentemente, aumento de consumo. Estas técnicas resultam em ampliação da área superficial disponível para a colonização microbiana, favorecendo potencialmente o aumento na utilização das fibras (Humer *et al.*, 2017). Apesar das partículas mais longas de forragem beneficiarem a formação do *mat* ruminal e estimularem a atividade mastigatória, essas partículas, quando em excesso, podem limitar a ingestão através da redução da taxa de passagem ruminal e aumento do enchimento (Mertens, 1987). Embora o tamanho das partículas possa ser alterado para melhorar a digestibilidade da fibra, os resultados da pesquisa têm sido inconsistentes e não está relacionado com a alteração na composição química da forrageira.

Além das estratégias físicas para aumentar a digestibilidade de fibra, ainda existem as estratégias de melhoramento genético das plantas, que conseqüentemente reduzem as concentrações de lignina ou FDN indigestível (Grant e Ferrareto 2018). Uma estratégia viável para alcançar esses objetivos é por meio da seleção genética do processo de lignificação ou da seleção de mutações que ocorrem naturalmente (Porter *et al.*, 1978). Como exemplo, forragens mutantes *brown midrib* (BMR; por exemplo, milho, sorgo e milheto) exibem de forma consistente concentrações menores de lignina em comparação com forragens convencionais (Sattler *et al.*, 2010). Apesar da maior digestibilidade da fibra, as plantas com menor teor de lignina frequentemente apresentam menor produtividade de MS, maior risco de tombamento e maior susceptibilidade a doenças.

Os tratamentos químicos, como o uso de compostos alcalinos, tais como amonização e tratamento com hidróxido de sódio, potássio ou cálcio, são utilizados como estratégias químicas para aumento de digestibilidade das plantas e demonstram eficácia na ruptura das ligações

hemicelulose-lignina e lignocelulose, na hidrólise de ésteres de ácido urônico e acético, bem como na desorganização da cristalinidade da celulose (Jung e Deetz, 1993). Esses procedimentos ampliam a capacidade de degradação da parede celular, possibilitando que os microrganismos ruminais ataquem os carboidratos estruturais e intensifiquem a decomposição tanto da hemicelulose quanto da celulose (Jung e Deetz, 1993). Os procedimentos químicos utilizados para aprimorar a digestibilidade da fibra são consistentes e eficazes, entretanto, sua implementação em larga escala tem sido restrita devido à natureza cáustica e aos custos associados.

A busca por estratégias capazes de aumentar a capacidade de produção de etanol de segunda geração, a partir de resíduos fibrosos agroindustriais, tem resultados em novas oportunidades para ganhos em digestibilidade da parede celular em alimentos utilizados para a nutrição animal. Uma das possibilidades é a utilização de moduladores das vias de deposição de lignina, como o ácido piperonílico, que é um inibidor *quasi*-irreversível da cinamato 4-hidroxilase que catalisa o segundo passo da via dos fenilpropanoides, responsável pela produção de lignina e outros compostos fenólicos.

#### 4.1 Ácido piperonílico

A rota dos fenilpropanoides é encarregada da produção de ácidos fenólicos e monolignóis e é uma via exclusiva das plantas que resulta em compostos com estruturas e funções altamente variadas (Dixon e Paiva, 1995; Werck-Reichhart, 1995). Está envolvido na formação de biopolímeros de grande importância quantitativa, como a lignina e suberina. Além disso, também participa da síntese de moléculas sinalizadoras, como o ácido salicílico e os isoflavonoides, presente em pigmentos florais e componentes protetores contra raios UV, tais como antocianinas, flavonoides e cumarinas, e diversas classes de fitoalexinas. A parte inicial do metabolismo dos fenilpropanoides que se origina na via do ácido chiquimato que produz a fenilalanina, compreende um conjunto de três etapas enzimáticas que conduzem ao 4-cumaroil CoA.

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

que se enquadram nessa estrutura C6-C1 incluem ácidos benzoico e salicílico, assim como substâncias de grande importância econômica, como a vanilina.

As ligninas desempenham papel vital no crescimento e no desenvolvimento das plantas, conferindo impermeabilidade às células condutoras, evitando a perda de água e proporcionando resistência mecânica para o crescimento, além de proteção contra patógenos. Assim, diminuições significativas nos níveis de lignina na planta podem levar a maior sacarificação, porém, em muitos casos, isso acarreta a redução subsequente na produtividade de biomassa (Chen e Dixon, 2007; Martarello *et al.*, 2021).

A acessibilidade enzimática dos polissacarídeos da parede celular é impedida pela acilação desses polissacarídeos com ácidos acéticos, p-cumáricos e ferúlicos, resultando em maior hidrofobicidade e complexidade desses polissacarídeos. Os resíduos de ácido ferúlico ligados aos ésteres do arabinosilano podem também unir-se, conectando o ácido ferúlico-arabinosilano a polissacarídeos próximos, lignina e proteínas estruturais, como extensões (Mota *et al.*, 2019).

Novos estudos têm trazido informações que possibilitam manipular a biossíntese da lignina por meio da engenharia genética, visando produzir biomassa lignocelulósica com maior capacidade de sacarificação, muitas vezes sem afetar a produtividade da biomassa (Martarello *et al.*, 2021; Meester *et al.*, 2022).

Uma estratégia para controlar o teor de lignina em plantas geneticamente modificadas é o uso de inibidores químicos de enzimas envolvido na via dos fenilpropanoides. Essa estratégia tem sido empregada por meio da pesquisa sobre os mecanismos de ação dos aleloquímicos, os quais têm a capacidade de induzir a lignificação em plantas (Dos Santos *et al.*, 2008; Salvador *et al.*, 2013), modificar a composição da lignina (Bevilaqua *et al.*, 2019) e promover a incorporação diferencial da lignina. No entanto, apenas alguns inibidores da biossíntese de lignina foram descritos até agora, como o ácido piperonílico (PIP), inibidor quase irreversível do cinamato 4-hidroxilase (C4H).

O ácido piperonílico é uma molécula extraída da casca da árvore Paracoto. O PIP contém função metilenodioxifenil (MDP) numa posição adequada para ataque oxidativo pelo CYP73A1 (enzima pertencente à família das citocromo P450). Em diversos estudos foram demonstrados que muitos compostos com função MDP inibem enzimas P450 de mamíferos ou

insetos tanto *in vitro* como *in vivo* (Franklin, 1977; Wilkinson *et al.*, 1984; Ortiz de Montellano e Correia, 1995).

Foi demonstrado que eles atuam como inativadores baseados em mecanismos e requerem metabolismo catalisado pelo P450 para gerar um metabólico intermediário e formar um complexo estável com a enzima (Franklin, 1971).

A C4H transforma o ácido cinâmico em p-cumarato, um componente chave da parede celular, sobretudo lignina, e precursor universal de todos os monolignóis. O ácido piperonílico é uma molécula natural com função metilendioxo que imita de perto a estrutura do ácido transcinâmico. A subfamília CYP73A1 da planta P450 catalisa a 4-hidroxilação do ácido transcinâmico, a segunda etapa da via geral dos fenilpropanóides (Chen *et al.*, 2011; Gou *et al.*, 2018).

## 5. REFERÊNCIAS

- Akin, D. E., N. Ames-Gottfred, R. D. Hartley, R. G. Fulcher, and L. L. Rigsby. 1990. Microspectrophotometry of phenolic compounds in bermudagrass cell walls in relation to rumen microbial digestion. *Crop Science*. 30:396–401. Doi: <https://doi.org/10.2135/cropsci1990.0011183X003000020033x>.
- Akin, D. E., H. E. Amos, and F. E. Barton II. 1973. Microbial degradation of grass tissue revealed by scanning electron microscopy. *Agronomy Journal*. 65:825–828. Doi: <https://doi.org/10.2134/agronj1973.00021962006500050045x>.
- Akin, D. E., R. H. Brown, and L. L. Rigsby. 1984. Digestion of stem tissues in *Panicum* species. *Crop Science*. 24:769–773. Doi: <https://doi.org/10.2135/cropsci1984.0011183X002400040033x>.
- Akin, D. E., J. R. Wilson, and W. R. Windham. 1983. Site and rate of tissue digestion in leaves of C3, C4 and C3/C4 intermediate *Panicum* species. *Crop Sci*. 23:147–155. Doi: <https://doi.org/10.2135/cropsci1983.0011183X002300010042x>.
- Allen, M. S. 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 83:598–1624. Doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75030-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75030-2).

- Alquini, Y., C. Bona, M. R. T. Boeger, C. G. d. Costa, and C. F. Barros. 2006. Epiderme. Pages 88–107 in *Anatomia Vegetal*. 2nd ed. Apazzato-da-Glória, B., and Carmello-Guerreiro, S. M. UFV.
- Barry, C. E. 2001. Interpreting cell wall ‘virulence factors’ of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microb.* 9:237–241. Doi: 10.1016/s0966-842x(01)02018-2.
- Bernardes, T. F., and A. C. Do Rêgo. 2014. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 97:1852–1861. Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7181>.
- Bevilaqua, J. M., A. Finger-Teixeira, R. Marchiosi, D. M. De Oliveira, B. M. Joia, A. P. Ferro, A. V. Parizotto, W. Dos Santos, and O. Ferrarese-Filho. 2019. Exogenous application of rosmarinic acid improves saccharification without affecting growth and lignification of maize. *Plant Physiology and Biochemistry.* 142:275–282. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.07.015>.
- Boerjan, W., J. Ralph, and M. Baucher. 2003. Lignin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology.* 54:519–546. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938>.
- Bolwell, G. P., K. Bozak, and A. Zimmerlin. 1994. Plant cytochrome P450. *Phytochemistry.* 37:1491–1506. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89567-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89567-9).
- Braybrook, S. A., and H. Jönsson. 2016. Shifting Foundations: The Mechanical Cell Wall and Development. *Current Opinion in Plant Biology.* 29:115–120. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.12.009>.
- Brett, C., and K. Waldron. 1996. *Physiology and biochemistry of plant cell walls*. Pages 270. 2nd ed. London: Chapman e Hall.
- Buckeridge, M. S. 2010. Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. *Plant physiology.* 154:1017–1023. Doi: <https://doi.org/10.1104/pp.110.158642>.
- Byott, G. S. 1976. Leaf air space system in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> species. *New Phytologist.* 76:295–299. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1976.tb01464.x>.

- Chen, F., and R. A. Dixon. 2007. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production, *Nature Biotechnology*. 25:759–761. Doi: <https://doi.org/10.1038/nbt1316>.
- Chen, F., D. Tholl, J. Bohlmann, and E. Pichersky. 2011. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *The Plant Journal*. 66:212–229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04520.x>.
- Cheng, K. J., D. Dinsdale, and C. S. Stewart. 1979. Maceration of Clover and Grass Leaves by *Lachnospira multiparus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:723–729. Doi: <https://doi.org/10.1128/aem.38.4.723-729.1979>.
- Cheng, K.J., J. P. Fay, and R. E. Howarth. 1980. Sequence of events in the digestion of fresh legume leaves by rumen bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 40:613–625. Doi: [10.1128/aem.40.3.613-625.1980](https://doi.org/10.1128/aem.40.3.613-625.1980).
- Chesson, A., and C. W. Forsberg. 1988. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. Pages 251–284 in: Hobson, P. N., ed. *The Rumen Microbial Ecosystem*, London: Elsevier Science.
- Chiang, V. L. 2006. Monolignol biosynthesis and genetic engineering of lignin in trees, a review. *Environmental Chemistry Letters*. 4:143–146. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10311-006-0067-9>.
- Coleman, S. W., J. E. More, and J. R. Wilson, 2004. Quality and utilization. Pages 267–308 in *Warm-season (C4) grasses*. Monser, L. E., B. L. Burson, and L. E. Agron. Monogr. 45. ASA, CSSA, and SSSA. Madison, WI. Doi: <https://doi.org/10.2134/agronmonogr45.c8>.
- Cui, J., T. Liu, Y. Li, and F. Li. 2018. Selenium reduces cadmium uptake into rice suspension cells by regulating the expression of lignin synthesis and cadmium-related genes. *Science Total Environment*. 644:602–610. Doi: [10.1016/j.scitotenv.2018.07.002](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.002).
- Dixon R.A., and N. L. Paiva. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*. 7:1085–1097. Doi: [10.1105/tpc.7.7.1085](https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1085).
- Dos Santos, W. D., M. L. L. Ferrarese, and O. Ferrarese-Filho. 2008. Ferulic Acid: An Allelochemical Troublemaker. *Functional Plant Science and Biotechnology*. 2:47– 55.

- Disponível em:  
[http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/OnlineFPSB\\_2\\_1.html](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/OnlineFPSB_2_1.html).
- Durst, F., and D. O’Keefe. 1995. Plant cytochromes P450s: an overview. *Drug Metab Drug Interact.* 12:171–187.
- Engels, F. M., and H. G. Jung. 1998. Alfafa stem tissues: cell-wall development and lignification. *Annals of Botany.* 82:561–568. Doi: <https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0705>.
- Esau, K. 1977. *Anatomy of seed plants.* 2nd ed. John Wiley e Sons, NY.
- Franklin, M. R. 1971. The enzymic formation of methylenedioxyphenyl derivative exhibiting an isocyanide-like spectrum with reduced cytochrome P-450 in hepatic microsomes. *Xenobiotica*, 1:581–591. Doi: <https://doi.org/10.3109/00498257109112269>.
- Franklin, M. R. 1977. Inhibition of mixed-function oxidations by substrates forming reduced cytochrome P-450 metabolic-intermediate complexes. *Pharmacology e Therapeutics.* Part A: Chemotherapy, Toxicology and Metabolic Inhibitors. 2:227–245. Doi: [https://doi.org/10.1016/0362-5478\(77\)90015-8](https://doi.org/10.1016/0362-5478(77)90015-8).
- Gallego-Giraldo, L., G. Shadle, H. Shen, J. Barros-Rios, S. F. Corrales, H. Whand, and R. A. Dixon. 2016. Combining enhanced biomass density with reduced lignina level for improved forage quality. *Plant Biotechnology Journal.* 14:895–904. Doi: 10.1111/pbi.12439.
- Getachew, G., E. A. Laca, D. H. Putnam, D. Witte, M. McCaslin, K. P. Ortega, and E. J. DePeters. 2018. The impact of lignin downregulation on alfalfa yield, chemical composition, and in vitro gas production. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 98:4205–4215. Doi: 10.1002/jsfa.8942.
- Giger-Reverdin, S. 1995. Review of the main methods of cell wall estimation: interest and limits for ruminants. *Animal Feed. Science and Technology.* 55:295–334. Doi: [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(95\)00791-K](https://doi.org/10.1016/0377-8401(95)00791-K).
- Goodwin, T. V., and E. I. Mercer. 1988. *Introduction to plant biochemistry.* 2ed. Oxford: Pergamon Press.

- Gou, J., S. Debnath, L. Sun, A. Flanagan, Y. Tang, Q. Jiang, J. Wen, and Z. Wang. 2018. From model to crop: functional characterization of SPL8 in *M. truncatula* led to genetic improvement of biomass yield and abiotic stress tolerance in alfalfa. *Plant Biotechnol. J.* 16:951–962. Doi: 10.1111/pbi.12841.
- Grabber, J. H., J. Ralph, and R. D. Hatfield. 1998. Ferulate Cross-Links Limit the Enzymatic Degradation of Synthetically Lignified Primary Walls of Maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 46:2609–2614. Doi: <https://doi.org/10.1021/jf9800099>.
- Grant, R.J., and L. F. Ferraretto. 2018. Silage review: Silage feeding management: Silage characteristics and dairy cow feeding behavior. *J Dairy Sci.* 101:4111–4121. Doi: 10.3168/jds.2017-13729.
- Grenet, E., and J. M. Besle. 1991. Microbes and fibre degradation. Pages 107–129 in *Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion.* Jouany J.P. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris, FR.
- Hacker, J.B., and D. J. Minson. 1981. The digestibility of plant parts. *Herbage Abstracts.* 51:459–482.
- Halpin, C. 2019. Lignin engineering to improve saccharification and digestibility in grasses. *Current Opinion in Biotechnology,* 56:223–229. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.013>.
- Hanna, W. W., W. G. Monson, and G. W. Burton. 1973. Histological examination of fresh forage leaves after *in vitro* digestion. *Crop Science.* 13:98–102. Doi: <https://doi.org/10.2135/cropsci1973.0011183X001300010031x>.
- Harbers, K., D. Jahner, and R. Jaenisch. 1981. Microinjection of cloned retroviral genomes into mouse zygotes: integration and expression in the animal. *Nature.* 293:540–542. Doi: <https://doi.org/10.1038/293540a0>.
- Harris, P. J. 1990. Plant cell wall structure and development. Pages 71–90 in *Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocellulose Utilization by Ruminants.* Eds Akin, D. E., L. G. Ljungdall, J. R. Wilson, and P. J. Harris. Elsevier Scientific Publishing Company. New York.

- Hendriks, A. T. W. M., and G. Zeeman. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 100:10–18. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>.
- Humer, E., R. M. Petri, J. R. Aschenbach, B. J. Bradford, G. B. Penner, M. Tafaj, K-H. Südekum, and Q. Zebeli. 2018. Invited review: Practical feeding management recommendations to mitigate the risk of subacute ruminal acidosis in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 101:872–888. Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13191>.
- Jung, H. G. 1989. Forages lignins and their effects on fiber digestibility. *Agronomy Journal*. 81:33–38. Doi: <https://doi.org/10.2134/agronj1989.00021962008100010006x>.
- Jung, H. G., and M. D. Casler. 1991. Relationship of lignin and esterified phenolics to fermentation of smooth brome grass fibre. *Animal Feed Science and Technology*. 32:63–68. Doi: [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(91\)90010-P](https://doi.org/10.1016/0377-8401(91)90010-P).
- Jung, H. G., and D. A. Deetz. 1993. Cell wall lignification and degradability. Pages 315–340 in *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. American Society of Agronomy. Crop Science Society of America. Soil Science Society of America. Madison, Wis. Doi: <https://doi.org/10.2134/1993.foragecellwall>.
- Khalili, H., and P. Huhtanen. 1986. Sucrose supplements in cattle given grass silage-based diet. 1. Digestion of organic matter and nitrogen. *Animal Feed Science and Technology*. 33:247–258. Doi: [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(91\)90064-Y](https://doi.org/10.1016/0377-8401(91)90064-Y).
- Macedo Junior, G. L., and A. M. Zanine. 2006. Importância do consumo da fibra para nutrição de ruminantes. *Revista Eletrônica de Veterinária*. 7:1–11.
- Magai, M. M., D. A. Sleper, and P. R. Beuselinck. 1994. Degradation of three warmseason grasses in a prepared cellulase solution. *Agronomy Journal*. 86:1049–1053. Doi: <https://doi.org/10.2134/agronj1994.00021962008600060022x>.
- Mahanna, B., B. Seglar, F. Owens, S. Dennis, and R. Newell. 2014. *Silage zone manual*. DuPont Pioneer. Johnston, IA. Disponível em: [https://www.pioneer.com/CMRoot/Pioneer/US/Non\\_Searchable/programs\\_services/earn-the-right/SilageZoneManual-2nd-Edition.pdf](https://www.pioneer.com/CMRoot/Pioneer/US/Non_Searchable/programs_services/earn-the-right/SilageZoneManual-2nd-Edition.pdf).

- Martarello, D. C. I., A. M. Almeida, R. C. Sinzker, and D. M. Oliveira. 2021. The Known Unknowns in Lignin Biosynthesis and its Engineering to Improve Lignocellulosic Saccharification Efficiency. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 13:2497–2515. Doi: 10.1007/s13399-021-01291-6.
- Meester, B., R. Vanholme, T. Mota, and W. Boerjan. 2022. Lignin engineering in forest trees: From gene discovery to field trials. *Plant Communications*. 3:100465. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100465>.
- Mertens, D. R. 1987. Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function. *J. Anim. Sci.* 64:1548–1558. Doi: 10.2527/jas1987.6451548x.
- Mertens, D. R. 1997. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:1463–1481. Doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76075-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76075-2).
- Minson, D.J. 1990. Forage in ruminant nutrition. Pages 483. Academic Press. San Diego.
- Monson, W. G., J. B. Powell, and W. G. Burton. 1972. Digestion of fresh forage in rumen fluid. *Agronomy Journal*. 64:231–236.
- Mota, T. R., D. M. Oliveira, G. R. Morais, R. Marchiosi, M. S. Buckeridge, O. Ferrarese-Filho, and W. D. Dos Santos. 2019. Hydrogen peroxide-acetic acid pretreatment increases the saccharification and enzyme adsorption on lignocellulose. *Industrial Crops and Products*. 140:111657. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111657>.
- Oba, M., and M. S. Allen. 2000. Effects of brown midrib 3 mutation in corn silage on productivity of dairy cows fed two concentrations of dietary neutral detergent fiber: 1. Feeding behavior and nutrient utilization. *J. Dairy Sci.* 83:1333–1341. Doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75000-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75000-4).
- Oliveira, C. A., and D. D. Millen. 2014. Survey of the nutritional recommendations and management practices adopted by feedlot cattle nutritionists in Brazil. *Animal Feed Science and Technology*. 197:64–75. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.08.010>.
- Ortiz de Montellano, P. R, and M. A. Correia. 1995. Inhibition of cytochrome P450 enzymes. Pages 305–364 in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Ortiz de Montellano, P. R. Plenum Press. New York.

- Porter, K. S., J. D. Axtell, V. L. Lechtenber, and V. F. Colenbrander. 1978. Phenotype, fiber composition, and in vitro dry matter disappearance of chemically induced brown midrib (bmr) mutants of sorghum. *Crop Science*. 18:205-208. Doi: <https://doi.org/10.2135/cropsci1978.0011183X001800020002x>.
- Raffrenato, E., R. Fievisohn, K. W. Cotanch, R. J. Grant, L. E. Chase, and M. E. Van Amburgh. 2017. Effect of lignin linkages with other plant cell wall components on in vitro and in vivo neutral detergent fiber digestibility and rate of digestion of grass forages. *J. Dairy Science*. 100:8119–8131. Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12364>.
- Raven, P. H., R. F. Evert, and S. E. Eichhorn. 2001. *Biologia vegetal*. Pages 906. 6.ed. Guanabara Dois. Rio de Janeiro.
- Reis, R. A., T. F. Bernardes, and G. R. Siqueira. 2014. *Forrageicultura: Ciência, Tecnologia e Gestão dos Recursos Forrageiros*. Pages 714. Jaboticabal: FUNEP.
- Salvador, V. H., R. B. Lima, W. D. Dos Santos, A. R. Soares, A. F. Böhm, R. Marchiosi, M. L. L. Ferraresi, and O. Ferraresi-Filho. 2013. Cinnamic Acid Increases Lignin Production and Inhibits Soybean Root Growth. *Pub Med*. 26:69105. Doi: [10.1371/journal.pone.0069105](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069105).
- Sattler, G., M. J. Cllander, D. Grablowitz, T. Walker, E. K. Bee, B. Rzany, T. C. Flynn, and A. Carruthers. 2010. Noninferiority of incobotulinumtoxinA, free from complexing proteins, compared with another botulinum toxin type A in the treatment of glabellar frown lines. *Dermatologic Surgery*. 36:2146–2154. Doi: [10.1111/j.1524-4725.2010.01706.x](https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2010.01706.x).
- Schuler, M. A. 1996. Plant cytochrome P450 monooxygenases. *Crit Rev Plant Sci*. 15:235–284. Doi: [10.1080/07352689609701942](https://doi.org/10.1080/07352689609701942).
- Taiz, L., and E. Zieger. 2002. *Auxin: Plant Physiology*. Sinaver Association Inc. Pub. Plant. Sci. 41:179–183.
- Taiz, L., and E. Zeiger. 2004. *Fisiologia vegetal*. 3.ed. Artmed. Porto Alegre.
- Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2nd ed. Cornell University Press, Ithaca, NY.

- Van Soest, P. J. 1982. Nutritional Ecology of the Ruminant. O and B Books Inc. Corvallis. 112:126–127.
- Verbančič, J., J. E. Lunn, M. Stitt, and S. Persson. 2018. Carbon Supply and the Regulation of Cell Wall Synthesis. *Molecular Plant*. 11:75–94. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.10.004>.
- Werck-Reichhart, D. 1995. Cytochromes P450 in phenylpropanoid metabolism. *Drug Metabol Drug Interact* 12:221–243. Doi: 10.1515/dmdi.1995.12.3-4.221.
- Whetten, R. W., J. J. Mackay, and R. R. Sederoff. 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annual Review of plant physiology and plant molecular biology*. 49:585–609.
- Wilkinson, C. F., M. Murray, and C. B. Marcus. 1984. Interactions of methylenedioxyphenyl compounds with cytochrome P450 and effects on microsomal oxidation. Pages 27–63 in *Reviews in Biochemical Toxicology*. Hodgson, E., J. R. Bend, and R. M. Philipot. The Netherlands. Elsevier, Amsterdam.
- Wilkinson, J. M., and M. I. Toivonen. 2003. *World Silage – A Survey of Forage Conservation Around the World*. Chalcombe Publications. Lincoln, UK.
- Wilson, J. R. 1993. Organization of forage plant tissues. Pages 1–32 in *Forage cell wall structure and digestibility*. Jung, H. G., D. R. Buxton, R. D. Hatfield, et al. Madison: ASA/CSSA/SSSA. Doi: <https://doi.org/10.2134/1993.foragecellwall.c1>.
- Wilson, J. R. 1994. Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants. *Journal of Agricultural Science*. 122:173–182. Doi: <https://doi.org/10.1017/S0021859600087347>.
- Wilson, J. R., and D. R. Mertens. 1995. Cell wall accessibility and cell structure limitations to microbial digestion of forage. *Crop Science*. 35:251–259. Doi: <https://doi.org/10.2135/cropsci1995.0011183X003500010046x>.
- Wilson, J. R., K. L. Anderson, and J. B. Hacker. 1989. Dry matter digestibility in vitro of leaf and stem of buffel grass (*Cenchrus ciliaris*) and related species and its relation to plant morphology and anatomy. *Australian Journal of Agricultural Research*. 40: 281–291. Doi: <https://doi.org/10.1071/AR9890281>.

- Wilson, Jr., and P. W. Hattersley. 1989. Anatomical characteristics and digestibility of leaves of *Panicum* and Other grass genera of C4 photosynthetic pathway. *Aust. J. Agric. Res.* 40:125–136. Doi: <https://doi.org/10.1071/AR9890125>.
- Yalpani, N., J. Leon, M. A. Lawton, and I. Raskin. 1993. Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol.* 103:315–321. Doi: [10.1104/pp.103.2.315](https://doi.org/10.1104/pp.103.2.315).
- Zhang, Y., T. Culhaoglu, B. Pollet, C. Melin, D. Denoue, Y. Barrière, S. Baumberger, and V. Méchin. 2011. Impact of lignin structure and cell wall reticulation on maize cell wall degradability. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry.* 59:10129–10135. Doi: [10.1021/jf2028279](https://doi.org/10.1021/jf2028279).

## **II. Desempenho de novilhas leiteiras alimentadas com silagem de planta de milho tratada com ácido piperonílico**

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

### **RESUMO**

O objetivo do trabalho é avaliar o desempenho de novilhas leiteiras, alimentadas com silagem de planta inteira de milho tratada com ácido piperonílico (PIP). O PIP é um inibidor da enzima cinamato-4-hidroxilase da via dos fenilpropanoides, capaz de regular a biossíntese dos monômeros de lignina e modificar a estrutura deste polímero presente na parede celular das

plantas de milho para ensilagem. Vinte e quatro novilhas holandesas foram alojadas em baias individuais com piso de concreto (2 × 3 m) com cocho e bebedouro. O período de confinamento foi de 67 dias, sendo 7 dias de adaptação às instalações e 60 dias de comparação das dietas experimentais. Os consumos de matéria seca (MS), fibra em detergente neutro (FDN) e FDN indigestível foram semelhantes entre os tratamentos. A adição do PIP na cultura do milho causou aumento na digestibilidade aparente no trato total da FDN, conseqüentemente aumentando a digestibilidade aparente de MS. Em conclusão, o PIP não foi capaz de alterar o consumo e o ganho de peso de novilhas leiteiras em relação ao tratamento controle, embora tenha aumentado a digestibilidade aparente da fibra no trato total. Mais estudos são necessários para entender os mecanismos de ação do PIP em plantas de milho destinadas à silagem e as conseqüências no desempenho de animais.

**Palavras-chave:** digestibilidade, fibra, lignina, inibidor enzimático.

## INTRODUÇÃO

Dentre as forragens conservadas, a silagem de planta inteira de milho (*Zea mays* L.) é a mais utilizada nos sistemas de produção de ruminantes no Brasil (Bernardes e Rêgo, 2014; Oliveira e Millen, 2014) e no mundo (Wilkinson e Toivonen, 2003). A cultura do milho possui alta produtividade, alto teor de energia e ótima ensilabilidade, comparativamente a outras fontes de forragem, resultando em excelente potencial para produzir leite e carne.

A maior parte da planta de milho é constituída por fibra em detergente neutro (FDN) e amido. Os grãos de milho têm participação importante da planta inteira de milho, com cerca de 65% de energia, o conteúdo celular da fração vegetativa com 10%, e a fibra (FDN) com 25%, dependendo da composição da planta (Mahanna *et al.*, 2014). Então, quanto maior a proporção de grãos e quanto maior a digestibilidade da FDN, maior o valor nutricional da silagem. Além de alterar a disponibilidade de energia por kg de MS, a digestibilidade da FDN também tem função de regulação do consumo de matéria seca (CMS). Na revisão de Allen (2000), foi observado que cada aumento de uma unidade percentual na digestibilidade da FDN da forragem (*in vitro* ou *in situ*) esteve associado ao aumento de 0,17 kg de consumo de matéria seca (CMS) e 0,25 kg de produção de leite corrigido para 4% de gordura.

A FDN é composta por polímeros da parede celular vegetal, compreendendo principalmente celulose, hemicelulose e lignina (Van Soest e Wine, 1967). Em geral, a FDN constitui a fração de digestão mais lenta ou indigestível, e que ocupa espaço no trato digestório. A FDN desempenha papel crucial na dieta dos ruminantes, sendo um dos componentes primordiais para manter a produção e a saúde dos animais. Suas características físicas e químicas têm impacto direto na fisiologia digestiva do rúmen, influenciando significativamente o consumo de energia pelos animais (Van Soest, 1994).

Há décadas, a lignina tem sido reconhecida como o principal impedimento à digestão de fibra (Van Soest, 1994). A lignina é um composto fenólico que atua como barreira física contra o ataque dos microrganismos sobre a parede celular vegetal. Sua ligação, principalmente com os polissacarídeos da parede celular (Halpin, 2019), os deixa indisponíveis para degradação ruminal (Raffrenato *et al.* 2017).

Uma estratégia promissora para minimizar o impacto negativo da lignina na digestibilidade da fibra das forragens é a aplicação do ácido piperonílico (PIP). O PIP atua como inibidor da enzima cinamato-4-hidroxilase (C4H) na via dos fenilpropanoides, regulando a biossíntese dos monômeros de lignina e alterando a estrutura desse polímero na parede celular (Ralph *et al.* 1998), podendo ser utilizado nas plantas de milho destinadas à ensilagem. Essa modificação pode facilitar a ação das hidrolases (Graber *et al.* 1998). Estudos conduzidos com aplicação de PIP por aspersão foliar em plantas jovens de milho induziram melhoria da sacarificação da biomassa, avaliada por análises de digestibilidade enzimática. Após 30 dias do tratamento com PIP em comparação ao controle, observou-se aumento de 27% e 10% na sacarificação do colmo e das folhas, respectivamente, em testes de 4 e 24 horas, utilizando

celulases de um coquetel celulolítico comercial (Novozymes® - NS 22086) (W.D. Santos, dados não publicados). Entretanto, ainda não foram realizados estudos de campo para avaliar os efeitos do PIP na composição e valor nutricional da silagem de planta inteira de milho destinada à alimentação animal.

Assim, o objetivo deste estudo é que com a aplicação do PIP, altere a deposição da lignina, pois o PIP atua na regulação da biossíntese dos monômeros de lignina modificando a estrutura deste polímero. Conseqüentemente, deve aumentar a digestibilidade da FDN e o desempenho animal.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental de Iguatemi da Universidade Estadual de Maringá – UEM. Os procedimentos de cuidado e manejo dos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (número de protocolo 5112250722).

### *Ensilagem*

Para a produção das silagens, foi utilizado o híbrido de milho JM 2M91PRO3 (Jmen - Orlândia-SP). O plantio do milho foi realizado em linhas simples com 90 cm de espaçamento entrelinhas e 5 sementes por metro linear, em 4 parcelas de 0,5 ha (dois blocos com duas parcelas cada bloco), totalizando 2 ha. Após 30 d da emergência das plantas de milho, o PIP foi aplicado em duas parcelas (uma parcela de cada bloco), a uma concentração final de 3 µM, num volume total de 180 L/ha. Para obtenção da solução final de PIP, inicialmente foi preparado 20 L de uma solução stock com concentração de 30 µM de PIP, que foi diluída em 180 L de calda (H<sub>2</sub>O + Aureo® como adjuvante) diretamente no tanque do pulverizador para concentração final de 3 µM. O sistema de pulverização utilizado foi o de barra com múltiplos bicos de pulverização, acoplado ao sistema hidráulico do trator. A cultura do milho foi colhida quando as plantas atingiram aproximadamente 35% de MS, com colhedora de forragem tracionada por trator, regulada para picagem em tamanho teórico de partículas de 10 mm. Os tratamentos foram colhidos alternadamente com a mesma colhedora e o material picado foi depositado separadamente em dois silos tipo trincheira, com as seguintes dimensões: 4 m de largura, 1,5 m de altura, 14 m de comprimento. Após 35 dias de armazenamento, os silos foram abertos para alimentação dos animais.

Vinte e quatro novilhas holandesas com peso corporal médio de  $209 \pm 91$  kg foram alojadas em baias individuais com piso de concreto ( $2 \times 3$  m) com cocho coberto e bebedouro. Durante 7 d, todos os animais receberam a mesma dieta contendo 80% de silagem de milho não experimental e 20% de concentrados. Ao final dos 7 d, as novilhas foram pesadas após 16 h de jejum de sólidos noturno, agrupadas pelo peso corporal (i.e., peso em jejum inicial) em 12 blocos com 2 novilhas por bloco, e distribuídas de forma aleatória entre os dois tratamentos (controle ou PIP). As dietas experimentais foram compostas (% MS) por 80% silagem de milho (controle ou PIP), 17,5% farelo de soja e 2,5% premix mineral-vitamínico. A composição das dietas experimentais é apresentada na Tabela 1. Os ingredientes da dieta foram misturados manualmente duas vezes ao dia, imediatamente antes de cada refeição, às 9h e 15h. O período de comparação de tratamentos foi de 60 d.

### ***Avaliações nas silagens***

No decorrer da retirada das silagens, foram coletadas amostras frescas para determinação de pH, produtos de fermentação e contagens microbianas. Para isso, foi preparado extrato aquoso (25 g de silagem + 225 mL de água destilada) misturado em liquidificador por 1 min. Após filtração em 4 camadas de pano de gaze, o pH da silagem foi medido com pHmetro digital (Tec5, Tecnal®, Piracicaba, Brasil). Uma alíquota do extrato aquoso foi diluída em série ( $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ ) para enumeração de microrganismos em meio seletivo. Outra porção do extrato foi centrifugada a  $12.000 \times g$  por 20 min e o sobrenadante utilizado para análise dos produtos da fermentação.

Para contagem de leveduras e fungos foi utilizado o meio MEA (Malt Extract Agar – M137, Himedia, Mumbai, Índia) acidificado a pH 3,5 com ácido láctico e para as bactérias ácido lácticas o MRS (Lactobacilli MRS Agar – 7543A, Acumedia, Lansing, Michigan, USA) com adição de nistatina (400.000 UI/L). As placas foram incubadas aerobicamente a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 2, 3 e 4 dias para contagem de bactérias ácidas lácticas, leveduras e bolores, respectivamente. As unidades formadoras de colônias foram transformadas e expressas em log UFC/g.

As concentrações de ácido láctico (Pryce, 1969) e amônia (Chaney e Marbach, 1962) foram quantificadas por métodos colorimétricos. As concentrações de ácidos graxos voláteis, álcoois, ésteres e acetona foram determinadas por cromatografia gasosa, conforme descrito em Moraes *et al.* (2023).

### ***Avaliações nos animais***

O consumo de matéria seca foi mensurado diariamente, computando a quantidade de MS de ração ofertada subtraída da quantidade de MS de sobras. Amostras de alimentos e sobras foram coletadas diariamente, conservadas em freezer e combinadas para formar uma amostra composta por semana. No início e ao final do período de comparação os animais foram pesados após 16 h de jejum de sólidos noturno e então realizadas medidas de altura de cernelha, altura de garupa, circunferência torácica e escore de condição corporal. O ganho de peso médio diário foi determinado pela diferença entre o peso em jejum final e o peso em jejum inicial dividida pelo número de dias de comparação. O ganho em dimensões corporais foi computado da mesma forma.

O comportamento ingestivo foi registrado na 3<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semana, por um período consecutivo de 24 h. Em intervalos de 5 min foram anotadas as atividades de ingestão e ruminação. O tempo total de mastigação foi obtido pela soma dos tempos de ingestão e ruminação.

Na 4<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> semana de comparação foram realizadas coletas de fezes e sangue de cada animal. Em cada ocasião, as fezes foram coletadas por 5 dias consecutivos, três vezes ao dia, e no dia subsequente ao término das coletas de fezes, foi realizada a coleta de sangue. A digestibilidade aparente no trato total foi estimada utilizando FDN indigestível (FDNi) como marcador interno, obtido por incubação *in situ* por 288 h em vacas canuladas no rúmen (Huhtanen *et al.*, 1994). O consumo de matéria orgânica (MO) digestível (MOd) foi estimada multiplicando o consumo de MO pela sua digestibilidade aparente. O sangue foi coletado por punção da veia jugular externa, aproximadamente 4 h após a alimentação matutina. Nas amostras de sangue foram determinados os teores de ureia e glicose utilizando kits comerciais de ensaios enzimáticos colorimétricos (Glicose PP e Ureia PP; Gold Analisa Diagnóstico LTDA) e leitura em espectrofotômetro (Bioplus 2000®, São Paulo, SP).

### ***Composição química e digestibilidade in vitro***

As amostras de alimentos, sobras e fezes foram desidratadas por 72 h em estufa a 60°C e moída em moído tipo Wiley provido de peneira com poro de 1 mm. Subamostras foram utilizadas para determinação do teor de matéria seca a 105°C, cinzas, PB e extrato etéreo (AOAC, 1990), FDN (Mertens, 2002), FDA (Van Soest *et al.*, 1973), FDN indigestível (Huhtanen *et al.*, 1994) e carboidratos solúveis (Hall *et al.*, 1999). O teor de MO foi obtido

como 100 - cinzas. O teor de carboidratos não fibrosos (CNF) foi calculado como (NRC, 2001):  
 $CNF = 100 - PB - FDN - EE - cinzas$ .

Os coeficientes de digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) e da FDN (DIVFDN) foram determinados usando uma incubadora Daisy II, com soluções preparadas conforme descrito (Ankom Technology, Macedon, EUA).

### **Análise estatística**

Os dados foram primeiramente avaliados quanto a normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (teste de Bartlett). Na sequência, os dados foram analisados utilizando o procedimento MIXED do SAS (versão 9.4, SAS Institute, Cary, NC, EUA) adotando o seguinte modelo:

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

$\mu$  = média geral;

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

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

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

$e_{ij}$ : resíduo.

As diferenças foram declaradas significativas se  $P \leq 0,05$ , e as tendências foram indicadas se  $0,05 < P \leq 0,10$ .

## **RESULTADOS**

As características das silagens são apresentadas na Tabela 2. A MS, MO e PB foram semelhantes entre os tratamentos, bem como as concentrações de FDN e FDA. O PIP não alterou o CMS, consumo de MO, consumo de FDN e consumo de FDNi (Tabela 3). Os tempos de ingestão, ruminação e mastigação e a taxa de ingestão foram semelhantes entre os tratamentos. O ganho de peso e as alterações em altura de cernelha, altura de garupa e circunferência torácica não foram afetados pelos tratamentos.

Não foi observado efeito de tratamento para as concentrações sanguíneas de glicose e ureia (Tabela 4). Entretanto, o tratamento da cultura do milho com PIP resultou em aumento da digestibilidade aparente no trato total da FDN de 57,2% para 59,8%. Conseqüentemente, a digestibilidade aparente de MS e MO e o NDT foram maiores para o tratamento PIP em relação ao controle (Tabela 2).

## DISCUSSÃO

Dos componentes da planta de milho a lignina é conhecida como principal impedimento a digestão de fibra (Van Soest, 1994), pois limita o acesso de enzimas ao substrato presente nesta matriz (Wang e McAllister, 2002). Neste estudo foi avaliado, pela primeira vez, o efeito do PIP como estratégia para melhorar a digestibilidade da fibra da silagem de milho. O PIP, é um inibidor *quasi*-irreversível da cinamato 4-hidroxilase que catalisa o segundo passo da via dos fenilpropanoides, responsável pela produção de lignina e outros compostos fenólicos (Ralph *et al.* 1998). Recentemente, Dos Santos (2023) demonstrou que o PIP aplicado às culturas da cana-de-açúcar, *Urochloa decumbens* e soja induziu melhora na sacarificação de resíduos lignocelulósicos dessas culturas, sem prejuízo à sanidade das plantas e à produtividade. Oliveira *et al.* (2023) também relataram que a aplicação de PIP na concentração de 0,50  $\mu\text{molL}^{-1}$  na cultura da cana-de-açúcar melhorou em 109,93% a sacarificação do bagaço.

No presente estudo, o PIP não foi capaz de alterar significativamente a deposição de lignina na cultura do milho, mas curiosamente induziu aumento da digestibilidade *in vivo* da FDN no trato total das novilhas. Como consequência da maior digestibilidade da FDN, o tratamento PIP resultou em aumento da digestibilidade aparente *in vivo* da MS e da MO das dietas. Em estudo recente de Dos Santos (2023), a aplicação de inibidores enzimáticos de lignificação ácido piperonílico (PIP), ácido metilenodioxicinâmico (MDCA) e daidzin (DZN), induziram maior lignificação em fibras e vasos e provavelmente reduziu lignificação no parênquima dos colmos, logo induzindo alterações de lignificação em tecidos específicos. Enquanto a parede celular dos vasos apresentou aumento no teor de lignina, a parede celular do parênquima apresentou tendência de diminuição do teor de lignina. Esta indução em tecido específico pode explicar como o tratamento com inibidores de lignina foi capaz de aumentar a sacarificação, sem afetar o conteúdo médio de lignina das plantas. Tal característica pode ser considerada desejável para os sistemas produtivos, visto que neste caso é possível obter plantas com fibra mais digestível e assegurar produtividade normal da cultura.

A digestibilidade da FDN é um indicador importante da qualidade da silagem de milho, tendo impacto direto no desempenho animal e na eficiência produtiva. Oba e Allen (2000) reportaram que o aumento de uma unidade percentual na digestibilidade da FDN de forragem (*in vitro* ou *in situ*) foi associado ao aumento de 0,17 kg de CMS e 0,25 kg de leite corrigido para 4% de gordura em vacas leiteiras. A FDN é composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, que são componentes estruturais das plantas. Quanto mais digestível a FDN, maior a disponibilidade de nutrientes para os microrganismos do trato digestório e menor será o efeito de enchimento físico do trato digestório, possibilitando, em última análise, maior aporte de nutrientes para os animais, e menor excreção de nutrientes nas fezes (Van Soest, 1994).

No presente experimento, apesar do aumento na digestibilidade da FDN, MO e MS da dieta PIP, não houve alteração das variáveis de consumo de MS, consumo de MO, consumo de FDN e no desempenho animal, como ganho de peso e eficiência alimentar. Possíveis causas para a ausência de efeito nestas variáveis incluem principalmente o tipo de animal e o tipo de dieta avaliados no experimento. Assim, maior digestibilidade da dieta não necessariamente é convertida em aumento de desempenho animal. A eficiência de conversão depende de vários fatores internos ao animal, como a capacidade de metabolização dos nutrientes, e externos, como manejo e condições ambientais. Se o balanço energético do animal já estiver adequado para manutenção e produção, o aumento na digestibilidade pode não resultar em mais energia disponível para ganho de peso ou produção adicional. O ganho de peso considerado elevado para esta categoria animal consumindo este tipo de dieta sugere que mesmo no tratamento controle, o fluxo de nutrientes para o metabolismo animal era elevado. O número relativamente limitado de animais por tratamento ( $n = 12$ ) também pode ter limitado a detecção de diferenças estatísticas entre os tratamentos para as variáveis associadas ao desempenho.

## CONCLUSÃO

A adição do PIP nas plantas de milho destinadas a silagem não alterou o consumo de alimentos e desempenho das novilhas leiteiras. Entretanto, apesar de não ter alterado o conteúdo

total de lignina nas silagens, o PIP aumentou a digestibilidade do trato total de FDN, e consequentemente aumentou a digestibilidade de MS e MO. Mais estudos são necessários para entender os mecanismos de ação do PIP em plantas de milho destinadas à silagem e suas consequências no desempenho de animais.

## REFERÊNCIAS

- A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed, Assoc. Off Anal. Chem., Washington, DC.
- Allen, M. S. 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 83:598–1624. Doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75030-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75030-2)
- Bernardes, T. F., and A. C. do Rêgo. 2014. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 97:1852–1861. Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7181>.
- Chaney, A. L., and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry*. 8:130–132.
- Dos Santos, W. D., M. L. L. Ferrarese, and O. Ferrarese-Filho. 2008. Ferulic Acid: An Allelochemical Troublemaker. *Functional Plant Science and Biotechnology*. 2:47– 55. Disponível em: [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/OnlineFPSB\\_2\\_1.html](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/OnlineFPSB_2_1.html).
- Dos Santos, W. D., D. E. R. Gonzaga, V. H. Salvador, D. L. Freitas, B. M. Joia, D. M. Oliveira, D. C. C. Leite, G. S. Bido, A. Finger-Teixeira, A. P. De Souza, M. L. T. M. Polizeli, R. P. Constantin, R. Marchiosi, F. A. Rios, O. Ferrarese-Filho, and M. S. Buckridge. 2023. Natural lignin modulators improve lignocellulose saccharification of field-grown sugarcane, soybean, and brachiaria. *Biomass and Bioenergy*. 168:106684. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2022.106684>.
- Grabber, J. H., J. Ralph, and R. D. Hatfield. 1998. Ferulate Cross-Links Limit the Enzymatic Degradation of Synthetically Lignified Primary Walls of Maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46:2609–2614. Doi: <https://doi.org/10.1021/jf9800099>.

- Hall, M. B., W. H. Hoover, J. P. Jennings, and T. K. Miller Webster. 1999. A method for partitioning neutral detergent-soluble carbohydrates. *J Sci Food Agric.* 79:2079–2086.
- Halpin, C. 2019. Lignin engineering to improve saccharification and digestibility in grasses. *Current Opinion in Biotechnology*, 56:223–229. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.013>.
- Huhtanen, P., K. Kaustell, and S. Jaakkola. 1994. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48:211–227. Doi:10.1016/0377- 8401(94)90173-2.
- Mahanna, B., B. Seglar, F. Owens, S. Dennis, and R. Newell. 2014. Silage zone manual. DuPont Pioneer. Johnston, IA. Disponível em: [https://www.pioneer.com/CMRoot/Pioneer/US/Non\\_Searchable/programs\\_services/earn-the-right/SilageZoneManual-2nd-Edition.pdf](https://www.pioneer.com/CMRoot/Pioneer/US/Non_Searchable/programs_services/earn-the-right/SilageZoneManual-2nd-Edition.pdf).
- Martarello, D. C. I., A. M. Almeida, R. C. Sinzker, and D. M. Oliveira. 2021. The Known Unknowns in Lignin Biosynthesis and its Engineering to Improve Lignocellulosic Saccharification Efficiency, Biomass Conversion and Biorefinery. 13:2497–2515. Doi: 10.1007/s13399-021-01291-6.
- Mc Donald, P., R. A. Edwards, J. F. D. Greenhalgh, and C. A. Morgan. 2011. *Animal Nutrition*. 7th ed.
- Mertens, D. R. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *J AOAC Int.* 85:1217–1240.
- Mota, T. R., W. R. De Souza, D. M. Oliveira, P. K. Martins, B. L. Sampaio, F. Vinecky, A. P. Ribeiro, K. E. Duarte, T. F. Pacheco, N. K. V. Monteiro, R. B. Campanha, R. Marchiosi, D. S. Vieira, A. K. Kobayashi, P. A. O. Molinari, O. Ferrarese-Filho, R. A. C. Mitchell, H. B. C. Molinari, and W. D. Dos Santos. 2021. Suppression of a BAHD acyltransferase decreases p-coumaroyl on arabinoxylan and improves biomass digestibility in the model grass *Setaria viridis*. *Plant J.* 105:136–150. <https://doi.org/10.1111/tpj.15046>.
- NRC. 2001. *Nutrient Requirements of dairy cattle*. 7th ver. Ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Oba, M., and M. S. Allen. 2000. Effects of brown midrib 3 mutation in corn silage on productivity of dairy cows fed two concentrations of dietary neutral detergent fiber: 1.

- Feeding behavior and nutrient utilization. *J. Dairy Sci.* 83:1333–1341. Doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75000-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75000-4).
- Oliveira, C. A., and D. D. Millen. 2014. Survey of the nutritional recommendations and management practices adopted by feedlot cattle nutritionists in Brazil. *Animal Feed Science and Technology*. 197:64–75. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.08.010>.
- Oliveira, V. F., L. Figueiredo, G. O. Correia, M. F. P. S. Machado, H. Z. Neto, W. D. Dos Santos, and C. A. Mangolin. 2023. Natural lignin modulators improve bagasse saccharification of sugarcane and energy cane in field trials. *GCB Bioenergy*. 15:1465–1476. Doi: <https://doi.org/10.1111/gcbb.13108>.
- Pryce, J. D. 1969. A modification of the Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. *Analyst*. 94:1151–1152.
- Raffrenato, E., R. Fievisohn, K. W. Cotanch, R. J. Grant, L. E. Chase, and M. E. Van Amburgh. 2017. Effect of lignin linkages with other plant cell wall components on in vitro and in vivo neutral detergent fiber digestibility and rate of digestion of grass forages. *J. Dairy Science*. 100:8119–8131. Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12364>.
- Ralph, J. 1998. 3D NMR experiments for use in cell wall research Madison: United States Department of Agriculture. Dairy Forage Research Center. Research Summaries, 46–50.
- Ralph, J., R. D. Hatfield, J. H. Grabber, H. G. Jung, S. Quideau, and R. F. Helm. 1998. Cell wall cross-linking in grasses by ferulates and diferulates. Pages 209–236 in *Lignin and Lignan Biosynthesis*, Lewis, N. G. and S. Sarkanen. American Chemical Society, Washington, DC.
- Sauvanta, D., P. Schmidely, J. J. Daudin, and N. R. St-Pierre. 2008. Meta-analyses of experimental data in animal nutrition. *Animal*. 2:1203–1214. Doi: <https://doi.org/10.1017/S1751731108002280>.
- Schalk, M., F. Cabello-Hurtado, M. A. Pierrel, R. Atanossova, P. Saindrenan, D. Werck-Reichhart. 1998. Piperonylic acid, a selective, mechanism-based inactivator of the trans-cinnamate 4-hydroxylase: a new tool to control the flux of metabolites in the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiol*. 118:209–218. Doi: <https://doi.org/10.1104/pp.118.1.209>.

- Van Soest, P. J. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant. 2nd ed. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Van Soest, P. J., and R. H. Wine. 1967. Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds, IV. Determination of Plant Cell-Wall Constituents. Journal of Association of Official Analytical Chemists. 50:50–55. Doi: <https://doi.org/10.1093/jaoac/50.1.50>.
- Wang, Y., and T. A. McAllister. 2002. Rumen Microbes, Enzymes and Feed Digestion-A Review. Asian-Australasian J. Animal Sci. 15:1659–1676. Doi: <https://doi.org/10.5713/ajas.2002.1659>.
- Wilkinson, J. M., and M. I. Toivonen. 2003. World Silage – A Survey of Forage Conservation Around the World. Chalcombe Publications. Lincoln, UK.

## TABELAS

**Tabela 1.** Composição das dietas experimentais.

---

<i>Ingredientes</i>	<i>%MS</i>
---------------------	------------

---

Silagem de milho	84,33
Farelo de Soja	12,95
Ureia	0,40
Calcário calcítico	0,32
Premix mineral e vitamínico	2,00
<i>Nutrientes %MN</i>	
Matéria seca	41,80
Proteína bruta	13,50
Extrato etéreo	2,89
Fibra em detergente neutro	43,72
Matéria mineral	6,78
Carboidrato não fibrosos	33,83

**Tabela 2.** Características das silagens de milho.

Item <sup>2</sup>	Tratamento <sup>1</sup>	
	CON	PIP

Bactéria ácido láctica, log ufc/g	7,16 ± 0,06	7,10 ± 0,09
Fungo, log ufc/g	5,63 ± 0,72	6,57 ± 0,44
Leveduras, log ufc/g	6,34 ± 0,31	6,82 ± 0,09
MS, % MV	38 ± 0	41 ± 0
MM, % MS	3,71 ± 0,22	3,93 ± 0,63
PB, % MS	6,90 ± 0,21	6,97 ± 0,16
EE, % MS	3,12 ± 0,07	3,39 ± 0,31
CS, % MS	1,52 ± 0,01	1,64 ± 0,03
FDN, % MS	53,3 ± 4,13	49,4 ± 3,16
FDA, % MS	27,1 ± 2,82	25,4 ± 2,13
FDNi % MS	13,06 ± 0,72	13,02 ± 1,36
Lignina permanganato, % MS	2,04 ± 0,42	1,97 ± 0,52
Lignina hidrólise ácida, % MS	1,83 ± 0,54	1,86 ± 0,64
DIVMS, % MS	69,18 ± 1,40	69,83 ± 0,79
<i>Perfil de fermentação</i>		
pH	3,96 ± 0,09	4,07 ± 0,08
N-NH <sub>3</sub> , % N	7,96 ± 0,73	7,86 ± 1,38
Ácido láctico, % MS	4,32 ± 0,88	4,23 ± 0,79
Etanol, % MS	0,715 ± 0,274	0,639 ± 0,139
Ácido acético, % MS	2,79 ± 2,041	2,97 ± 1,978
Ácido propiônico, % MS	0,110 ± 0,118	0,156 ± 0,128
2,3-Butanodiol, % MS	0,156 ± 0,072	0,170 ± 0,053
1,2 – Propanodiol, % MS	0,666 ± 0,804	0,583 ± 0,603

<sup>1</sup>CON: controle - sem adição de ácido piperonílico; PIP: com adição de ácido piperonílico:

<sup>2</sup>MS: matéria seca; MM: matéria mineral; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; FDNi: fibra em detergente indigestível; DIVMS: digestibilidade *in vitro* da matéria seca; CS: carboidrato solúvel; pH: potencial Hidrogeniônico; N-NH<sub>3</sub>: nitrogênio amoniacal.

**Tabela 3.** Efeito do ácido piperonílico no comportamento alimentar e no crescimento de novilhas leiteiras.

Item <sup>2</sup>	Tratamento <sup>1</sup>			P-valor
	CON	PIP	EPM <sup>3</sup>	
CMS, kg/d	8,06	7,47	0,458	0,389
CMS, kg/100 PV	3,38	3,28	0,167	0,673
CMOd, kg/d	4,90	4,90	0,143	0,987
CFDN, kg/d	3,85	3,70	0,112	0,367
CFDNd, kg/d	2,20	2,21	0,065	0,921
CFDNi, kd/d	0,820	0,753	0,0237	0,055
Ingestão, min/d	278	281	7,76	0,801
Ingestão, min/kg MS	43,6	38,2	4,41	0,421
Ruminação, min/d	492	512	14,6	0,351
Ruminação, min/kg MS	78,5	67,7	7,11	0,319
Mastigação, min/d	770	793	16,3	0,335
Mastigação, min/kg MS	122	106	11,46	0,353
Taxa de ingestão min/g/	28,3	28,0	2,47	0,927
<i>Desempenho animal<sup>4</sup></i>				
PV inicial, kg	216	215	8,80	0,967
PV final, kg	265	261	8,56	0,767
GMD, kg/d	1,23	1,28	0,060	0,589
CTi, cm/d	135	134	2,72	0,664
CTf cm/d	144	142	2,225	0,470
GCT, cm/d	0,195	0,208	0,024	0,691
ACi, cm/d	112	109	1,525	0,132
ACf, cm/d	119	117	1,628	0,471
GAC, cm/d	0,169	0,215	0,021	0,143
AGi, cm/d	116	115	2,11	0,756
AGf, cm/d	123	121	1,585	0,611
GAG, cm/d	0,169	0,164	0,029	0,893
Eficiência alimentar	0,167	0,180	0,0148	0,560

<sup>1</sup>CON: controle – sem adição de ácido piperonílico; PIP: com adição de ácido piperonílico;

<sup>2</sup>CMS: consumo de matéria seca; CMOd: consumo de matéria orgânica digestível; CFDN: consumo de fibra em detergente neutro; CFDNd: consumo de fibra em detergente neutro digestível; CFDNi: consumo de fibra em detergente neutro indigestível;

<sup>3</sup>EPM: Erro Padrão da Média;

<sup>4</sup>PV: peso vivo; GMD: ganho médio diário; CTi: circunferência torácica inicial; CTf: circunferência torácica final; GCT: ganho de circunferência torácica; ACi: altura de cernelha inicial; ACf: altura de cernelha final; GAC: ganho de altura de cernelha; AGi: altura de garupa inicial; AGf: altura de garupa final; GAG: ganho de altura de garupa.

**Tabela 4.** Digestibilidade aparente no trato total e parâmetros sanguíneos de novilhas leiteiras alimentadas com silagem de milho tratada com ácido piperonílico.

Item <sup>2</sup>	Tratamento <sup>1</sup>		EPM <sup>3</sup>	P-valor
	CON	PIP		
<i>Digestibilidade aparente, %</i>				
MS	63,7	65,8	0,409	0,001
MO	65,7	67,7	0,440	0,003
PB	63,8	64,3	0,566	0,153
FDN	57,2	59,8	0,472	<0,001
EE	80,1	80,7	0,886	0,636
CNF	79,4	80,9	0,711	0,144
NDT	64,0	66,0	0,424	0,002
Fezes, % MS	14,9	14,7	0,269	0,448
<i>Parâmetros Sanguíneos</i>				
Glicose, mg/dL	80,6	83,1	2,51	0,524
Ureia, mg/dL	34,9	34,2	1,68	0,771

<sup>1</sup>CON: controle – sem adição de ácido piperonílico; PIP: com adição de ácido piperonílico;

<sup>2</sup>MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; EE: extrato etéreo; CNF: carboidratos não fibrosos; NDT: nutrientes digestíveis totais.