



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS



PPGCARP

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
E RECURSOS PESQUEIROS

**SILAGEM DE MILHO GRÃO REIDRATADO SUBMETIDO A NÍVEIS
CRESCENTES DE PEPSINA ABERTO EM DIFERENTES TEMPOS**

DANIEL PARENTE BARBOSA

MANAUS – AMAZONAS

Dezembro, 2021

DANIEL PARENTE BARBOSA

**SILAGEM DE MILHO GRÃO REIDRATADO SUBMETIDO A NÍVEIS
CRESCENTES DE PEPSINA ABERTO EM DIFERENTES TEMPOS**

Orientador: Ronaldo Francisco de Lima, Dr

Coorientadores: Marcos Vinícius de Castro Ferraz Júnior, Dr

Silvia Katrine Silva Escher, Dra

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros - PPGCARP da Universidade Federal do Amazonas-UFAM como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros.

MANAUS - AMAZONAS

Dezembro, 2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

B238s Barbosa, Daniel Parente
 Silagem de milho grão reidratado submetido a níveis crescentes
 de pepsina aberto em diferentes tempos / Daniel Parente Barbosa .
 2021
 44 f.: 31 cm.

 Orientador: Ronaldo Francisco de Lima
 Coorientador: Marcos Vinícius de Castro Ferraz Júnior
 Coorientadora: Silvia Katrine Silva Escher
 Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Recursos
 Pesqueiros) - Universidade Federal do Amazonas.

 1. Flint. 2. Nutrição animal. 3. Protease. 4. Degradabilidade. I.
 Lima, Ronaldo Francisco de. II. Universidade Federal do Amazonas
 III. Título

DANIEL PARENTE BARBOSA

**Silagem de milho grão reidratado submetido a níveis crescentes de pepsina
aberto em diferentes tempos**

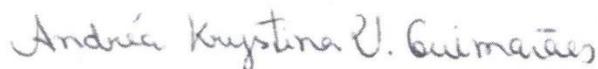
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, área de concentração em Produção Animal.

Aprovado em 13 de dezembro de 2021.

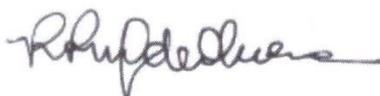
BANCA EXAMINADORA



Dr. Ronaldo Francisco de Lima – Presidente
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA



Dra. Andréa Krystyna Vinente Guimarães – Membro
Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA



Dra. Roseane Pinto Martins de Oliveira – Membro
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Auricleide de Aguiar Parente Barbosa e Vanilson Figueira Barbosa

Ao meu irmão Vinícius Parente Barbosa

À minha tia Raimunda Ana de Aguiar

À minha namorada Yasmin dos Santos Picanço

por todo amor e incentivo de todos vocês para o meu crescimento pessoal e profissional.

À todos que estiveram comigo nessa caminhada, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo dom da vida, pela proteção, por sempre iluminar meu caminho, por me dar força, sabedoria e determinação em todos os momentos de minha caminhada.

Aos meus pais, Auricleide de Aguiar Parente Barbosa e Vanilson Figueira Barbosa, minha tia Raimunda Ana de Aguiar e meu irmão Vinícius Parente Barbosa por todo amor, apoio, preocupação em todos os momentos, sejam eles alegres ou difíceis. Vocês são meu maior orgulho.

À minha namorada Yasmin dos Santos Picanço, por estar ao meu lado e me apoiando em todos os momentos. Você é minha parceira da vida, minha melhor amiga e quem eu posso contar com tudo.

Ao meu amigo Carlos Manoel, por escutar meus desabafos e ter a sensibilidade de tirar humor de todas as situações por mais difíceis que fossem.

À minha amiga Adriana Tapajós que, fizesse chuva ou sol, estava todos os dias no laboratório me ajudando no que fosse preciso.

Aos meus amigos do mestrado, em especial a Carolina que me ajudou a seguir firme nessa caminhada.

Ao meu orientador Prof., Dr. Ronaldo Francisco de Lima que sempre esteve disposto a me auxiliar durante o estudo.

À Universidade Federal do Amazonas - UFAM pela oportunidade de seguir com meus estudos, me proporcionando conhecimento para o desenvolvimento profissional.

À Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA por disponibilizar o Laboratório de Bromatologia para este estudo.

À Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD por possibilitar a realização de parte das análises deste estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM pela concessão de bolsa de estudo durante parte do mestrado.

Aos grupo Ruminaleite por ter confeccionado os silos no início deste estudo.

À todos que contribuíram direta e indiretamente com esse trabalho.

MUITO OBRIGADO!

“A persistência é o menor caminho do êxito”

Charles Chaplin

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Matéria Seca da silagem de grãos de milho reidratados submetidos a diferentes níveis de Protease no decorrer de um período de 240 dias de ensilagem..... 19
- Figura 2.** Níveis de ph da silagem de grãos de milho reidratados submetidos a diferentes níveis de Protease no decorrer de um período de 240 dias de ensilagem..... 20
- Figura 3.** Nitrogênio amoniacal (% MS) de grãos de milho reidratados submetidos a diferentes níveis de Protease no decorrer de um período de 240 dias de ensilagem. 21
- Figura 4.** Proteína bruta da silagem de grãos de milho reidratados submetidos a diferentes níveis de Protease no decorrer de um período de 240 dias de ensilagem..... 22
- Figura 5.** Degradabilidade da silagem de grãos de milho reidratados submetidos a diferentes níveis de Protease no decorrer de um período de 240 dias de ensilagem..... 23
- Figura 6.** Prolamina zeína (% MS) da silagem de grãos de milho reidratados submetidos a diferentes níveis de Protease no decorrer de um período de 240 dias de ensilagem.....24
- Figura 7.** Concentração de amido (% MS) da silagem de grãos de milho reidratados submetidos a diferentes níveis de Protease no decorrer de um período de 240 dias de ensilagem..... 25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teores médios de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), nitrogênio amoniacal (NH ₃), pH, proteína zeína, amido e digestibilidade das silagens de milho grão reidratado submetidos a doses crescentes de enzima e abertos em diferentes tempos.....	18
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVOS	6
2.1. Objetivo Geral.....	6
2.2. Objetivos Específicos.....	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1. Produção de milho no Brasil e sua importância.....	7
3.2. Milho tipo Flint	7
3.3. Zeína, a prolamina do milho	9
3.4. Processamento do grão de milho.....	10
3.5. Silagem de milho grão reidratado	10
3.6. Uso de enzimas em silagens.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Localização	13
4.2. Confeção dos Silos.....	13
4.3. Delineamento	13
4.4. Análise Estatística.....	13
4.5. Análises químicas	14
4.5.1. Matéria Seca.....	14
4.5.2. pH.....	14
4.5.3. Nitrogênio Amoniacal	15
4.5.4. Proteína Bruta.....	15
4.5.5. Degradabilidade <i>in situ</i>	16
4.5.6. Prolamina Zeína	16
4.5.7. Amido.....	17
5. RESULTADOS	18
5.1. Matéria Seca.....	19
5.2. pH.....	20
5.3. Nitrogênio Amoniacal.....	21
5.4. Proteína Bruta.....	22
5.5. Degradabilidade	23
5.6. Prolamina Zeína	23
5.7. Amido.....	25
6. DISCUSSÃO.....	26
6.1. Matéria Seca.....	26
6.2. pH.....	26
6.3. Nitrogênio amoniacal	26
6.4. Degradabilidade	27
6.5. Prolamina Zeína e Proteína Bruta	28
6.6. Amido.....	29
7. CONCLUSÃO.....	29
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

Resumo

A digestibilidade do amido de milho está relacionada ao teor de prolamina do grão. O milho produzido no Brasil possui endosperma flint. O processo de ensilagem e utilização de proteases pode hidrolisar as prolaminas tornando o amido mais digestível. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar níveis crescentes da adição de enzima degradadoras de proteína (proteases) no milho grão moído reidratado e ensilado por diferentes tempos sob a digestibilidade do amido. Para o desenvolvimento do estudo, reidratou-se o milho seco moído à uma umidade de 40%, adicionados pepsina (Pepsina 1:10000) nas proporções de 0, 25, 50, 100 e 500g/tonelada de milho na matéria seca e ensilados por 0, 15, 30, 60, 120 e 240 dias em silos experimentais de sacos plásticos especiais e fechados a vácuo, com capacidade para aproximadamente 500 g de silagem. As variáveis analisadas foram matéria seca (MS), pH, teor de nitrogênio amoniacal (N Amoniacal), teor de proteína bruta (PB), teor de amido e teor de zeína (prolamina). As amostras apresentaram resultados positivos com relação ao tempo de ensilagem que aumentou a digestibilidade ruminal por 7 horas da matéria seca, reduzindo os níveis de proteína zeína com consequente aumento nos teores de nitrogênio amoniacal. Além disso, os resultados também mostraram que a adição de 50 gramas de pepsina por tonelada de silagem aumentou digestibilidade ruminal por 15 dias de ensilagem.

Palavras-chave: Flint. Nutrição animal. Protease. Degradabilidade.

Abstract

Corn starch digestibility is related to the grain's prolamine content. Corn produced in Brazil has flint endosperm. The ensiling process and the use of proteases can hydrolyze prolamines making starch more digestible. Thus, the objective of this work was to evaluate increasing levels of addition of protein-degrading enzymes (proteases) in ground corn rehydrated and ensiled for different times under starch digestibility. For the development of the study, ground dry corn was rehydrated at a moisture content of 40%, added pepsin (Pepsin 1:10000) in proportions of 0, 25, 50, 100 and 500g/ton of corn in dry matter and ensiled by 0, 15, 30, 60, 120 and 240 days in experimental silos of special plastic bags and vacuum closed, with a capacity of approximately 500 g of silage. The analyzed variables were dry matter (DM), pH, ammonia nitrogen content (N Ammoniacal), crude protein content (CP), starch content and zein content (prolamine). The samples showed positive results in relation to the ensiling time, which increased the ruminal digestibility of dry matter for 7 hours, reducing the zein protein levels with a consequent increase in the ammoniacal nitrogen contents. Furthermore, the results also showed that the addition of 50 grams of pepsin per ton of silage increased ruminal digestibility for 15 days of silage.

Keywords: Flint. Animal nutrition. Protease. Degradability.

1. Introdução

O milho representa a maior parte da dieta de ruminantes em sistemas que utilizam dietas com elevados teores energéticos (STONE *et al.*, 1996), sendo a principal fonte de amido utilizada e com seu aproveitamento dependente dos métodos de processamento a que são submetidos (THEURER, 1986). Logo, o processamento do milho serve para expor os grânulos de amido à digestão, formando fissuras, quebrando e expandindo o amido (BEAUCHEMIN *et al.*, 1994). O grão de milho em média apresenta 65 a 80% de amido, constituído de pericarpo, gérmen, ponta e endosperma. O endosperma do milho apresenta uma proporção farináceo e outra vítrea. Os grãos de milho com maior proporção de endosperma do tipo farináceo apresentam fisiologicamente grânulos de amido poroso de baixa densidade. Já os grãos do tipo duro ou *flint* possuem endosperma duro apresentando alta densidade (PAES, 2006).

O grão de milho com maior proporção de endosperma farináceo seria uma excelente opção devido a sua elevada digestibilidade ruminal, no entanto sua produção no Brasil se torna inviável, devido a sua alta susceptibilidade a ataques de pragas e doenças, assim nos confinamentos brasileiros o grão mais usado é do tipo duro, onde as suas características físicas e morfológicas propiciam maior resistência a pragas e doenças, tanto a campo quanto em condições de armazenamento (TEIXEIRA, 2015).

Esse cereal contém cerca de 72% de amido da matéria seca (HUNTINGTON, 1997), sendo fundamental otimizar sua digestibilidade para que este nutriente seja utilizado de forma eficiente (OWENS e SODERLUND, 2007). No entanto, a maioria dos híbridos brasileiros são de textura dura, caracterizado com endosperma flint o que lhe confere baixa digestibilidade comparado a híbridos de endosperma farináceo (CORRÊA *et al.*, 2002). Por esse motivo a digestibilidade do amido do milho é limitada por diversos fatores, principalmente pela presença de matriz proteica densa ao redor dos grânulos de amido que age como barreira à ação dos microrganismos ruminais. Essa característica está relacionada ao teor de proteínas prolaminas no endosperma desse cereal (HOFFMAN *et al.*, 2011). As prolaminas são proteínas associadas ao amido presentes em todos os cereais. São proteínas do endosperma com alta concentração do aminoácido prolina, esta que possui características altamente hidrofóbicas dessa forma, as proteínas com um elevado teor de prolina desenvolvem estruturas terciárias tornando sua quebra mais complexa (MOMANY *et al.*, 2006). No grão de milho, a prolamina recebe o nome proteínas zeínas e representam de 30 a 60% da proteína presente no grão (HAMAKER *et al.*, 1995). Dessa forma, o fato dessas proteínas possuírem características hidrofóbicas, reduz

significativamente o potencial de quebra do amido pelos microrganismos ruminais (FERRARETTO *et al.*, 2014).

Diversos métodos de processamento do grão de milho têm sido realizados afim de melhorar sua digestibilidade. A silagem de grão de milho com alta umidade, em processo final de maturação (30-40% de umidade) ou reidratação do milho em associação com a ensilagem, podem ser uma excelente alternativa no intuito de aumentar a digestibilidade do amido, considerando que os ácidos da fermentação ou o processo de proteólise podem degradar as prolaminas zeínas durante o processo fermentativo (BARON *et al.*, 1986).

A degradabilidade ruminal efetiva do amido presente nos grãos de milho tende a aumentar ao sofrer processos fermentativos como a ensilagem. Estudos apontam que a degradabilidade do amido em grãos de milho está em torno de 70,2% antes de ser ensilado, valor este considerado baixo quando comparados com os 92,3% apresentados após os grãos sofrerem o processo de ensilagem (JURJANZ e MONTEILS, 2005).

Apenas o processo de ensilagem já demonstra resultados positivos em relação a degradabilidade do amido no milho. No entanto, é possível aprofundar-se nesse estudo levando em consideração o tempo de ensilagem. A principal estrutura que impede a degradabilidade do amido é a prolamina, seguindo essa afirmação, entende-se que quanto menor a concentração dessas proteínas, maior será a degradabilidade do amido e os níveis dessa matriz proteica em silagens de grão de milho com alta umidade armazenadas por 240 dias apresentam redução quando comparadas com período de dias menores (HOFFMAN *et al.*, 2011).

A conservação de alimentos volumosos para os animais é realizada através da desidratação ou na forma de *in natura*. Os alimentos que sofrem o processo de desidratação ou secagem como o feno apresentam baixo teor de umidade e são mantidos em ambiente aeróbio. Enquanto que a forma *in natura* possui alto teor de umidade, devem ser mantidos em ambientes anaeróbio e ácido. A ensilagem é uma prática de conservação de alimentos realizada quando há uma alta disponibilidade de forragem que será utilizada principalmente em época de escassez de pastagens. Consiste no armazenamento da forragem *in natura*, mantendo a qualidade nutricional da planta, fornecendo condições adequadas para o desenvolvimento de microrganismos desejáveis para a produção de ácido lático além de inibir a ação de microrganismos indesejáveis capazes de causar a sua deterioração.

A qualidade da silagem é dependente do padrão de fermentação, que está relacionado com as características da planta no momento de ensilagem, tais como o teor de matéria seca (MS), o conteúdo de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) como proporção do N total, quantidade de

carboidratos solúveis (CHO) e o potencial hidrogeniônico (pH), além de práticas relacionadas ao processo de ensilagem como o manejo, a colheita e o armazenamento (TOMICCH *et al.*, 2003; VASCONCELOS *et al.*, 2005). A prática de conservação de gramíneas tropicais na forma de silagem apresenta algumas limitações. Segundo Silva *et al.*, (2015) a ensilagem apresenta baixo valor nutritivo, em função dos baixos conteúdos de matéria seca, carboidratos solúveis e alta capacidade tampão. Essas características resultam em silagens com fermentações inadequadas, de baixos teores de ácido láctico, alto pH e alto nitrogênio amoniacal, resultando em um volumoso de baixo valor nutritivo. Essas condições podem ser aprimoradas através do emurchecimento da forragem ao sol durante algumas horas ou a inclusão de aditivos na ensilagem.

A necessidade do conhecimento da digestibilidade dos alimentos utilizados na nutrição de ruminantes é importante para a formulação de rações que tenham como atender as exigências nutricionais de animais de alta produtividade. O método *in situ* consiste na incubação da amostra em sacos de tecido não tecido (TNT) no rúmen, necessitando de animais fistulados no rúmen (VALENTE *et al.*, 2011). É uma alternativa de avaliação da digestibilidade dos alimentos, pois viabiliza experimentos em nutrição de ruminantes em unidades experimentais com estrutura física e suporte financeiro reduzido.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

No contexto apresentado, o presente estudo teve o objetivo avaliar a ação da enzima protease na silagem de milho reidratado armazenada por diferentes períodos.

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram avaliar os efeitos do tempo de armazenamento e a adição de enzima protease sobre:

- 1) A composição químico-bromatológica da silagem de milho reidratado;
- 2) O nível de degradabilidade da silagem de milho reidratado;
- 3) O teor de nitrogênio amoniacal da silagem de milho reidratado;
- 4) O teor de amido da silagem de milho reidratado;
- 5) O teor de Prolamina da silagem de milho reidratado.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Produção de milho no Brasil e sua importância

O milho está entre os cereais mais cultivados do mundo, sua importância está atrelada ao fato de possuir um grande leque para sua utilização, desde a alimentação humana e animal até o seu uso na indústria de alta tecnologia. Na safra 2019/2020, o Brasil manteve o terceiro lugar na produção mundial, alcançando 102,4 milhões de toneladas com expectativa de recorde de produção para a safra de 2020/2021, estima-se que o Brasil produzirá aproximadamente 105,4 milhões de toneladas, um aumento de 2,6% em relação à safra anterior. Em termos de produção, o milho é o segundo colocado, ficando atrás apenas da cultura da soja (CONAB, 2020). A geração de números tão expressivos incentiva avanços significativos no entendimento de sua composição, tendo sido o milho vastamente estudado e melhorado geneticamente para atender ou otimizar os seus diversos usos finais (PAES, 2006; 2008).

O milho é uma das commodities que dominam o mercado agrícola nacional e internacional. Alguns estudos caracterizam a cultura como sendo estratégica para países de alta e baixa renda, sendo destinada para o mercado nacional e internacional (RELINGER, 2010). O seu uso, na alimentação animal, representa a maior parte do consumo no mundo, principalmente para a produção de rações. Na alimentação humana, o milho é consumido a partir de seus derivados, mas pode ser consumido sem ter sido processado anteriormente. Em propriedades com baixa renda, o seu consumo tem importância na subsistência, onde o consumo é realizado de forma direta, servindo como fonte de energia diária. O cultivo brasileiro divide-se entre primeira e segunda safra, tornando-se um diferencial quando comparado com outros países.

3.2. Milho tipo Flint

Como se sabe, o milho é muito utilizado em dietas para animais, e suas cultivares podem ser agrupadas de acordo com a textura do grão, correspondendo a: dentado ou mole "dent"; ou grão duro ou cristalino "flint". Além disso, ainda pode-se destacar os tipos semiduros e os semidentados, que apresentam características intermediárias.

Para melhor entendimento, o Ministério da Agricultura através da Instrução Normativa (IN) nº 60 de 22/12/2011 estabeleceu que a partir de setembro de 2013 o milho fosse classificado, baseado na consistência e formato do grão (MAPA, 2011):

I - Duro: quando apresentar o mínimo de 85% em peso de grãos com as características de duro, ou seja, apresentando endosperma predominantemente córneo, exibindo aspecto

vítreo; quanto ao formato, considera-se duro o grão que se apresentar predominantemente ovalado e com a coroa convexa e lisa;

II - Dentado: quando apresentar o mínimo de 85% em peso de grãos com as características de dentado, ou seja, com consistência parcial ou totalmente farinácea; quanto ao formato, considera-se dentado o grão que se apresentar predominantemente dentado com a coroa apresentando uma reentrância acentuada;

III - Semiduro: quando apresentar o mínimo de 85% em peso de grãos com consistência e formato intermediários entre duro e dentado; e

IV - Misturado: quando não estiver compreendido nos grupos anteriores, especificando-se no documento de classificação as percentagens da mistura de outros grupos.

Quando se fala em grãos duros, é importante frisar que são vantajosos por apresentarem boa armazenagem e qualidade de germinação, entretanto esse tipo de milho pode alcançar preços superiores no mercado. No que diz respeito ao mercado, verifica-se uma predominância de grãos semiduros (em torno de 58%), duros (em torno de 16%), e dentado ao redor de 7% (FILHO *et al.*, 2015).

No Brasil é predominante a utilização de grãos de milho do tipo duro, podendo também utilizar o termo “flint”, que se remete a principal característica do endosperma deste grão (SILVA *et al.*, 2018). A dureza é uma característica física que influencia na qualidade e no processamento dos grãos de milhos e a forma mais usada para a mensuração da dureza do grão é o seu nível de vitreosidade (FOX e MANLEY, 2009). Ou seja, a proporção de endosperma vítreo em relação ao endosperma total, obtida por dissecação dos grãos, é denominada de vitreosidade (CORREA *et al.*, 2002). Esse fator resulta em grãos lisos e mais arredondados, com uma aparência dura (PAES, 2006).

A predominância de alta vitreosidade do milho torna o amido menos disponível para a degradação, entretanto, quando é fornecido na forma de grão inteiro na dieta apresenta respostas positivas em estimular a mastigação e lenta taxa de passagem (TOLEDO, 2020). O grão de milho pode fornecer vários nutrientes ao animal, e quando se fala em valores nutricionais, 100g do milho flint contém cerca de 333kcal, 80g de carboidrato, 9,08g de proteína, 2,71g de gorduras totais, 9,0g de fibra, 323mg de cálcio e 1,8g de cinzas (ALBERNAZ, 2017).

3.3. Zeína, a prolamina do milho

A Zeína é a principal proteína presente no endosperma do milho e é uma classificação do grupo das prolaminas, caracterizadas pelo alto teor de aminoácidos apolares, conferindo estrutura molecular hidrofóbica, solúveis em álcool para sua extração (SHUKLA e CHERYAN, 2001). Além disso, sua concentração pode corresponder a até 60% do total de proteínas do grão de milho, sendo classificada segundo a sua similaridade em massa molecular, solubilidade em solventes e estrutura em quatro subclasses: alfa, beta, gama e delta, sendo geralmente a alfa-zeína presente em maior concentração, podendo também haver variações na composição em diferentes genótipos de milho. Dentro dessas subclasses, a alfazeína destaca-se por ser rica em aminoácidos hidrofóbicos (alanina, leucina e prolina), a betazeína possui altos teores de aminoácidos sulfurados, a gama-zeína constitui-se de resíduos de prolina, e a delta-zeína contém em sua estrutura aminoácidos sulfurados além de prolina e leucina (LARKINS *et al.*, 1993; PINTO *et al.*, 2010).

Com grande importância industrial, a zeína pode ser aplicada como matéria prima para produzir filmes comestíveis e afins, seu uso prolonga a vida de prateleira de produtos alimentícios, também pode ser usada na fabricação de embalagens e encapsulamento de sementes (PAES, 2006). Isso é possível porque as zeínas possuem um alto grau de polimerização e os filmes são formados devido às propriedades de barreira à umidade, dióxido de carbono e ao oxigênio para reduzir o ranço oxidativo, manter a estabilidade de massa e valor nutritivo (PAPALIA e LONDERO, 2015).

A zeína está relacionada com o teor de amido no grão e sua vitreosidade, em seu estudo sobre o teor de zeína na vitreosidade de híbridos de milho, Kljak *et al.*, (2018) obtiveram em seus resultados que as propriedades do amido e o conteúdo de zeína influenciam a vitreosidade do grão de milho. Segundo os autores, o comportamento complexo da vitreosidade do milho é devido às interações entre os grânulos de amido e proteínas matriz no endosperma, e que os parâmetros que refletem essas interações devem ser considerados juntos, a fim de explicar a vitreosidade de forma mais assertiva.

O modo de extração da zeína é realizado a partir da farinha de milho, obtida através da moagem do grão inteiro, seu rendimento varia entre 5 e 6% de zeína. Entretanto, em outras pesquisas patenteadas nos EUA, a extração a partir da moagem úmida do grão de milho com formação de glúten, proporcionou um rendimento de 30 a 40% de zeína (LAWTON, 2002).

3.4. Processamento do grão de milho

Entende-se como uma prática com a finalidade de melhorar o aproveitamento e consumo deste alimento pelos ruminantes (HALE, 1973). O grau de processamento faz com que haja um aumento da disponibilidade de amido no rúmen (RASTGOO *et al.*, 2020), permitindo uma maior concentração de energia rapidamente fermentável, com aumento das produções de proteína microbiana e ácidos graxos voláteis totais, melhorando o desempenho dos animais alimentados em sistema de confinamento (OWENS *et al.*, 1997; ZINN *et al.*, 2002). Os principais métodos usados no processamento do grão de milho incluem os tratamentos físicos e químicos (MCKINNEY, 2006).

Uma das principais técnicas de processamento físico do milho é a moagem. O objetivo primário é reduzir o tamanho da partícula por força de impacto, compressão, corte ou atrito, aumentando a superfície de contato sem alterar propriedades químicas (MCKINNEY, 2006). A redução do tamanho das partículas por moagem é um procedimento padrão na fabricação de ração animal. Para reduzir o tamanho das partículas, a matriz original do material de alimentação precisa ser modificada (VAN DER POEL *et al.*, 2018). Partindo-se disso, no processo de moagem o grão é reduzido a partículas menores pelo impacto ou atrito por meio de um moinho de martelo até que a partícula do grão atravesse uma peneira, é o mais comum, simples e barato, sendo influenciado pelo tamanho da peneira, moinho, capacidade e velocidade do mesmo.

3.5. Silagem de milho grão reidratado

O uso de silagem de grãos úmidos de milho vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, compreende-se como uma tecnologia de fácil adoção e de baixo custo para produtores que possuem áreas onde as condições climáticas comprometem a colheita (FERRARETTO *et al.*, 2018). Este método consiste na colheita dos grãos logo após a maturação fisiológica, que ocorre quando o teor de umidade se encontra em torno de 28 a 35%, encerrando assim a translocação de nutrientes da planta para os grãos, a ensilagem deve seguir os mesmos princípios da utilizada para conservação de qualquer forrageira, tendo como vantagem a antecipação da retirada da cultura, reduzindo perdas e custos de produção (JOBIM *et al.*, 2001).

Os grãos de milho, ao alcançarem a maturidade fisiológica com uma concentração de umidade em torno de 34% no milho dentado e 37% no milho duro, não sofrem mais alteração

nos seus teores de amido (PHILIPPEAU *et al.*, 2000). Isso demonstra que o milho colhido com alta umidade e o reidratado, provavelmente vão ter concentrações de amido semelhantes (ARCARI *et al.*, 2016).

Visando o melhoramento dos aspectos nutricionais e buscando uma alternativa para minimizar o problema da dificuldade de armazenamento no período da safra, temos como alternativa de processamento a ensilagem. A adoção dessa técnica justifica-se pelo fato de que a armazenagem dos grãos na forma de silagem, em condições de manejo adequado, permite eliminar ou reduzir drasticamente o desenvolvimento de fungos e, por consequência, evitar a contaminação da ração com micotoxinas, que é um dos graves problemas que acomete o milho em armazéns (REIS *et al.*, 2001). Além disso, devido a sua alta produtividade de matéria seca, facilidade de cultivo, disponibilidade de híbridos adaptados aos diferentes ambientes e, principalmente, pela facilidade de fermentação natural e bom consumo pelos animais (RESENDE *et al.*, 2017).

Visando a qualidade durante o processo de fermentação da silagem, faz-se necessário compreender que o processo de reconstituição do milho pode representar uma alternativa viável, agregando benefícios aos pecuaristas. Os sistemas tradicionais de armazenagem de milho seco são suscetíveis ao ataque de vários insetos e roedores e a tendência é que ocorram, após alguns meses de acondicionamento impróprio, significativas perdas qualitativas e quantitativas (RAUSCH, 2005).

A silagem de milho reidratado, permite a compra estratégica em momentos de baixa nos preços do milho, permite também contornar o problema da estreita janela de colheita dos grãos (MORAIS, 2016), assim como minimiza as perdas quantitativas e qualitativas em função do ataque de insetos e ratos (BRANCO *et al.*, 2003), além de possuir baixo custo de estocagem (BIAGGIONI *et al.*, 2009). A ensilagem de grãos reidratados aparece como uma ferramenta importante para aumentar a digestibilidade dos nutrientes do milho, porém é necessário o entendimento das peculiaridades dessa fermentação (MORAIS, 2016).

3.6. Uso de enzimas em silagens

O uso de enzimas em silagens busca auxiliar na disponibilidade de substrato para a ação dos microrganismos. Indo mais afundo nas funções das enzimas, pode-se destacar que são responsáveis pela degradação de amido e estão amplamente distribuídas na natureza. Cada tipo de enzima possui uma função específica, logo, tem-se: as amilases, que atuam sobre o amido, glicogênio e polissacarídeos para hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,4. Essas amilases

podem ser divididas em três grupos: as α -amilases, as quais rompem as ligações no interior do substrato (endoamilases); as β -amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato (exoamilases); e as glucoamilases (amiloglicosidases), as quais liberam unidades de glicose do terminal não-redutor das moléculas do substrato (REED, 1975).

Quando se fala do uso de enzimas em silagens, é importante ressaltar que durante a ensilagem a matriz da prolamina do grão pode ser degradada, principalmente pela ação de enzimas proteolíticas, e essa quebra facilita a acessibilidade dos microrganismos ruminais aos grânulos de amido (JUNGES *et al.*, 2017). As enzimas também podem ser utilizadas em silagens de capim, um exemplo disso é o trabalho de Rinnel *et al.*, (2019), que utilizaram um tratamento de enzimas fibrolíticas antes da ensilagem e concluíram que a degradação da fibra aumentou em resposta a esse tratamento com enzimas e esse processo liberou açúcares para fermentação microbiana e resultou em maiores concentrações de ácidos lático e acético nas silagens. Isso denota o quanto o uso de enzimas pode ser benéfico para vários fins na nutrição animal.

Como já foi citado, as enzimas podem ser utilizadas de diversas formas e de acordo com o tipo de enzima, e quando se fala em enzimas que degradam proteínas, destacam-se as proteases. Essas enzimas hidrolisam as cadeias peptídicas das proteínas que envolvem os grânulos de amido, que, conseqüentemente, torna-se mais digestível em menos tempo de armazenamento (ROSEIRA, 2019).

Em seu estudo com o uso de proteases exógenas na silagem de grão de milho reidratado, Ferraretto *et al.*, (2015) descreveram que a adição das proteases exógenas na ensilagem de milho reidratado acelerou o processo proteolítico durante a fermentação, além de apresentarem efeito sobre a degradação ruminal *in vitro*, com rápido aumento da degradação do amido. Dentre as proteases, a Pepsina é uma enzima que pode quebrar as proteínas em contato com o HCl no estômago (ISLAM *et al.*, 2021) e quando se fala em uso na dieta para ruminantes costuma ser utilizada em sua forma exógena.

4. Material e métodos

4.1. Localização

A confecção dos silos e análises bromatológicas foram conduzidas no laboratório de Bromatologia da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA no município de Santarém-PA e a análise de degradabilidade *in situ*, na fazenda experimental da Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD no município de Dourados-MS.

4.2. Confecção dos Silos

O milho grão foi moído em desintegrador tipo martelo ao tamanho de 5 mm. Reidratou-se o milho já moído até atingir o nível de 40% de umidade e inoculados com *Lactobacillus plantarum* (Lallemand Brasil, Aparecida de Goiânia - GO) para em seguida adicionar a enzima pepsina nas proporções de 0, 25, 50, 100 e 500g/tonelada de milho na matéria seca e ensilados por 0, 15, 30, 60, 120 ou 240 dias em silos experimentais de sacos plásticos especiais, fechados a vácuo, com capacidade para aproximadamente 500 g e armazenados a temperatura ambiente mas protegidas de fatores externos (radiação solar e chuvas).

4.3. Delineamento

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 6 x 5, sendo testados 6 tempos de ensilagem e 5 doses de pepsina. Assim, formam 30 tratamentos com 5 repetições cada, totalizando 150 silos experimentais.

4.4. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa SAS (SAS INSTITUTE, 2001). Os principais efeitos incluíram doses da enzima protease, tempo de ensilagem e sua interação. O modelo estatístico abordou efeito dose de protease, tempo de ensilagem, suas interações e efeito de erro. Quatro contrastes formam testados: 1) Linear para efeito de dose de protease; 2) Quadrático para efeito de dose de protease; 3) Linear para efeito tempo de ensilagem; 4) Quadrático para efeito de tempo de ensilagem.

4.5. Análises químicas

Após a conclusão de cada tempo de ensilagem, os silos foram abertos e as amostras congeladas a -20°C para a realização das análises, sendo elas: teor de matéria seca (MS), pH, teor de nitrogênio amoniacal (N Amoniacal), teor de proteína bruta (PB), teor de amido e teor de zeína (prolamina)

4.5.1. Matéria Seca

Seguindo a metodologia da AOAC, 1995, primeiramente pesa-se a amostra ainda *in natura* para então realizar a pré-secagem em estufa de ventilação forçada na temperatura de 55°C pelo período de 72 horas com intuito de retirar a maior quantidade de água da amostra. Após esse período, as amostras são retiradas e ao atingirem temperatura ambiente, dentro do dessecador, são pesadas novamente. A porcentagem da divisão entre o peso da amostra seca com o peso da amostra úmida é correspondente ao valor da Amostra Seca ao Ar (ASA). As amostras, já pré-secas passam pelo processo de trituração com auxílio de um moinho tipo Thomas-Willey regulado com peneira de 1mm. Após o processo de trituração, as amostras passam pelo processo de secagem definitiva onde são pesadas subamostras em cadinhos e secas em estufa de ventilação forçada a temperatura de 105°C pelo período de 24 horas. Passado esse período, pesa-se novamente. A porcentagem da divisão entre o peso da amostra seca com o peso da amostra úmida é correspondente ao valor da Amostra Seca em Estufa (ASE). O teor de Matéria Seca (MS) da amostra é obtido pela porcentagem da multiplicação entre os valores de ASA e ASE.

4.5.2. pH

Para a realização da análise de pH (AOAC, 1995) utilizou-se as amostras *in natura*. Pesou-se 9 gramas de amostra em um Becker de 250ml e adicionado 60ml de água destilada. A leitura é realizada com auxílio de pHmetro 3 vezes com intervalos de 30 minutos a cada leitura. Após as aferições, o valor final corresponde ao resultado da média aritmética simples das leituras.

4.5.3. Nitrogênio Amoniacal

O teor de Nitrogênio Amoniacal (BOLSEN *et al.*, 1992) na silagem confere como uma porcentagem da quantidade total de compostos nitrogenados da amostra. Essa análise está dividida em três fases: digestão, destilação e titulação. Para a digestão, utiliza-se a amostra ainda *in natura*. Dento de um becker de 500 ml, é pesado 25 g de amostra e adicionado 250 ml de solução de água destilada com ácido sulfúrico, vedado com plástico filme e colocado na geladeira pelo período de 72 horas. Passado esse tempo, o líquido é filtrado e inicia-se a fase da destilação. Em um tubo são adicionados 4 ml do filtrado, 10 ml de hidróxido de potássio (KOH) e 6 ml de água destilada. O tubo é acoplado no destilador de nitrogênio, o produto da destilação junta-se com a solução de ácido bórico mais mistura alcoólica de vermelho de metila e verde de bromocresol em um balão de 250 ml. A titulação, última fase da análise, é realizada com auxílio de uma bureta com ácido clorídrico (HCl) a 0,02% de normalidade. Após a viragem (mudança de cor) da amostra, a bureta é fechada e anotado a quantidade gasta de Ácido Clorídrico.

4.5.4. Proteína Bruta

A partir da determinação total de compostos nitrogenados (KJELDAHL, 1883) é possível, por meio de conversão, estimar o teor de proteína bruta presente na amostra. Ou seja, esta metodologia aponta que da quantidade total de compostos nitrogenados, 16% corresponde a nitrogênio proteico.

Essa metodologia também pode ser dividida em três fases denominadas digestão, destilação e titulação.

Primeiramente é pesado de 1 a 2g de amostra previamente moída e seca, colocado em tubo de digestão, adicionado 5ml de ácido sulfúrico e aproximadamente 3g de mistura catalizadora composta por Hidróxido de Potássio (KOH) e Sulfato de Cobre (CuSO₄). O tudo é levado ao bloco digestor na temperatura de 400°C até que a amostra sofra a “viragem” (mudança de cor para azul translúcido).

Na segunda fase, denominada destilação, é adicionado 20ml de água destilada na amostra, colocada no aparelho de destilação de nitrogênio e adicionado entre 25 a 30ml de Hidróxido de Sódio (NaOH). A amostra já destilada é coletada num balão volumétrico de 250ml com 10ml de mistura de Ácido Bórico, álcool, vermelho de metila e verde de bromocresol.

A titulação, terceira e última fase, consiste na adição de Ácido Clorídrico (HCl) a 1N na amostra controlada por gotejamento com auxílio de uma bureta e agitando o balão até a viragem da amostra. Após a viragem, é anotado a quantidade utilizada de HCl.

4.5.5. Degradabilidade *in situ*.

Os procedimentos de cuidado e manejo dos animais foram realizados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e aprovados pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEUA) da Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD - Dourados, Brasil, sob o protocolo de nº 023/2020.

Para o ensaio de degradabilidade ruminal da matéria seca de silagem de grãos de milho reidratados utilizou-se um bovino macho, adulto, com fistula ruminal, alimentado a pasto e adaptado com milho moído durante 5 dias.

No preparo das amostras, cada tratamento e repetição foi moída ao tamanho de partícula de 2mm em moinho tipo Thomas-Willey e desidratada a 55°C por 72 horas.

Pesou-se 5 g de cada amostra em duplicata, colocados em saquinhos individuais de tecido não tecido (TNT) de 6x6 cm e selados. Colocou-se os saquinhos de TNT em sacos maiores de nylon e incubado no rúmen do animal pelo período de 7 horas seguindo a metodologia de Ferraretto *et al.*, (2014).

Alcançadas as 7 horas, fez-se a retirada dos sacos do rúmen, colocados em água gelada para interromper o processo de degradação e lavados em água corrente até que a água de enxágue ficasse transparente. Os resíduos dos sacos de nylon em cada tempo de incubação foram submetidos à análise de MS e por diferença com o peso inicial das amostras, obtém-se o valor da degradabilidade.

4.5.6. Prolamina Zeína

Adotou-se algumas adaptações da metodologia de Larson e Hoffman (2008) com intuito de quantificar proteínas prolaminas presentes na silagem de milho reidratado.

Para isso, a amostra já seca é desengordurada em acetona, filtrada, seca e retido o resíduo insolúvel em acetona (MS_{ia}). Parte desde resíduo é dissolvido em solução de álcool isopropílico a 55% contendo 0,6% de 2-mercaptoetanol.

A turbidez das prolaminas é alcançada pela incorporação de álcool aquoso de prolamina solubilizado com ácido tricloroacético a 3% (TCA).

O grau de turbidez é mensurado pela absorvância das amostras a 440 *nm* em um espectrofotômetro e a proteína prolamina é quantificada usando uma relação entre absorvância da curva padrão desenvolvida pela prolamina purificadas (zein) e/ou uma milho de alta prolamina (flinty) e milho de baixa prolamina (opaco).

4.5.7. Amido

Para a realização da análise de amido (HALL, 2009), pesa-se 0,10g da amostra e coloca-se no tubo tipo *Falcon* adicionando 30ml de solução tampão (ácido acético glacial dissolvido em água destilada com pH de 5.0 ajustado a adição de hidróxido de sódio a 4%), 0,1ml de α -amilase e agitado com auxílio de vórtex.

As amostras são submetidas ao banho maria a 100°C pelo período de uma hora retirando-as com 10, 30 e 50 minutos para agita-las em vórtex.

Passada a primeira hora, adiciona-se 1ml de Amiloglucosidase no tubo e retorna-se para o banho maria pelo período de duas horas a temperatura de 50°C. Após as duas incubações, completa-se o volume dos tubos de 50ml e agita-se até atingirem a coloração rosa.

As amostras já diluídas são colocadas para leitura em espectrofotômetro ajustado para 550 mn .

5. Resultados

A tabela 1 apresenta os teores médios de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), nitrogênio amoniacal (NH₃), pH, proteína zeína, amido e digestibilidade ruminal por 7 horas das silagens de milho grão reidratado submetidos a doses crescentes de enzima e abertos em diferentes tempos. Observa-se diferença significativa para efeito de dose de enzima, tempo de ensilagem e interação dose e tempo para teor matéria seca, proteína bruta, nitrogênio amoniacal (NH₃), pH, proteína zeína e digestibilidade ruminal por 7 horas.

Tabela 1. Teores médios de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), nitrogênio amoniacal (NH₃), pH, proteína zeína, amido e digestibilidade das silagens de milho grão reidratado submetidos a doses crescentes de enzima e abertos em diferentes tempos.

Tempo	Dose	MS %	PB, %MS	N Amoniacal, %MS	Ph	Proteína Zeína, %MS	Amido, %MS	Degradabilidade, %MS
0	0	70,29	7,50	1,35	5,60	4,80	77,84	53,32
	25	65,84	8,46	1,34	5,36	4,68	75,87	53,28
	50	70,55	9,15	1,50	5,69	4,60	74,13	59,99
	100	67,38	9,43	1,60	5,67	4,56	74,00	53,73
	500	68,13	9,69	1,80	5,48	4,50	73,00	64,41
15	0	66,54	8,73	2,16	3,90	3,74	74,60	63,32
	25	67,00	8,91	2,20	3,97	3,54	74,40	67,69
	50	69,62	9,59	2,30	3,98	3,42	73,50	82,71
	100	68,64	9,60	2,30	3,96	3,32	73,40	85,66
	500	68,30	9,75	2,50	3,98	2,69	71,50	87,90
30	0	67,20	9,00	2,25	4,06	3,68	74,10	87,85
	25	68,76	9,38	2,60	3,99	3,65	73,80	89,02
	50	69,84	9,48	2,59	4,02	3,49	74,70	88,82
	100	69,22	9,27	2,60	4,08	3,30	74,70	90,13
	500	68,64	9,81	2,76	4,10	2,55	76,70	92,33
60	0	68,90	9,21	2,25	4,16	3,58	74,00	89,92
	25	68,62	9,42	2,60	4,11	3,33	74,10	90,40
	50	67,41	9,75	2,74	4,16	3,13	73,75	92,52
	100	68,17	9,42	2,60	4,14	2,61	75,60	90,87
	500	68,64	9,93	3,27	4,12	1,57	74,10	90,11
120	0	67,95	10,23	2,77	4,30	2,58	74,40	91,23
	25	66,66	12,53	3,00	4,29	2,69	76,10	92,51
	50	69,49	12,98	3,39	4,27	2,62	74,90	93,12
	100	69,26	12,99	3,88	4,16	1,54	74,10	91,25
	500	69,69	12,75	3,91	4,30	1,51	73,75	92,68
240	0	68,36	10,29	3,00	4,52	1,47	75,70	91,61
	25	68,92	12,45	3,06	4,46	1,39	74,70	92,15
	50	70,71	13,41	3,46	4,41	1,35	77,40	92,83
	100	70,94	13,85	3,98	4,47	1,39	74,10	93,13
	500	74,93	14,40	4,10	4,55	1,25	73,30	94,28
*EPM		0,643	0,335	0,204	0,056	0,161	1,106	0,017
Tempo		<	<	<	<	<	<	<
Dose		0,01	< 0,01	< 0,01	0,01	< 0,01	0,216	< 0,01
Tempo*Dose		<	<	<	<	<	<	<
Tempo*Dose		0,01	< 0,01	< 0,01	0,01	< 0,01	0,122	< 0,01

*Erro Padrão da Média

5.1. Matéria Seca

A figura 1 representa a porcentagem de matéria seca da silagem de milho reidratado com diferentes níveis de protease, no decorrer de 240 dias de ensilagem. A porcentagem de matéria seca manteve-se entre 60 e 70% para todos os níveis de pepsina até os 240 dias de ensilagem.

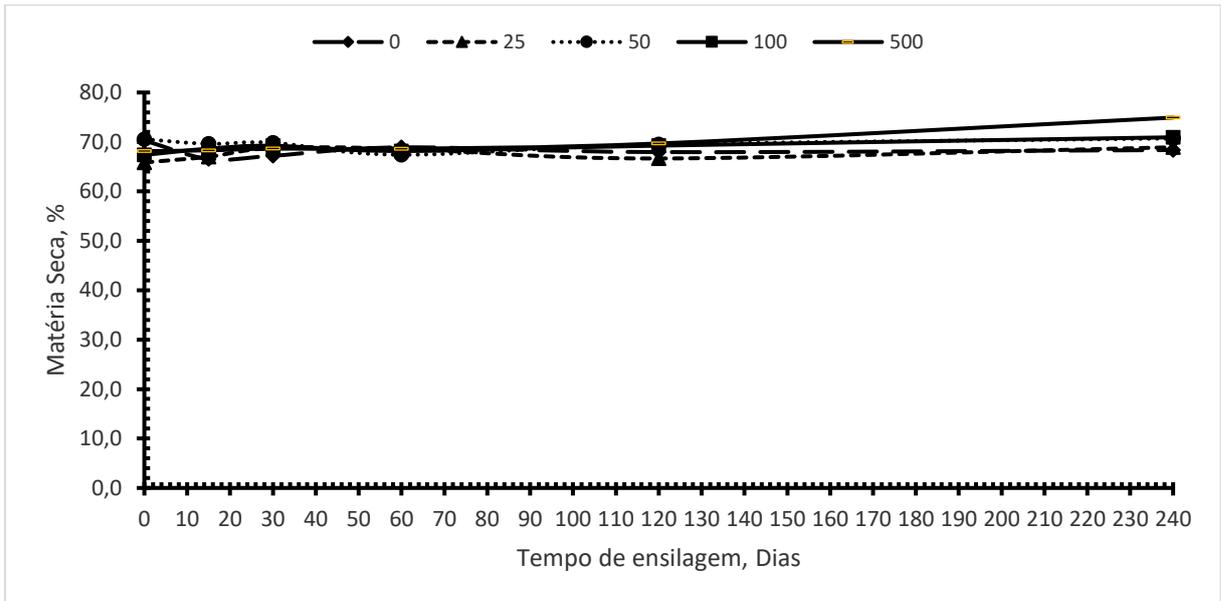


Figura 1. Matéria Seca da silagem de grãos de milho reidratados submetidos a diferentes níveis de Protease no decorrer de um período de 240 dias de ensilagem.

5.2. pH

A figura 2 apresenta o pH da silagem de milho reidratado com diferentes níveis de pepsina no decorrer de 240 dias de ensilagem. No dia 0, todas os níveis de pepsina indicaram um pH entre 5,0 e 6,0. A partir daí, até o dia 15 de ensilagem, as silagens obtiveram um declínio pH em torno de 4,0, não havendo diferença estatística entre os níveis de pepsina. Todas as silagens com as diferentes doses de enzima permaneceram constantes, sem alterações significativas até os 240 dias de ensilagem.

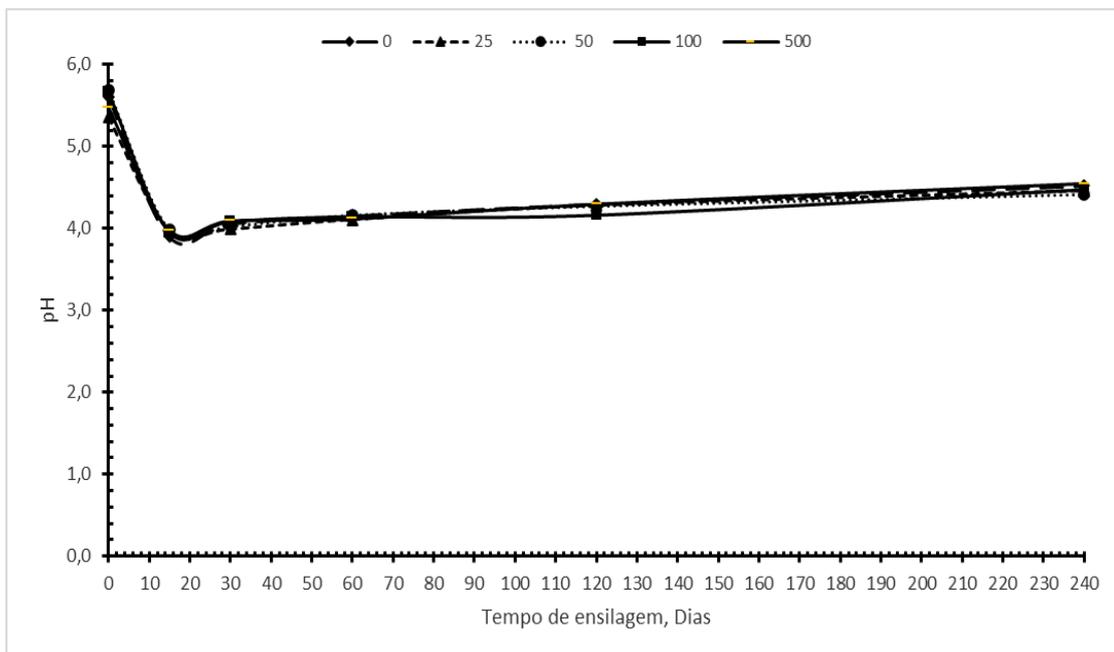


Figura 2. Níveis de pH da silagem de grãos de milho reidratados submetidos a diferentes níveis de Protease no decorrer de um período de 240 dias de ensilagem.

5.3. Nitrogênio Amoniacal

A figura 3 representa as concentrações de nitrogênio amoniacal das silagens de milho reidratado quando submetida a crescentes níveis de pepsina. Embora os níveis de nitrogênio amoniacal variem entre 0 e 60 dias de ensilagem, as curvas se estabilizam a partir de 120 dias de ensilagem. A menor porcentagem de nitrogênio amoniacal (1,5 %) destacou-se com 0 dias de ensilagem para todos os níveis de protease, aumentando até os 20 dias de ensilagem, chegando a porcentagem de 2,7%. Houve maior concentração de N amoniacal para as silagens tratadas com 100 e 500 g/t de pepsina, não havendo diferença entre si. Os silos tratados com 50 g/t de pepsina apresentaram, após 60 dias de ensilagem, concentrações de N amoniacal maiores que os silos não tratados e os tratados com 50 g/t pepsina. Não houve diferença na concentração de N amoniacal entre os silos não tratados e os silos tratados com 25 g/t de pepsina.

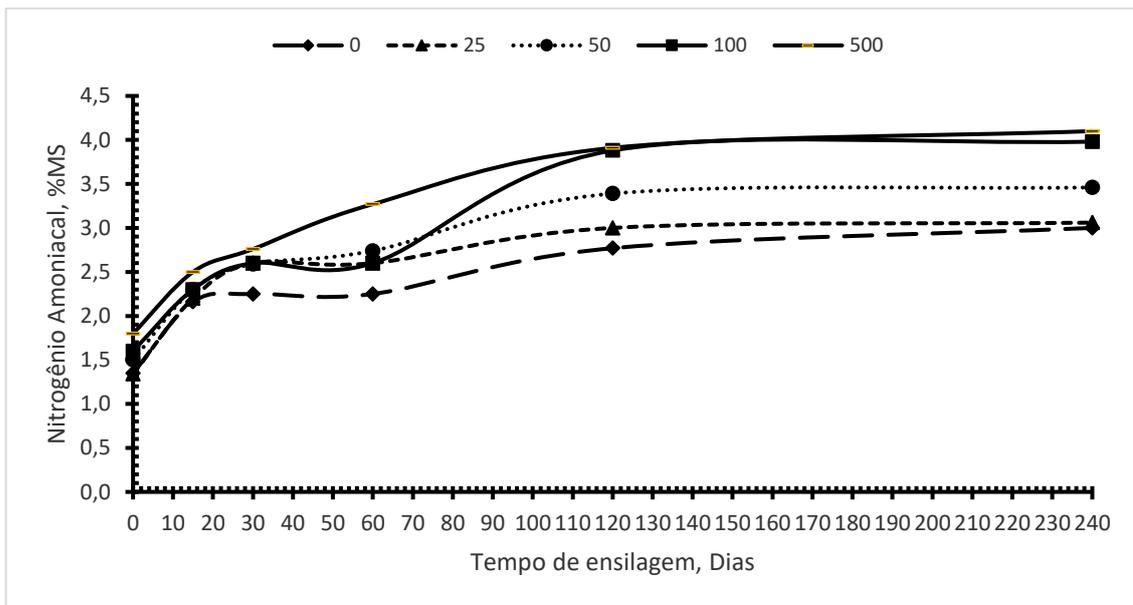


Figura 3. Nitrogênio amoniacal (% MS) de grãos de milho reidratados submetidos a diferentes níveis de Protease no decorrer de um período de 240 dias de ensilagem.

5.4. Proteína Bruta

A figura 4 apresenta a porcentagem de Proteína Bruta (PB) da silagem de milho reidratado com diferentes níveis de protease dentro de 240 dias de ensilagem. A porcentagem de PB para todos os níveis de protease está entre 8,0 e 10,0%, até os 60 dias de ensilagem. A partir desse tempo, as curvas de 25, 50, 100 e 500g/t de protease apresentaram aumento com pico em 120 dias de ensilagem, com mais de 12,0% de PB e mantendo-se estáveis até os 240 dias. Já a curva de 0g/t manteve-se ao nível de 8,5% de PB até os 240 dias.

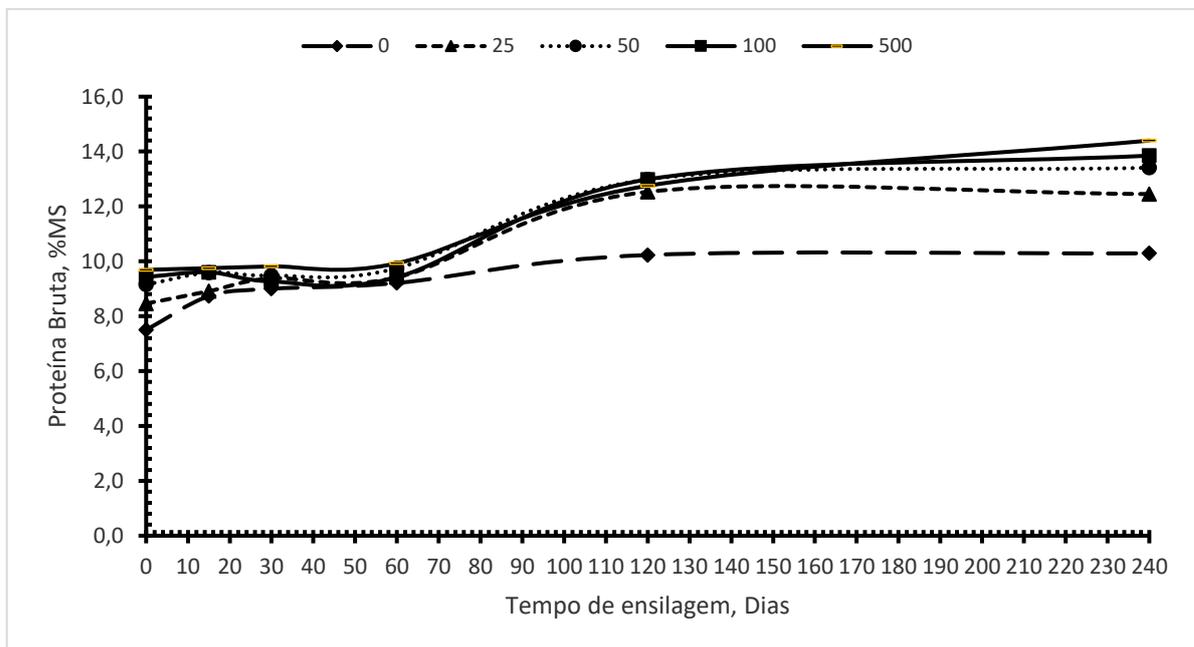


Figura 4. Proteína bruta da silagem de grãos de milho reidratados submetidos a diferentes níveis de Protease no decorrer de um período de 240 dias de ensilagem.

5.5. Degradabilidade

A figura 5 apresenta a degradabilidade da silagem de milho reidratada com diferentes níveis de protease dentro de 240 dias de ensilagem. Todas as doses apresentaram aumento da degradabilidade de 0 a 30 dias de ensilagem, subindo de 50% para 90% de degradabilidade no 30º dia. A partir daí, até os 240 dias de ensilagem, todas as doses de protease apresentaram-se estáveis. Com 15 dias de ensilagem houve, nas amostras com as doses 50, 100 e 500g de pepsina por tonelada de milho, apresentaram maior degradabilidade ruminal por 7 horas de incubação que as amostras sem adição de pepsina ou com dose de 25g de pepsina por tonelada de milho.

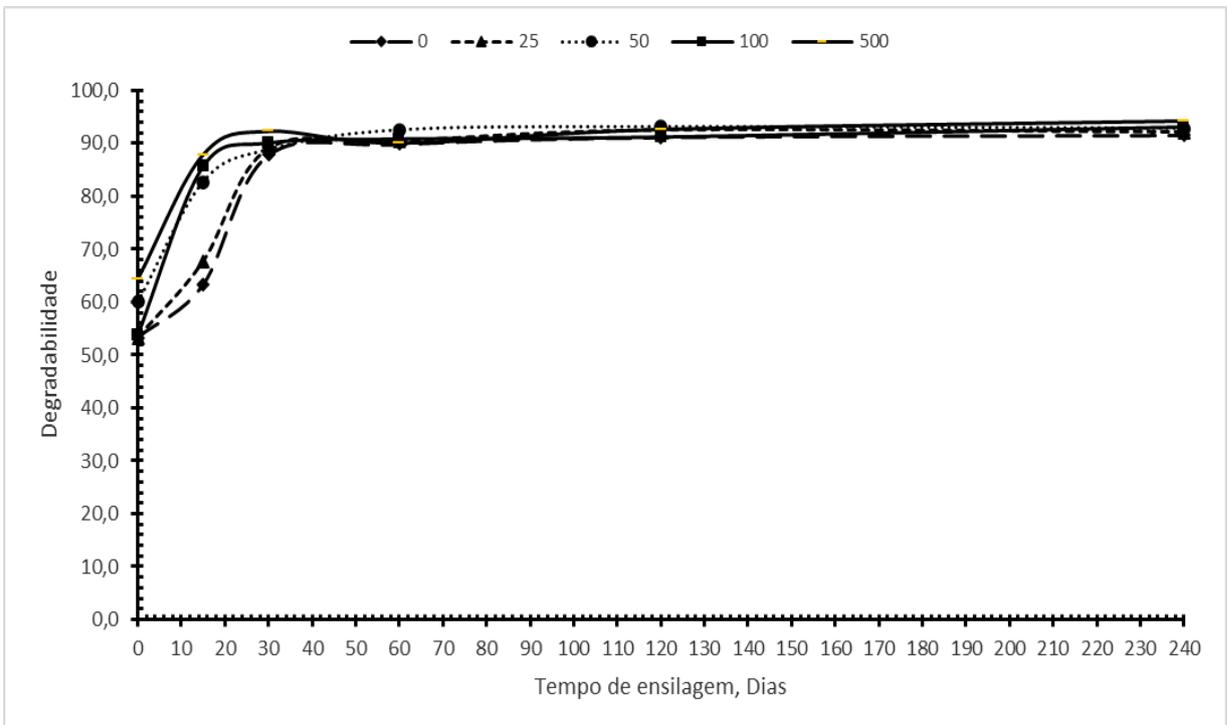


Figura 5. Degradabilidade da silagem de grãos de milho reidratados submetidos a diferentes níveis de Protease no decorrer de um período de 240 dias de ensilagem.

5.6. Prolamina Zeína

A figura 6 representa a porcentagem de prolamina zeína, com diferentes níveis de protease na silagem de milho reidratado e como esses níveis se comportam no decorrer de 240 dias de ensilagem. Os níveis de prolamina zeína foram próximos de 5,0% no tempo de 0 dias, e os tratamentos com pepsina apresentaram redução no nível de prolamina zeína com 15 dias de ensilagem, chegando a aproximadamente 3,3 % de prolamina zeína. Entretanto, se forem comparadas as curvas entre si, a de 500g/t de protease teve um declínio maior, com 2,8% de zeína. Os tratamentos com 0, 25 e 50 g/t apresentaram concentrações maiores de zeína após 60 dias de ensilagem, não havendo diferença com 240 dias de. A curva com 500g/t de protease apresentou-se mais baixa do que as demais curvas, chegando a aproximadamente 1,7% de Proteína Zeína, mantendo-se estável até os 240 dias.

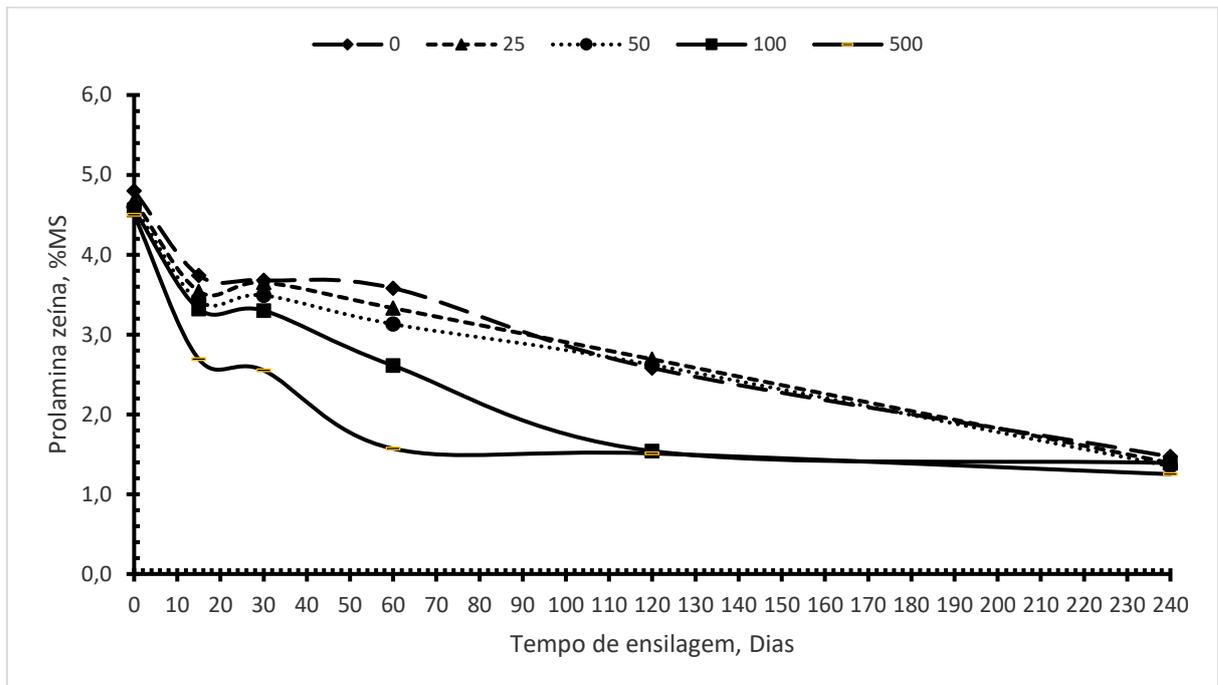


Figura 6. Concentração de Prolamina zeína (% MS) em silagem de grãos de milho reidratados submetidos a diferentes níveis de Protease no decorrer de um período de 240 dias de ensilagem.

5.7. Amido

A figura 7 apresenta-se a concentração de amido na silagem de milho reidratado com diferentes níveis de protease dentro de um período de 240 dias de ensilagem. Todos os tratamentos permaneceram entre 70,0 e 80,0% de amido em todo o período de ensilagem, não havendo diferença entre si.

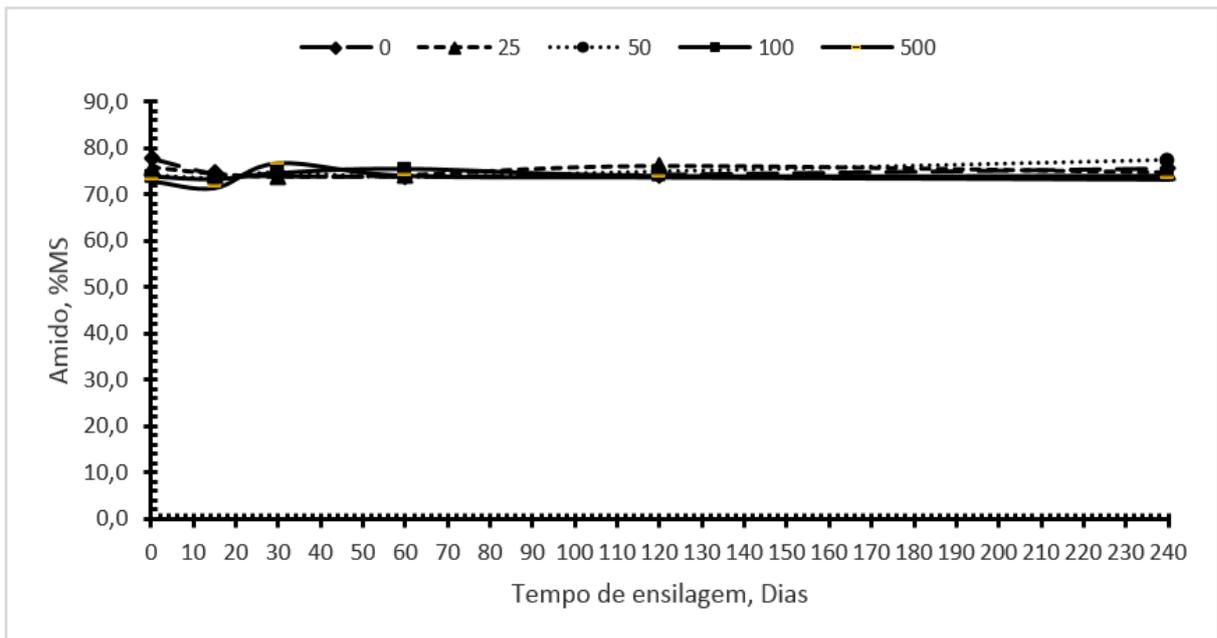


Figura 7. Concentração de amido (% MS) da silagem de grãos de milho reidratados submetidos a diferentes níveis de Protease no decorrer de um período de 240 dias de ensilagem.

6. Discussão

6.1. Matéria Seca

O teor de MS da maioria das amostras manteve-se entre 70 e 65% (Tabela 1) considerado ideal para silagem de grão de milho reidratado (LECHARTIER e PEYRAUD, 2010). Rustomo *et al.*, (2016) considerou a ensilagem em sacos a vácuo impede a perda de umidade das amostras, mas que apesar disso, não afeta a composição química da silagem.

6.2. pH

A ação enzimática, seja qual for o substrato envolvido, sob a silagem não deverá afetar nos níveis de pH no decorrer do processo de ensilagem (Ferraretto *et al.*, 2013). Tal afirmação condiz com os resultados encontrados neste estudo onde os níveis de pH decrescem de acordo com o tempo de ensilagem, mas não afetou com a adição de enzima. O tratamento no tempo 0 apresenta pH 6,0, próximo da neutralidade. Assim, já com 15 dias de ensilagem é notória e esperada a queda de pH, afinal, o processo de ensilagem gera ácido láctico que reduz o pH (Kung Jr. *et al.*, 2003) e que altos teores de pH podem ser um indicativo prático de que a silagem está sendo deteriorada devido à degradação dos ácidos orgânicos pelos efeitos indesejáveis de bactérias e fungos reduzindo a qualidade da silagem quando exposta ao ar.

Porém, de acordo com Pacheco *et al.*, (2014) o efeito inibitório sobre as bactérias depende da taxa de diminuição da concentração de íons e teor de umidade do meio, portanto, quando avaliado individualmente, o teor de pH da silagem não é considerado um bom critério para avaliar a fermentação.

O pH médio das amostras nesse estudo foi de 4,41, bastante próximo do resultado obtido no estudo de Ferraretto *et al.* (2014b), que ensilaram o milho grão úmido pelos mesmos períodos de 0, 15, 30, 60, 120 ou 240 dias e encontraram pH médio de 4,5. Entende-se que a diminuição no pH é esperada quando o milho grão de alta umidade é ensilado por períodos maiores (BARON *et al.*, 1986). Dessa forma, o fator para redução do pH pode ter sido influenciado pela utilização de inoculante sugerindo, assim, boa fermentação bacteriana (MUCK, 2010) atrelado com o aumento das concentrações dos ácidos de fermentação, como o acetato e lactato ao longo do tempo (FERRARETTO *et al.*, 2015).

6.3. Nitrogênio amoniacal

Os teores médios de N amoniacal nas amostras de silagem cresceram linearmente tanto de acordo com o aumento da dose de enzima quanto com a quantidade de dias ensilados chegando a 4,1% na MS quando ensilado por 240 dias com dose de 500g/t, mas todas as doses de enzima adotadas neste estudo apresentaram teores maiores de N-NH₃ a partir dos 120 dias e estabilizando até os 240 dias. Justifica-se tal crescimento do teor de N-NH₃ pela ação satisfatória da enzima. Leva-se em consideração que a atividade proteolítica, ou seja, da quebra das bases proteicas acarretam no aumento significativo da concentração de amônia na silagem (MUCK, 1988). Assim, entende-se que os teores mais elevados de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) sugerem boa atividade proteolítica (HOFFMAN *et al.*, 2011; FERRARETTO *et al.*, 2014a; KUNG *et al.*, 2014).

Da Silva *et al.*, (2019), avaliaram o efeito da atividade de uma enzima proteolítica na silagem de milho reidratado e observaram que o tratamento do milho com a enzima aumentou a concentração de nitrogênio amoniacal, o mesmo resultado encontrado no presente estudo. Justifica-se tal aumento de N-NH₃ possivelmente pelo processo de hidrólise das ligações peptídicas dos aminoácidos aromáticos na porção amino terminal que possuem características polares e hidrofóbicas, sendo elas a Fenilalanina, Tirosina e Leucina (NELSON, 2014).

A fenilalanina, Tirosina e Leucina representam cerca de 23% do teor de aminoácidos nas frações não celulares e de parede celular dos grãos de milho. A pepsina auxilia na hidrólise de ligações peptídicas e sítios de ligação entre a Fenilalanina-Valina, Glicina-Histidina, Glutamina-Alanina, Alanina-Leucina, Leucina Tirosina, Fenilalanina-Tirosina e Glicina-Fenilalanina (NIU *et al.*, 2017). E levando em consideração que a zeína é rica em Glutamato (21 a 26%), Leucina (20%), Alanina (10%) e Fenilalanina (7%) (SHUKLA e CHERYAN, 2001), a atividade da pepsina atrelada com uma maior atividade microbiana em função de maior acesso ao amido, por maior tempo de ensilagem (120 e 240 dias) corroboram com o aumento do N-NH₃, e consequente redução da concentração de Zeína (HOFFMAN *et al.*, 2011; KUNG *et al.*, 2014).

6.4. Degradabilidade

Os resultados mostraram que quanto maior o tempo de ensilagem, maior a taxa de degradabilidade em razão da prolongação do processo fermentativo alcançando os melhores nos períodos de 60, 120 e 240 dias independente da dosagem de enzima, resultados estes semelhantes aos encontrados no estudo de Da Silva *et al.*, (2019). Além disso, observa-se que os tratamentos com 50 gramas de pepsina por tonelada de milho, já fizeram efeito com 15 dias de ensilagem, não diferindo dos tratamentos com 100 e 500 g/t. A quebra da matriz proteica que protege o endosperma do milho é proveniente do processo da ação de enzimas no processo de ensilagem melhorando também a fração rapidamente degradável do amido e a velocidade de degradação no rúmen (GRUBER *et al.*, 2018).

Adotando a adição de protease em silagem de milho úmido, Ferraretto *et al.*, (2014a) identificou melhoria na digestibilidade *in vitro* do amido ($P < 0,03$) mesmo em curtos períodos de ensilagem além de trazer melhora na resposta de degradação da matriz proteica hidrofóbica do amido de milho, melhorando sua digestão pelas bactérias ruminais. Kung *et al.* (2014) identificou aumento na solubilidade proteica e aumento da digestibilidade ruminal *in vitro* do amido. Os resultados de degradabilidade ruminal por 7 horas, mostraram que a adição de pepsina, de pelo menos 50 g/t de milho pode reduzir o tempo de ensilagem de milho sem comprometer a digestibilidade ruminal.

6.5. Prolamina Zeína e Proteína Bruta

As zeínas representam de 50 a 60% da proteína presente no grão de milho (HAMAKER *et al.*, 1995). Durante a fermentação, o processo de ensilagem atua também como agente proteolítico, sendo que, de todo potencial de quebra de matrizes proteicas, 60% é proveniente das bactérias, 30% de enzimas pré-existentes no milho, 5% de fungos e 5% da fermentação final (JUNGES *et al.*, 2017)

Assim, pelo fato das taxas menores de zeína apresentarem-se aos 120 e 240 dias com doses de pepsina de 100 e 500g/t, pode-se afirmar que a pepsina adicionada à silagem contribuiu na degradação da matriz proteica, facilitando o acesso desses agentes aos nutrientes e consequentemente reduzindo os percentuais de zeína. Em relação à ação de proteases, Kung Jr. *et al.*, (2014) identificou aumento na solubilidade proteica com redução importante dessas prolaminas em 26% e 42% aos 70 e 140 dias de fermentação, respectivamente. Já a adição de pepsina condiz com os estudos que confirmam a melhora na degradação da matriz proteica hidrofóbica do amido de milho através do pré-tratamento de alimentos com proteases exógenas (HOFFMAN *et al.*, 2011).

Com relação aos resultados obtidos de proteína bruta neste estudo, os níveis mostraram-se maiores aos 120 dias mantendo-se estáveis até os 240 dias. Estes resultados assemelham-se com o estudo de Ferraretto *et al.*, 2013 e justifica-se pelos possíveis resíduos provenientes das quebras das zeínas que resultam em compostos menores e, atrelado à metodologia adotada que afere todo composto nitrogenado presente na amostra, seja ele verdadeiramente proteico ou não, assim, é válido utilizar esses dados como mais um parâmetro pra reforçar a eficiência que uso da pepsina nas silagens de 120 e 240 dias para a quebra das prolaminas.

6.6. Amido

Os níveis de amido nas amostras não apresentaram diferença estatística entre elas além de seguirem um padrão durante todo o experimento, mantendo-se ente 73 e 79%, teores considerados excelentes segundo o estudo de Hoffman *et al.*, 2011. Este resultado, além de esperado, assemelha-se com o encontrado no estudo de Ferraretto *et al.*, 2015, afinal a metodologia adotada aponta o valor total de amido presente na amostra, não necessariamente o teor de amido disponível para a microbiota ruminal.

7. Conclusão

O tempo de ensilagem aumentou a digestibilidade ruminal por 7 horas da matéria seca, reduzindo os níveis de proteína zeína com conseqüente aumento nos teores de nitrogênio amoniacal.

A adição de 50 gramas de pepsina por tonelada de silagem aumentou digestibilidade ruminal por 15 dias de ensilagem podendo reduzir o tempo de ensilagem sem comprometer a digestão ruminal da matéria seca do milho grão reidratado.

8. Referências Bibliográficas

ALBERNAZ, D. Você usa o milho Flint? Saiba como ele pode agregar valor à sua indústria alimentícia. Disponível em: <https://milhao.net/por-que-o-milho-flint-tem-conquistado-o-mundo/>. Acesso me: 19 de Maio de 2021.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**, 16. ed. Washington, 1995.

ARCARI, M.A.; MARTINS, C.M.M.R.; TOMAZI, T., SANTOS, M.V. Defect. of the ensiling time of hydrated ground corn on silage composition and in situ starch degradability. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** 53, p.60–71, 2016.

BARON, V.S.; STEVENSON, K.R.; BUCHANAN-SMITH, J.G. Proteolysis and fermentation of grain-corn ensiled at several moisture levels and under several simulated storage methods. **Canadian Journal of animal science**, Ottawa, v. 66,n. 2, p. 451-461, June 1986.

BEAUACHEMIN, K.A.; McALLISTER, T.A.; DONG, Y.; FARR, B; I.; CHENG, K.J. Effect of mastication on digestion of whole cereal grain by cattle, **Journal of Animal Science**, Champaign, v.72, p. 236-246, 1994.

BIAGGIONI, M.A.; LOPES, A.B.C.; JASPER, S.P.; BERTO, D.A.; GONÇALVES, E.V. Qualidade da silagem de grão úmido em função da temperatura ambiente e pressão interna de armazenagem. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá, v. 31, n. 3, p. 377-382, 2009.

BOLSEN, K. K.; LIN, C.; BRENT, B. E.; FEYERHERM, A. M.; URBAN, J. E.; AIMUTIS, W. R. Effect of silage additives on the microbial succession and fermentation process of alfalfa and corn silages. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.3066-3083, 1992.

BRANCO, A.F.; SANTOS, G. T. DOS. **Silagem de grãos úmidos na alimentação de bovinos leiteiros**.IN: Simpósio Goiano sobre Manejo e Nutrição de Bovinos de Corte e Leite, 5, 2003. Anais...Goiânia: CBNA, 2003.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Séries históricas**. 2018. Disponível em: <<https://portaldeinformacoes.conab.gov.br/index.php/safra-serie-historica-dashboard>>. Acesso em: 09 jul. 2019.

CORREA, C. E. S.; SHAVER, R. D.; PEREIRA, M. N.; LAUER, J. G.; KOHN. Relationship between corn vitrouness and ruminal in situ starch degradability. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 11, p. 3008-3012, Nov. 2002.

DA SILVA, N.C.; NASCIMENTO, C.F.; CAMPOS, V.M.A.; ALVES, M.A.P.; RESENDE, F.D.; DANIEL, J.L.P.; SIQUEIRA, G.R. Influence of storage length and inoculation with *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of high-moisture corn and rehydrated corn grain silage, **Animal Feed Science and Technology**, Volume 251, 2019, Pages 124-133, ISSN 0377-8401, <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.03.003>.

FERRARETTO LF, SILVA FILHO WI, FERNANDES T et al. Effect of ensiling time on fermentation profile and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated corn with or without varied concentrations of wet brewers grains. **J Dairy Sci**, 2018.

FERRARETTO, L. F. S.; FREDIN, M.; SHAVER, R. D. Influence of ensiling, exogenous protease addition, and bacterial inoculation on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated and high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**. Doi: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9891>. Vol. 98 No. 10. 98:1–10, 2015.

FERRARETTO, L. F., K. TAYSOM, D. TAYSOM, R. D. SHAVER, AND P. C. HOFFMAN.. Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia-nitrogen, and ruminal in vitro starch digestibility in high-moisture corn samples. **Journal of Dairy Science**. 97:3221-3227. 2014a.

FERRARETTO, L. F., P. M. CRUMP., R. D. SHAVER. 2013. Effect of cereal grain type and corn grain harvesting and processing methods on intake, digestion and milk production by dairy cows through a meta-analysis. **Journal of Dairy Science** v. 96, p. 533–550. 2013.

FERRARETTO, L. F., FREDIN, S. M., SHAVER, R. D. Influence of ensiling, exogenous protease addition, and bacterial inoculation on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated and high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, v. 98 p. 7318–7327. 2014b.

FILHO, I. A. P.; DUARTE, J. O.; GARCIA, J. C.; CRUZ, J. C. Cultivo do Milho. Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de Produção, 1. ISSN 1679-012X. Brasília/ DF, 2015. Disponível em: <https://www.spo.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: 18 de maio de 2021.

FOX e MANLEY. Hardness methods for testing maize kernels. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.57,p.5647-5657,2009. Acesso em: 15 Ago. 2019. doi:10.1021/jf9006 23w.

GRUBER, L., TERLER, G., & KNAUS, W. Nutrient composition, ruminal degradability and whole tract digestibility of whole crop maize silage from nine current varieties. **Archives of Animal Nutrition**, 72(2), 121–137. 2018. doi:10.1080/1745039x.2018.1436665.

HALE, W. H. Influence of processing on the utilization of grains (starch) by ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 37, p. 1075-1984, 1973.

HALL, M. B. Determination of starch, including maltooligosaccharides, in animal feeds: Comparison of methods and a method recommended for AOAC collaborative study. **J. AOAC Int**. v. 92, p. 42-49, 2009.

HAMAKER, B. R., MOHAMED, A. A., HABBEN, J. E., HUANG, C. P., LARKINS, B. A. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. **Cereal Chemistry**, v. 72, p. 583-588. 1995.

HOFFMAN, P.C.; ESSER, N.M.; SHAVER, R.D. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, p.2465-2474, 2011.

HOFFMAN, P.C; SHAVER, R.D. UW - **Feed Grain Evaluation System**. Disponível em: <http://www.uwex.edu/ces/dairynutrition/documents/WisconsinFGES.pdf>. Acesso em: 26 mar.2019.

HUNTINGTON, G.B. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. **Journal of Animal Science**, v.75, n.2, p.852-867, 1997.

ISLAM, M. M.; FERDOUS, Z.; MAMUN, M. M. U.; AKHTER, F.; ZAHANGIR, M. M. Melhoria do crescimento, fisiologia do sangue e qualidade da água por suplementação dietética exógena de pepsina em bagre listrado, *Pangasianodon hypophthalmus*. Aquicultura. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735840>. Volume 530, 2021.

JOBIM, C. C.; CECATO, U.; CANTO, M. W. Utilização de silagem de grãos de cereais na alimentação animal. In: Simpósio Sobre Produção E Utilização De Forragens Conservadas, 1., 2001, **Maringá. Anais Maringá:CCA/UEM/DZO**, 2001. p. 146-176.

JUNGES D, MORAIS G, SPOTO MHF et al. Short communication: Influence of various proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. **J Dairy Sci**, 2017. JURJANZ, S., MONTELS, V. Ruminant degradability of corn forages depending on the processing method employed. **Animal Research**, v. 3, p. 15-23.2005.

KJELDAHL, J. Neue methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. Fresenius, Zeitschrift f. **anal.** Chemie 22, 366-382. 1883.

KLJAK, K.; DUVNJAK, M.; GRBESA, D. Contribution of zein content and starch characteristics to vitreousness of commercial maize hybrids. **Journal of Cereal Science**. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.01.010>. Elsevier Ltd. All rights reserved. Zagreb, Croatia, 2018.

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

KUNG JR., L.; STOKES, M. R.; LIN, C. J. Silage additives. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J.H. (Eds.). **Silage science and technology**. Wisconsin: ASA; CSSA; SSSA, 2003. p. 305-360.

LARKINS, B.A. et al. Modification of maize-seed-protein quality. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.58, n.2, p.264s-269s, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8328398>>. Acesso em: 18 de maio de 2021.

LARSON, J., and P. C. HOFFMAN. Technical Note: A method to quantify prolamin proteins in corn that are negatively related to starch digestibility in ruminants. **J. Dairy Sci.** 91:4834-4839. 2008.

LAWTON, J. W. Zein: A History of Processing and Use. Doi: <https://scihub.tw/https://doi.org/10.1094>. Vol. 79, No. 1, 2002.

LECHARTIER, C., AND J. L. PEYRAUD. 2010. The effects of forage proportion and rapidly degradable dry matter from concentrate on ruminal digestion in dairy cows fed corn silage-based diets with fixed neutral detergent fiber and starch contents. **J. Dairy Sci.**93:666–681.

MAPA - Ministro de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa MAPA nº 60 de 22/12/2011. Dezembro de 2011. Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=78895>. Acesso em: 18 de maio de 2021.

MCKINNEY, L. J. Grain processing: particle size reduction methods. In: Cattle Grain Processing Symposium, 1., 2006. **Oklahoma. Proceedings**. Oklahoma: CGP, 2006. P. 42-45.

MOMANY, F.A., SESSA, D.J., LAWTON, J.W., SELLING, G.W., HAMAKER, S.A.H., WILLETT, J.L. Structural characterization of alpha-zein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington, v.54, p.432-439. 2006.

MORAIS, M. DA G. et al. Inoculação de silagens de grãos úmidos de milho, em diferentes processamentos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 4, p. 969–981, 2012.

NELSON, D.L. **Lehninger principles of biochemistry**, 6th edition, 2014. ISBN 9781429234146.

NIU, C.; YANG, P.; LUO, H.; HUANG, H.; WANG, Y.; YAO, B. Engineering the residual side chains of HAP phytases to improve their pepsin resistance and catalytic efficiency. **Sci Rep** 7, 42133, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep42133>

OWENS, F.N.; SECRIST, D.S.; HILL, W.F. et al. The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v.75, n.2, p.868879, 1997.

OWENS, F.N.; SODERLUND, S. Ruminant and post ruminant starch digestion by cattle In: PIONEER HIBRED, A DUPONT BUSINESS CONFERENCE, 2007, **Jonston. Proceedings... Jonston**, 2007.

PACHECO, W. F.; CARNEIRO, M. S. S.; PINTO, A. P.; EDVAN, R.L.; ARRUDA, P.C.L.; CARMO, A.B.R. Perdas fermentativas de silagens de capim-elefante com níveis crescentes de feno de Gliricídia. *Acta Veterinária Brasília*, v.8, n.3, p. 155-162, 2014.

PAES, M.C.D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006.6p.

PAES, Maria Cristina Dias, Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. **nutrição humana e ciência dos alimentos embrapa milho e sorgo**. Sete Lagoas, Circular técnica 75, dez. 2006.

PAPALIA, I. S.; LONDERO, P. M. G. Extração de zeína e sua aplicação na conservação dos alimentos. **Ciência Rural. Tecnologia de alimentos**, v.45, n.2, p.552-559. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20131649>. Santa Maria - RS, 2015.

PHILIPPEAU, C.; LANDRY, J.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of the protein distribution of maize end osperm on ruminal starch degradability. **Science Food Agriculture**, v.80, n.2. p.404-408, 2000.

PINTO, A. P.; LANÇANOVA, J. A. C.; LUGÃO, S. M. B.; ROQUE, A.P.; ABRAHÃO, J. J. DOS S.; OLIVEIRA, J. S. e; LEME, M. C. J.; MIZUBUTI, I. Y. Avaliação de doze cultivares de milho (ZeamaysL.) para silagem. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v.31, n.4, p.1071-1078, out./dez. 2010.

RASTGOO, M.; BONCHENARI, M. K.; HOSSEINYAZDI, M.; MIRZAEI, M. Effects of corn grain processing method (ground versus steam-flaked) with rumen undegradable to degradable protein ratio on growth performance, ruminal fermentation, and microbial protein yield in Holstein dairy calves. **Animal Feed Science and Technology**. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114646>. Volume 269, 114646, 2020.

RAUSCH, K. D. Particle size distributions of ground corn and ddgs from dry grind processing. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**, Saint Joseph, v. 48, n. 1, p. 273–277, 2005.

REED, G. Enzymes in Food Processing. 2.ed. New York: **Academic Press Inc**. p. 62-87, 1975.

REIS, W. DOS et al. Características da carcaça de cordeiros alimentados com dietas contendo grãos de milho conservados em diferentes formas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 4, p. 1308–1315, 2001.

RELINGER, R. NAFTA and US cornsubsidies: Explaining the displacement of Mexico's corn farmers. **Prospect Journal of International Affairs at UCSD**, 2010. Disponível em: <prospectjournal.org>. Acesso em: 17 jul. 2019.

RESENDE, H. et al. **Tecnologia e Custo da Silagem de Milho**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2017. 10p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 114).

RINNEL, M.; WINQUIST, E.; PIHLAJANIEMI, V.; NIEMI, P.; SEPPÄLÄ, A.; SIIKA-AHO, M. Fibrolytic enzyme treatment prior to ensiling increased press-juice and crude protein yield from grass silage. **Tecnologia Bioresource**. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122572>. Volume 299, 122572, 2020.

ROSEIRA, J. P. S. Silagens de sorgo tratadas com cepas autóctones de *Lactobacillus buchneri* e uso de protease exógena em grãos de milho e sorgo reidratados e ensilados. **Tese (Doutorado)**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa/MG, 2019.

RUSTOMO, B., O. ALZAHAL, N. E. ODONGO, T. F. DUFFIELD, AND B. W. MCBRIDE. 2006a. **Effects of rumen acid load from feed and forage particle size on ruminal pH and dry matter intake in the lactating dairy cows**. J. Dairy Sci. 89:4758–4768.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: release 8.2. Cary: Statistical Analysis System Institute. 2001.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. Elsevier, **Industrial Crops and Products**, v.13, p.171-192. Doi: 10.1016/S0926-6690(00)00064-9, 2001.

SILVA NC, NASCIMENTO CF, NASCIMENTO FA et al. Fermentation and aerobic stability of rehydrated corn grain silage treated with different doses of *Lactobacillus buchneri* or a combination of *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*. **J Dairy Sci**, 101:4158–67, 2018.

SILVA, M.S. J.D.; JOBIM, C. C.; POPPI, E.C. et al. Production technology and quality of corn silage for feeding dairy cattle in Southern Brazil., **Rev. Bras. de Zootec.**, v.44, p.303-313, 2015.

STONE, L. R.; SCHLEGEL, A.J.; GWIN JÚNIOR, R.E.; KHAN, A.H. Response of corn, grain sorghum and sunflower to irrigation in the High Plains of Kansas. **Agriculture Water Management**, v. 30, n.3, p. 251-259, 1996.

TEIXEIRA, R. B. Dieta de alto grão com milho em confinamento de bovinos. 2015. **Trabalho de Conclusão de Curso** - Universidade Federal de São João del-Rei, Sete Lagoas, 2015.

THEURER, C.B. Grain processing effects on starch utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, Albany, v.63, p.1649-1662, 1986.

TOLEDO, A. F. Suplementação com grão de milho inteiro tipo flint ou feno de gramínea tropical na dieta de bezerros leiteiros. **Dissertação (mestrado)**. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba/SP, 2020.

TOMICH, T.R.; RODRIGUES, J.A.S.; GONÇALVES, L.C. et al. Potencial forrageiro de cultivares de girassol produzidos na safrinha para ensilagem. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.55, p.756-762, 2003.

VALENTE, T.N.P.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. In situ estimation of indigestible compounds contents in cattle feed and feces using bags made from different textiles. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.666-675, 2011.

VAN DER POEL, A.F.B., DE VRIES, S., BOSCH, G. Feed processing, in: Moughan P. J., and W. H. Hendriks. **Feed evaluation science**. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, pp. 295-326, 2018.

VASCONCELOS, R.C.; PINHO, R.G.V.; REZENDE, A.V.; PEREIRA, M.N.; BRITO, A.H. Efeito da altura de corte das plantas na produtividade da matéria seca e em características bromatológicas da forragem de milho. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.6, p.1139-1145, 2005.

ZINN, R. A, OWENS F. N, WARE R. A. Flaking corn: processing mechanics, quality standards, and impacts on energy availability and performance of feedlot cattle. **Journal of Animal Science**. v. 80, p. 1145-1156.2002.