



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**SILAGEM DE GRÃO DE MILHO REIDRATADO ADITIVADA COM PROTEASE  
NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS**

**HELLÉN FELICIDADE DURÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – Área de Concentração: Produção Animal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

**Orientador:** Dr. Euclides Reuter de Oliveira

**Coorientador:** Dr. Jefferson Rodrigues Gandra

**DOURADOS-MS**

**MARÇO- 2022**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**SILAGEM DE GRÃO DE MILHO REIDRATADO ADITIVADA COM PROTEASE  
NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS**

**HELLÉN FELICIDADE DURÃES**

**Zootecnista**

Orientador: Dr. Euclides Reuter de Oliveira

Coorientador: Dr. Jefferson Rodrigues Gandra

**DOURADOS-MS**

**MARÇO- 2022**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

D948s	<p>Durães, Hellén Felicidade. Silagem de grão de milho reidratado aditivada com enzima. / Hellén Felicidade Durães. – Dourados, MS : UFGD, 2022.</p> <p>Orientador: Prof. Jefferson Rodrigues. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Grão de milho. 2. Silagem reidratada. 3. Enzima protease. 4. Vacas leiteiras. I. Título.</p>
-------	--

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.**

**©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.**

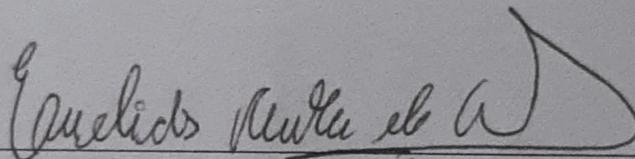
**SILAGEM DE GRÃO DE MILHO REIDRATADO ADITIVADA COM PROTEASE  
NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS**

por

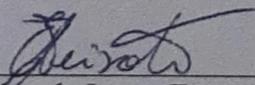
**HELLÉN FELICIDADES DURÃES**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título  
de MESTRE EM ZOOTECNIA

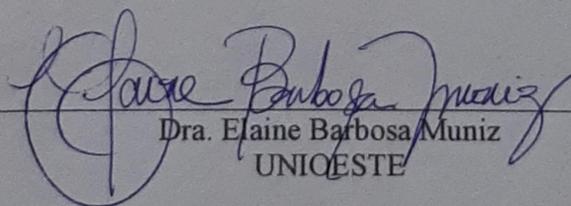
Aprovado em: 05/03/2022



Dr. Euclides Reuter de Oliveira  
Orientador – UFGD



Dr. Eduardo Lucas Terra Peixoto  
UFGD



Dra. Elaine Barbosa Muniz  
UNIOESTE

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

Hellén Felicidade Durães, filha de José Adilson Durães e Euza Aparecida da Silva Durães, nascida em 13 de fevereiro de 1997 na cidade de Montes Claros no norte de Minas Gerais. Concluiu o ensino médio em 2014 e em 2015 ingressou no curso de Graduação em Zootecnia pela Universidade Estadual de Montes Claros- Unimontes, Campus Janaúba, onde concluiu o curso em 2020. Em fevereiro de 2020 iniciou-se as atividades como aluna no curso de Mestrado no programa de Pós-graduação em Zootecnia, pela Universidade Federal da Grande Dourados, onde durante o mestrado foi bolsista CAPES.

*A meu Deus que sois meu refúgio, minha fortaleza eu confio  
em voz. Aos meus pais por incentivarem mesmo com a distância  
e saudade entre nós para que meu sonho seja realidade!*

***Dedico***

## AGRADECIMENTOS

*É com sentimento de dever cumprido que abraço essa conquista.*

*Ao meu Pai do céu, por que hoje estou aqui com mais uma meta cumprida, pela Sua presença diária, pelas bênçãos em minha vida, por me carregar no colo na caminhada dura e por me mostrar o caminho que devo seguir rumo ao céu.*

*Aos meus pais José Adilson Durães e Euza Aparecida da Silva Durães, obrigada pelo apoio apesar da distância que nos separa, mas eu sinto seus carinhos sobre mim, obrigado por eu sempre fazer parte de suas orações diárias.*

*As minhas irmãs Tânia Marta Durães e Maria Hérika Durães pela amizade e companheirismo, pelas risadas e abraços.*

*Aos meus avós Joaquina Alves (In memoriam) e José Rodrigues (In memoriam) pelo incentivo e coragem a seguir minha vida em frente, por mostrarem que a vida segue e que as lembranças e o amor permanecem. Aos meus bisavós Maria Novais (In memoriam) e Hilário Durães (In memoriam) pelo incentivo e amor.*

*A toda minha família, pelo apoio e incentivo a seguir em busca dos meus sonhos, obrigada pelo carinho.*

*Ao meu orientador Dr. Euclides Reuter de Oliveira, pelos questionamentos, contribuições e ensinamentos, que muito colaboraram para o meu aprendizado.*

*Ao Coorientador Professor Dr. Jefferson Rodrigues Gandra, pelos ensinamentos repassados.*

*Ao professor Dr. Flávio Pinto Monção por me incentivar e acreditar no meu potencial.*

*Aos professores Andrea Maria de Araujo Gabriel, Eduardo Lucas Terra Peixoto e Elaine Barbosa Muniz por fazerem parte da banca.*

*A minha querida Cinara da Cunha Siqueira Carvalho pelo incentivo em todas as horas.*

*Aos donos da fazenda Nossa Senhora Abadia, Sr. Valdomiro e Dona Abadia, Marcos e Danielle pela disponibilização da fazenda, pelo suporte e funcionários. Aos funcionários em especial a Fabio Lima Guisso e Walmir por toda ajuda.*

*A todos os meus colegas do grupo de pesquisa, pela ajuda na realização da minha pesquisa, em especial a Rosilene Teixeira, Thamires Golff, William Gouvea, Brasilino Pereira, Hindira Folador, Nathalie Neves, Orlando Felipe Marques, Jean Kaique Valentim, Murilo Lima.*

*Aos meus colegas da Pós -Graduação, em especial: Yasmim Picanço, Juliana Dias de Oliveira, Jaqueline Murback Braz, Geovana Ureo.*

*A Maria Paula por estar sempre ao meu lado nesses últimos anos. Obrigada pelos conselhos e carinho.*

*Aos queridos amigos de longas datas, obrigada por escutarem as minhas alegrias, angústias e experiências, em especial a Sandro Alves, Jessica Rodrigues, Larissa Ferreira, Deisiane Rodrigues, Wellington Rafael.*

*A Janaina Tainá Silva o meu muito obrigada, pela amizade, carinho, compreensão e ajuda vou levar você sempre comigo.*

*Obrigada as amigas da “Casa das quatro mulheres” em especial a Cristiane e Yasmim por todo carinho, companheirismo e sobretudo a amizade e a acolhida.*

*Aos amigos do Jovens Com Fé em especial a Barbara, Altair, Mateus, João, Caio, Amanda, Isabely, Kerolyn e Maria Vitória, A tia Solange e tia Silmara, vocês foram força e fé na minha caminhada e minhas melhores lembranças de Dourados.*

*Ao Grupo de Jovens Shalon de Goiânia e o Grupo Cristo Vive que sempre me acolheram de braços abertos.*

*A Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade de realização de meu curso de Mestrado e pelo suporte com veículos e funcionários. Aos mestres e funcionários por todo aprendizado concedido*

*A CAPES, por financiar parte deste trabalho.*

*A todos que de uma forma ou de outra contribuíram e me colocaram nas suas orações, em favor dos meus sonhos, e agora se alegram comigo nessa vitória. Muito obrigada e que Deus abençoe a cada um de vocês.*

*"Cumpre o pequeno dever de cada momento; faz o que deves e está no que fazes."*

**(São José Maria Escrivá)**

## Sumário

<b>1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....</b>	<b>3</b>
<b>2. HIPÓTESES .....</b>	<b>3</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>5</b>
<b>3.1 Geral .....</b>	<b>5</b>
<b>3.2 Específicos.....</b>	<b>5</b>
<b>4. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>5</b>
<b>4.1 Utilização do grão de milho na alimentação de vacas leiteiras.....</b>	<b>5</b>
<b>4.2 Hidratação e ensilagem dos grãos de milho.....</b>	<b>8</b>
<b>4.3 Enzimas proteolíticas .....</b>	<b>11</b>
<b>4.4 Metabolismo de carboidratos e proteínas.....</b>	<b>14</b>
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
<b>5.1 Preparação dos animais e dietas.....</b>	<b>16</b>
<b>5.2 Preparação das silagens.....</b>	<b>17</b>
<b>5.3 Consumo e digestibilidade de matéria seca e nutrientes.....</b>	<b>18</b>
<b>5.4 Fermentação ruminal.....</b>	<b>19</b>
<b>5.5 Balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana.....</b>	<b>20</b>
<b>5.6 Produção e composição do leite .....</b>	<b>20</b>
<b>5.7 Parâmetros sanguíneos.....</b>	<b>21</b>
<b>5.8 Comportamento ingestivo.....</b>	<b>22</b>
<b>5.9 Análises estatísticas.....</b>	<b>22</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>8. CONCLUSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>9. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>35</b>
<b>CAPITULO I - Artigo redigido</b>	
<b>1. Introdução.....</b>	<b>45</b>
<b>2. Material e Métodos.....</b>	<b>46</b>
<b>3. Resultados .....</b>	<b>52</b>
<b>4. Discussão .....</b>	<b>60</b>
<b>5. Conclusão .....</b>	<b>66</b>
<b>6. Referências.....</b>	<b>66</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS**

- AGVs - Ácidos Graxos Voláteis
- AGCC - Ácidos Graxos de Cadeia Curta
- CHO – Carboidratos totais
- CMS – Consumo de Matéria Seca por Animal
- CNF – Carboidratos Não Fibrosos
- EC - Energia corrigida (Mcal/dia)
- EE - Extrato Etéreo
- FDN - Fibra insolúvel em Detergente Neutro
- FDA- Fibra insolúvel em Detergente Ácido
- MO - Matéria orgânica
- MS -Matéria Seca
- NDT - Nutrientes Digestíveis Totais
- N-NH<sub>3</sub> - Nitrogênio amoniacal
- PB – Proteína Bruta
- PC - Produção de Leite corrigida
- PL- Produção de leite
- SGR- Silagem de Grão Reidratado

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1– Composição nutricional da dieta controle e da dieta com substituição total do milho moído por silagem de grão úmido de milho reidratado.....</b>	<b>16</b>
<b>Tabela 2– Consumo de matéria seca e nutrientes de vacas leiteiras alimentadas com silagem de grão reidratado com ou sem protease.....</b>	<b>23</b>
<b>Tabela 3 – Produção de ácidos graxos voláteis de vacas leiteiras alimentadas com silagem de grão reidratado com ou sem protease.....</b>	<b>24</b>
<b>Tabela 4 – Compostos químicos de vacas leiteiras alimentadas com silagem de grão reidratado com ou sem protease.....</b>	<b>25</b>
<b>Tabela 5– Consumo de frações de partículas de vacas leiteiras alimentadas com silagem de grão reidratado com ou sem protease.....</b>	<b>27</b>
<b>Tabela 6– Produção e composição do leite de vacas leiteiras alimentadas com silagem de grão reidratado com ou sem protease.....</b>	<b>28</b>
<b>Tabela 7– Composição de ácidos graxos do leite de vacas leiteiras alimentadas com silagem de grão reidratado com ou sem protease.....</b>	<b>30</b>

## RESUMO

Objetivou-se por meio desse trabalho avaliar a adição de protease em silagem de grão de milho reidratado, fornecido como base alimentar para vacas leiteiras observando seus efeitos sobre o consumo e digestibilidade de nutrientes e metabolismo ruminal. O trabalho foi conduzido na propriedade “Nossa Senhora Abadia”, localizada no município de Douradina no Estado de Mato grosso do Sul. Foram utilizadas oito vacas Jersey (432,91 Kg) com  $45 \pm 5$  dias de lactação, seguindo um duplo quadrado latino  $4 \times 4$ . As dietas experimentais foram: 1- CONTROLE (Dieta Basal), 2- SGR-0 (silagem de grão reidratado de milho sem adição de protease), 3- SGR-500 (inclusão de 500 g/t de protease na silagem), 4- SGR-1000 (inclusão de 1000 g/t de protease). A duração total do tempo experimental foi de 82 dias, onde cada período de 18 dias foi composto de 14 dias de adaptação e 4 de coleta de dados e avaliou-se o consumo e a digestibilidade de matéria seca e nutrientes, bem como a fermentação ruminal, o balanço de nitrogênio, síntese de proteína microbiana e produção de leite. Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre a dieta controle (584,43) e a silagem de grão reidratado (SGR) (618,58) para a digestibilidade de MS, sendo que a utilização da silagem melhorou a mesma, além disso quando incluiu enzima protease nas silagens houve aumento significativo da digestibilidade de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB) e fibra de detergente neutro (FDN). Houve efeito ( $P < 0,05$ ) dos tratamentos sobre os parâmetros ruminais produção de AGV's, metano, nitrogênio amoniacal e pH para a SGR, resultantes principalmente pelo aumento da digestão de amido e no teor de NDT das dietas. As vacas que consumiram silagem com maiores doses de protease aumentaram significativamente a produção de acetato e propionato. A silagem de grão reidratado foi melhor que a dieta controle (Mcal/dia) em todos os parâmetros de eficiência produtiva (Produção de Leite=22.43) e (Energia Corrigida=22.34), que aumentou linearmente de acordo com as doses de protease. Conclui-se que o uso de silagem de grão de milho reidratados e/ou com enzima protease na alimentação de vacas leiteiras melhora digestibilidade e produtividade dos nutrientes e metabolismo sem modificar a composição química.

**Palavras-chave:** Aditivo enzimático; Digestibilidade; Ensilagem; Metabolismo.

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the addition of protease in rehydrated corn grain silage, provided as a food base for dairy cows, observing its effects on the consumption and digestibility of nutrients and rumen metabolism. The work was carried out on the property “Nossa Senhora Abadia”, located in the municipality of Douradina in the state of Mato Grosso do Sul. Eight Jersey cows (432.91 kg) with  $45 \pm 5$  days of lactation were used, following a 4x4 double latin square. The experimental diets were: 1- CONTROL (Baseline Diet), 2- SGR-0 (rehydrated corn grain silage without protease addition), 3- SGR-500 (inclusion of 500 g/t of protease in the silage), 4 - SGR-1000 (inclusion of 1000 g/t of protease). The total duration of the experimental time was 82 days, where each period of 18 days was composed of 14 days of adaptation and 4 of data collection and the consumption and digestibility of dry matter and nutrients, as well as rumen fermentation were evaluated. , nitrogen balance, microbial protein synthesis and milk production. There was a significant difference ( $P < 0.05$ ) between the control diet (584.43) and rehydrated grain silage (SGR) (618.58) for DM digestibility, and the use of silage improved it, in addition to Furthermore, when the protease enzyme was included in the silages, there was a significant increase in the digestibility of dry matter (DM), organic matter (OM), crude protein (CP) and neutral detergent fiber (NDF). There was an effect ( $P < 0.05$ ) of the treatments on the ruminal parameters VFA production, methane, ammonia nitrogen and pH for SGR, resulting mainly from the increase in starch digestion and TDN content of the diets. Cows that consumed silage with higher doses of protease significantly increased the production of acetate and propionate. Rehydrated grain silage was better than the control diet (Mcal/day) in all productive efficiency parameters (Milk Production=22.43) and (Corrected Energy=22.34), which increased linearly with protease doses. It is concluded that the use of rehydrated corn grain silage and/or with protease enzyme in the diet of dairy cows improves digestibility and productivity of nutrients and metabolism without modifying the chemical composition.

**Keywords:** Enzyme additive; Digestibility; Silage; Metabolism.

## 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Dado o cenário que se desenha, o setor lácteo nacional apresenta dificuldade para gerar excedentes de produção devido à queda nos preços e piora da rentabilidade em toda a cadeia produtiva. Em 2020, o ano de início da pandemia da Covid-19, a disponibilidade de leite no Brasil aumentou 2,8%, no entanto desde janeiro de 2020, o custo de produção de leite tem apresentado trajetória de crescimento, de acordo com a EMBRAPA, produzir leite ficou 34,6% mais caro. Entre os grupos de insumos que compõem o índice, as maiores participações estão relacionadas à dieta do rebanho: Alimentação Concentrada e Produção e Compra de Volumosos, que, juntos, representam 61,7% do indicador (ZAGONEL2021).

O milho é o principal concentrado energético utilizado para a alimentação de vacas leiteiras, entretanto a indústria no Brasil utiliza um híbrido duro, com forte matriz proteica que recobre os grânulos de amido, limitando assim o ataque microbiano no rúmen, diminuindo também a ação enzimática no intestino delgado (MENEZES et al., 2017). O uso de se ensilar grãos úmidos de milho é uma alternativa a fim de melhorar o armazenamento de grãos na propriedade rural, elevar a digestibilidade em relação ao milho seco, podendo favorecer as características fermentativas.

O uso de silagem advindos de grãos reidratado surge como um incremento de produção para aumentar potencialmente o aproveitamento do amido, influenciando na redução de perdas e potencializando o desempenho animal, além disso é capaz de ser produzida durante todo o ano (SILVA et al., 2020), permitindo aos produtores a compra de grandes quantidades nas épocas do ano que apresentam os preços mais baixos, se beneficiando da economia (ÁVILA et al., 2018). A reidratação de milho consiste em devolver ao grão já seco a umidade adequada para que o mesmo seja fermentado na ensilagem (DEFOOR; BROWN; OWENS, 2006)

Entre as proteínas do endosperma de cereais, as prolaminas são aquelas que se encontram associadas aos grânulos de amido, formando uma matriz amido-proteica, representando de 44 a 79% da proteína no endosperma (LANDRY; DELHAYE; DAMERVAL, 2004).

Em um trabalho realizado por Windle, Walker e Kung Júnior (2014) avaliando a adição de protease na silagem da planta de milho abertas 45, 90 e 150 dias após a ensilagem, observaram que a silagem com protease aos 45 dias após a ensilagem teve teor maior de proteína solúvel ao da silagem controle aos 90 dias de ensilagem, sugerindo que houve maior taxa de proteólise no silo em resposta da enzima. A digestibilidade do amido foi estudada em digestibilidade *in vitro* com tempo de incubação de 7 horas. A inclusão de protease à silagem aumentou mais a digestibilidade do amido na silagem com maior teor de MS do que na forragem *in natura*.

Avaliando o uso de protease em silagem de grão úmido de milho Kung, Windle e Walker (2014) encontraram maior concentração de proteína solúvel e nitrogênio amoniacal e menor teor de prolamina nas silagens com protease que a silagem controle. A protease reduziu o teor de prolamina aos 70 dias de ensilagem de 3,16% para 2,32% da MS e de 2,90% para 1,82% da MS aos 140 dias de ensilagem. A redução da prolamina pode estar relacionada ao ganho em digestibilidade do amido na silagem tratada com protease. A degradabilidade ruminal do amido *in vitro* foi 44,0% no controle e 47,4% com protease. A adição de protease faz do amido da silagem aos 70 dias mais digestível (61,88%) do que em silagem não tratada aos 170 dias (58,34%).

Em trabalho realizado por Ferraretto, Fredin e Shaver (2015) avaliando o uso de protease oriunda de *Bacillus licheniformis* na ensilagem por 30 dias de grão de milho úmido e de grão maduro reidratado, tanto a ensilagem quanto o uso de protease aumentaram a digestibilidade *in vitro* do amido em 7 horas de incubação ruminal. O ganho em digestibilidade do amido da silagem foi acompanhado de aumento no teor de proteína solúvel. Esses autores também observaram que a hidratação do milho sem ensilagem não aumentou a digestibilidade desse alimento. Desta forma hipotetiza-se que a ação de proteases irá melhorar o valor nutricional do alimento em relação às amilases pela redução das perdas de amido no processo fermentativo, bem como o melhor desempenho e digestão de ruminantes.

Dentro desta ótica a proposta para este trabalho foi avaliar o uso da silagem de grão de milho reidratado, bem como a adição protease a silagem de grão de milho reidratado para dieta de vacas leiteiras observando seus efeitos sobre o consumo e digestibilidade de nutrientes, síntese de proteína microbiana, balanço de nitrogênio e fermentação ruminal, comportamento ingestivo, produção e composição do leite.

## **2. HIPÓTESES**

Considerando o efeito da reidratação e da utilização de enzima protease as hipóteses levantadas neste trabalho foram de que (1) a silagem de grão de milho reidratada melhora o desempenho produtivo de vacas leiteiras, (2) a adição de enzima protease à silagem de grão de milho reidratada melhora o desempenho e produção de vacas leiteiras.

### **3. OBJETIVOS**

#### ***3.1 Geral***

Objetivou-se por meio deste trabalho avaliar o efeito da silagem de grãos de milho reidratados e/ou com protease na alimentação de vacas leiteiras sobre o consumo e digestibilidade e metabolismo de fermentação ruminal.

#### ***3.2 Específicos***

Avaliar a composição química e o valor nutricional de silagem de grão de milho reidratado aditivada com enzima protease;

Avaliar o efeito das dietas contendo silagem de grão de milho reidratado aditivada com enzima protease, sobre o desempenho de vacas em lactação alimentados com silagem de milho reidratado.

Avaliar a composição químico-bromatológica da silagem de milho reidratado sem e com adição de enzima proteolítica;

Avaliar o efeito das dietas sobre o consumo e digestibilidade de matéria seca e nutrientes (PB, EE, FDN, amido);

Avaliar a síntese de proteína microbiana e balanço de nitrogênio (produtos derivados de purinas e consumo e excreção de nitrogênio através das fezes); e a fermentação ruminal (pH e concentrações de nitrogênio) de vacas em lactação alimentados com silagem de grão reidratado de milho com e sem adição de enzima proteolítica.

Avaliar o comportamento ingestivo de vacas em lactação alimentados com silagem de grão reidratado de milho.

### **4. REVISÃO DE LITERATURA**

#### ***4.1 Utilização do grão de milho na alimentação de vacas leiteiras***

O Brasil é um dos cinco maiores produtores de leite do mundo, contatando quase 35 bilhões de litros por ano, no entanto o setor lácteo nacional encontra dificuldade para gerar excedentes de produção devido à queda nos preços e piora da rentabilidade em toda a cadeia produtiva. Desde janeiro de 2020, o custo de produção de leite tem apresentado trajetória de crescimento e produzir leite ficou 34,6% mais caro. Entre os grupos de insumos que compõem

o índice, as maiores participações estão relacionadas à dieta do rebanho: Alimentação Concentrada e Produção e Compra de Volumosos, que, juntos, representam 61,7% do indicador (Anuário do Leite, 2021).

A falta de chuvas tem diminuído também a produtividade das lavouras de milho e a qualidade da silagem de produtores de leite, e os custos de produção vêm registrando altas consecutivas. Insumos importantes para a produção de volumoso, como adubos e fertilizantes, são importados, e a desvalorização cambial tem elevado as cotações desses produtos.

A alimentação animal tem se tornado um assunto de alta prioridade para a produção de leite do Brasil, devido muitas vezes às relações não favoráveis por parte dos custos dos insumos, em especial aos concentrados. Devido isto, a busca por tecnologias que permitam eficiência e economicidade tem se intensificado na exploração animal. Além disso, a estacionalidade na produção forrageira também surge como empecilho na produção pecuária do Brasil, pois existem períodos de escassez e períodos de alta produção de forragem, que acabam limitando a produção de forragem tornando a insuficiente para a manutenção animal durante todo o ano (OLIVEIRA, 2014).

Neste contexto denotam a acentuada utilização do grão de milho como fonte de energia para animais de alta produção por sua alta concentração de amido de boa digestibilidade os produtores de ruminantes consideram uma importante alternativa na formulação de concentrados (HEINZEN, 2018).

O grão de milho é estabelecido como o alimento mais empregado como fonte de energia para animais de alta produção e largamente utilizado na alimentação de ruminantes. Sua alta concentração de amido, cerca de 72% de boa digestibilidade e o preço acessível para os produtores, explicam a acentuada utilização na alimentação animal (BURIEL, 2021).

O milho (*Zea mays* L.), pertencente à família Gramineae/Poaceae e é considerada uma das mais importantes espécies de plantas cultivadas, inclusive constitui-se de grande capacidade de armazenamento de energia. No Brasil sua cultura está amplamente disseminada devido a diversidade de cultivares e híbridos e à tradição deste cereal. A CONAB (2022) estima que a primeira safra de milho 2021/2022 deva atingir 29 milhões de toneladas – quase 18% a mais que na temporada anterior.

O grão de milho é constituído em média de 72% de amido, 9,5% proteínas, 9% fibra (a maioria sendo resíduo em detergente neutro) e 4% de gordura. É formado por três principais estruturas físicas (Figura 1): pericarpo (5%) que compreende a porção mais fibrosa; gérmen (11%) onde se encontra a maior parte de proteína; e endosperma (82%), onde se encontra a maior parte do amido, além de conter proteínas, lipídeos e minerais (GOMES, 2021, OLIVEIRA, et al., 2014).

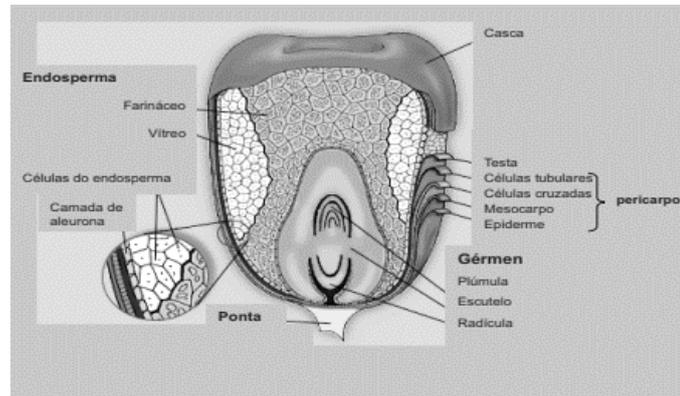


Figura 1. Anatomia do grão de milho. Fonte: adaptado de encyclopedia Britannica (2006).

O endosperma é constituído principalmente de amido (88%) organizado na forma de grânulos. No endosperma estão presentes também as proteínas de reserva (8%) do tipo prolaminas, chamadas zeínas. Essas proteínas originam os corpos proteicos que compõem a matriz que envolve os grânulos de amido dentro das células no endosperma (GOMES, 2021).

A classificação do grão de milho de acordo com a distribuição dos grânulos de amido e da matriz de proteína no endosperma é dentado, duro, farináceo, pipoca e doce. Sendo o duro mais produzido no Brasil (DE CASTRO MOURÃO et al., 2012). Já a classificação de acordo com a distribuição dos grânulos de amido e da matriz proteica se dá em dois tipos: endosperma farináceo quando as ligações estão mais dispersas e endosperma vítreo quando o amido está fortemente ligado a matriz proteica (PARENTE, 2021). Ao redor do grão de milho contém endosperma vítreo, com alta dureza. Os grãos de milho do tipo farináceo, opaco e grãos imaturos tem menos quantidade de prolaminas que os milhos tipo duro e os de grãos maduros (DAVIDE, 2009).

As prolaminas são aquelas proteínas que estão ligadas ao amido dos cereais, são solúveis em álcool e sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso de onde são transportadas para o citoplasma das células, e a partir daí fazem parte dos corpos proteicos e permanecem no exterior dos grânulos de amido (MU-FORSTER; WASSERMAN, 1998). Teor de prolamina em porcentagem do amido acima de 10% é caracterizado alto, e o teor abaixo de 2% é considerado muito baixo (HOFFMAN; SHAVER, 2010).

As prolaminas são denominadas de zeínas quando representam de 30 a 60% da proteína englobadas no grão do milho (HAMAKER et al., 1995). A parte proteica do endosperma do milho contém proteínas chamadas de zeínas (prolaminas) e não-zeínas (albumina, globulinas e glutelinas) (GIBBON; LARKINS, 2005), Sendo as zeínas de grande significância dentro da nutrição de ruminantes.

Substancialmente, a maior parte da produção mundial de milho é destinada a alimentação animal (75%), por ser considerado um alimento altamente energético para a dieta animal, ainda devido à sua composição predominantemente de carboidratos (amido) e lipídeos (óleo). Logo possui 8% de PB, 84,9% a 88,8% de carboidratos totais, sendo este considerado o principal carboidrato (CHO) do grão e baixo poder como tamponante (NDT= 0,850 kg/kg).

#### ***4.2 Hidratação e ensilagem dos grãos de milho***

A questão problemática do grão de milho está na fase de armazenamento do grão de milho, visto que vários fatores como a secagem; temperatura; umidade relativa do ar, roedores, pássaros e outros animais (SILVA, 2021); danificações mecânicas e outras alterações químicas e bioquímicas; o ataque de insetos e as toxinas, bem como o surgimento de microrganismos indesejáveis (ARAULO, 2021), podem tornar o alimento inutilizável para consumo ou para industrialização. Além disso, devido ao aumento no custo de produção seja para leite e/ou carne, tem se a necessidade de investimento em tecnologias economicamente viáveis por parte dos produtores, para se manterem no mercado e, conseqüentemente, aumentar a produção animal.

Em um sistema de pecuária eficiente e economicamente viável tem se necessidade de uma reserva de alimentos com o intuito de suplementar os animais nos períodos desfavoráveis dos custos dos insumos ou simplesmente para minimizar os efeitos negativos no desempenho quando há escassez de alimentos. A silagem de milho é um dos principais ingredientes das dietas de gado leiteiro, e tem-se ampliado a sua utilização nas dietas de vacas lactantes. Pela melhor digestibilidade do amido tende a aumentar o desempenho da lactação e a eficiência alimentar dos animais (FIRKINS ET AL., 2001; FERRARETTO ET AL., 2013).

Nesse contexto, surge também à realização de estudos com silagem de grãos de milho reidratados justificando-se, dentro de diversos fatores, a utilização do grão reidratado diminui-se o risco de insucesso presentes na silagem do grão úmido caracterizada por um elevado risco de problemas logísticos na colheita pela perda de umidade dos grãos (CARDOSO, 2018). Além disso, em função de ser um processo executável na propriedade e proporcionar ao produtor a facilidade de armazenamento do alimento (ARAÚJO 2021)

Os primeiros estudos sobre esta tecnologia de ensilagem de grãos foram realizados nos Estados Unidos na década de 50, e após 20 anos, este procedimento virou rotina em muitos confinamentos no país (COSTA et al., 2004). Ainda que o grão de milho seja largamente utilizado na alimentação de ruminantes, o uso de grãos ensilados é pouco empregado no Brasil, sendo uma tecnologia em expansão, e seu uso na alimentação de animais em confinamento é dado em suma ao grão seco triturado (ALCALDE et al.,1994; CRUZ et al.,1995; SOUZA, et al.,1995).

O emprego desta técnica foi instaurado e propagado na Universidade Federal de Lavras – Lavras (MG) por pesquisadores, como uma alternativa ao uso de silagem de grãos úmidos de milho. Apesar de seu uso na alimentação de ruminantes ocorrer comumente, ainda há grande lacuna de informações a serem respondidas pelas pesquisas atuais. Segundo Jobim (2010), o aproveitamento do amido pelo animal decorre do processamento em que o grão é submetido e que o aproveitamento é fundamental para melhorar a eficiência produtiva dos animais.

A primeira etapa para a produção da silagem de milho reidratado é a moagem bem fina. Este processo interfere diretamente a qualidade da silagem. De acordo com Silva et al., (2018), o tamanho do grão pode influenciar a recuperação de matéria seca e o perfil fermentativo, modificar a estabilidade aeróbia, além disso silagens de grãos moídos com granulometria fina aumenta a degradação das prolaminas, pela maior superfície de contato, deixando os nutrientes mais disponíveis para serem utilizados pelas bactérias do rúmen (TSE et al., 2006), aumentando assim a digestibilidade e melhorando o aproveitamento pelo animal (COSTA, 2013).

Para a produção da silagem de milho reidratado, o grão é hidratado obtendo uma mistura homogênea de aspecto pastoso, para que o alimento tenha potencial em torno de 35 a 40% de umidade e assim adquira atividade de água necessária para fermentação (ÁVILA et al., 2018). Para colaborar com o teor de umidade adequado e permitir a fermentação da ensilagem, é necessária uma homogeneização apropriada do milho moído com a água (ANDRADE, 2013). Uma vez que a reidratação do grão não seja feita de maneira ideal, a fermentação da silagem ficará comprometida, podendo colaborar para o crescimento de microrganismo indesejáveis e, conseqüentemente, a perdas de matéria seca (DEFFOR et al., 2006) e na degradabilidade da proteína (BENTON et al., 2005).

Para Batista (2019), a moagem do grão combinada com a reidratação permite que os nutrientes ficam mais expostos e, conseqüentemente, aumenta o acesso dos microrganismos para atuarem na fermentação do grão e dos microrganismos do rúmen. Silva et al. (2018) quando aliaram a moagem fina dos grãos com a reidratação encontraram aumento de 28% na produção de ácido láctico e redução dos teores de fibra em detergente neutro (8,71%) e fibra em detergente ácido (16,71%), diferentemente da silagem de grão de milho grosso reidratado.

Silagem de grão reidratado apresenta em geral, melhor valor nutricional e maior digestibilidade do amido, quando comparados com o milho seco moído (MAIA et al., 2017). Já um teor de umidade acima de 40% pode causar diminuição na produção de ácido láctico e de ácidos totais, pela fermentação inadequada, favorecendo a produção de gases indesejáveis como CO<sub>2</sub>, ácido butírico, além de menor estabilidade aeróbia (REZENDE, et al., 2014; BATISTA, 2019)

Após a hidratação, compactação e vedação do material, se inicia a fermentação realizada por microrganismos da fauna epifítica da planta, a partir dos carboidratos solúveis contidos no grão produzindo ácidos orgânicos, principalmente ácido lático (Heinzen 2018). Esses ácidos liberam hidrogênio para o meio resultando na diminuição do pH e então conservando o alimento além de evitar fermentações indesejáveis como a realizada por bactérias do gênero *Clostridium* (McDONALD et al., 2010). A ausência do oxigênio também favorece a produção do ácido lático beneficiando a massa ensilada em uma massa fermentada e apropriada para o consumo animal (RAMOS, 2021).

A ensilagem constitui-se uma estratégia viável para a alimentação de ruminantes em todo o território tropical, sendo vantajosa por ser simples e altamente eficiente (TEIXEIRA ET AL., 2009). Geralmente diversos fatores podem ocasionar perdas nesse processo, sendo eles: má compactação do material, colheita da massa forrageira fora do ponto ideal, bem como uma vedação inadequada. Esses fatores influenciam diretamente na fermentação, podendo proporcionar o desenvolvimento de microrganismos e produtos indesejáveis (RAMOS, 2021).

A fermentação conserva a massa ensilada e inibi o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, como leveduras, fungos e *Clostridium* que possa causar danos ao material (REIS et al., 2001). A fermentação da massa ensilada também leva ao aumento da digestibilidade da MS e do amido devido à ação das bactérias epifíticas, que causam a rupturas na matriz proteica que recobre os grânulos de amido, aumentando a absorção do mesmo, efeito esse intensificado pela modulação do crescimento microbiano devido à alta umidade (JOBIM 2010; GOBETTI et al., 2013).

O processo de fermentação da silagem envolve quatro fases: fase aeróbia, fase de fermentação ativa, fase estável e fase de descarga (retirada da silagem). Essas fases apresentam diferentes durações e intensidades e não podem ser separadas precisamente uma da outra (Pereira e Santos, 2006).

Silva et al., (2016) observaram menor estabilidade aeróbica em silagem de grão reidratado quando comparado com as silagens de grão úmido. Subtendendo que a maior quantidade de fungos presentes e maior quantidade de água disponível podem ter interferido, além de que silagens que apresentam melhor valor nutricional são mais propensas à deterioração aeróbia, pelo fato de apresentar maiores teores de substratos, corroborando para desenvolvimentos de fungos e leveduras.

Bitencourt (2012), analisando a substituição do milho moído por silagem de milho reidratado encontrou maior consumo de MS e menor teor de amido nas fezes dos animais submetidos ao tratamento com silagem de milho reidratado. Indicando assim melhor aproveitamento de amido, conseqüentemente aumento na produção de leite. A redução do teor

de amido nas fezes está relacionada à ruptura da ligação amido-proteína, liberando o amido das prolaminas, tornando-o disponível para microrganismos do rúmen.

Batalha (2015) trabalhando com vacas produzindo em média 13 kg leite dia<sup>-1</sup> não observou diferença significativa em relação à silagem de grão úmido, grão reidratado e floculação do grão de milho, constatando que a baixa produção de leite pode estar ligada ao baixo consumo de concentrado, pela ausência de diferença no consumo de nutrientes digestíveis totais, e da digestibilidade. Porém Moraes (2016) trabalhando com ensilagem de grãos reidratados constatou que a técnica melhorou o valor nutricional do grão de milho, observando o oposto com o grão de milho seco. Não se observou diferença entre a fração solúvel, prontamente digestível e indigestível, aditivadas ou não com bezoato de sódio para os dois tipos de processamento.

O fornecimento de silagem deteriorada pode resultar em redução no consumo de matéria seca e desempenho do animal (DOLCI et al., 2011), adjunto as silagens de grão de milho tendem a alta quantidade de ácido lático, o que as tornam mais susceptíveis a deterioração após a abertura do silo (BERNARDES et al., 2012). Prescreve-se então o uso de inoculantes que introduzidos no momento da ensilagem (FRANZONI, 2012) possa aumentar a estabilidade aeróbia durante o fornecimento no comedouro (MENDES et al., 2008). Sendo uma alternativa para a preservação do material, pois silagens de milho inoculadas com bactérias homoláticas e enzimas apresentaram maior estabilidade aeróbia quando comparada as silagens não inoculadas (GIMENES et al., 2006).

A reidratação e ensilagem de grãos de milho maduros terrestres tem como fim otimizar a digestibilidade da dieta (Bitencourt, 2012; Arcari et al., 2016), bem como a degradação das prolaminas por enzimas microbianas e vegetais durante a ensilagem gera também aumento na digestibilidade do milho.

### ***4.3 Enzimas proteolíticas***

As enzimas são compostas por polímeros de aminoácidos e sua principal atividade é decompor moléculas compostas em unidades menores, como os carboidratos em açúcares (SOARES et al., 2010). São proteínas globulares específicas, que não catalisam as reações químicas acelerando a velocidade das reações, não afetando o equilíbrio das mesmas, não sendo alteradas durante o processo (NELSON e COX, 2014) Biocatalisadores empregados abundantemente em procedimento industriais e biotecnológicos, possuindo grande relevância econômica (Chapman et al., 2018).

A BBC Research (2019) publicou uma atualização que a produção mundial de enzimas industriais alcançou um valor de US\$ 5,5 bilhões, em 2018, e a expectativa é de que este mercado atinja 7,0 bilhões de dólares até 2023 (MAGALHÃES, 2019).

As enzimas podem ser introduzidas na alimentação animal, como o intuito de um eficiente aproveitamento dos nutrientes pelos animais, melhorar a digestibilidade dos alimentos reduzindo o consumo de matéria seca, além de prevenir possíveis casos de distúrbios gastrointestinais (FREITAS et al., 2018). A formulação de dietas para alimentação animal incluindo aditivos enzimáticos em sua composição, não tem função nutricional, e sim auxiliar no processo digestivo aumentando a digestão e a disponibilidade dos nutrientes presentes na silagem.

As enzimas possuem pH e temperatura ideais que exercem melhor suas funções, em temperatura excessiva ou queda brusca de pH, ocorre a desnaturação das enzimas, consequentemente as suas funções perdidas ou comprometidas (CAMPESTRINI et al., 2005). As enzimas que complementam quantitativamente as enzimas digestórias endógenas dos animais são as proteases, amilase e fitases (CAMPESTRINI et al., 2005).

A utilização das enzimas na alimentação dos animais pode trazer efeitos benéficos, contribuindo no menor efeito de fatores antinutricionais dos alimentos, maior ingestão de matéria seca e degradação ruminal do amido, consequentemente aumentando o ganho em peso e eficiência alimentar (MCGRATH et al., 2018; DI LORENZO et al., 2011).

Brito, (2010) trabalhando com diferentes níveis de enzimas (0; 0,3; 0,9; e 2,7 g/kg MS), estudou o efeito no desempenho animal e não encontraram diferenças significativas para as variáveis analisadas (ganho de peso, rendimento de carcaça, área de olho de lombo), explicado por que podem ocorrer grande diferenças entre os resultados quando se trabalha com enzimas, que pode ser influenciada pelas características da própria enzima ou por fatores ligados ao ambiente ou ao tipo de alimento utilizado.

Dentre as enzimas existentes, as proteases tendem a se destacar pelas inúmeras funções, sobre a indústria mundial, como exemplo a de produtos alimentícios (RAVEENDRAN ET AL., 2018), farmacêuticos (KUMAR ET AL., 2015) e de limpeza (GIRI ET AL., 2011). Além disso as proteases são fisiologicamente importantes para a vida e largamente distribuídas na natureza (FÉLIX ET AL., 2004; KUMAR ET AL., 2005), hidrolisam cadeias peptídicas, e são descritas também como como peptidase, proteinase ou enzima proteolítica.

As proteases são agrupadas pelo tipo de reação de catálise (RAWLINGS; MORTON; BARRETT, 2007). Endopeptidases hidrolisam cadeias alfa peptídicas a cadeias polipeptídicas por ação interna na molécula proteica, tendendo a agir próximo ao N-terminal ou C-terminal. Geralmente, endopeptidases começam a quebra de alimentos proteicos, para agirem na

sequência da proteólise as exopeptidases, que requerem o grupo N-terminal e C-terminal livres. Um outro tipo de protease é a ômega-peptidase, que age próximo aos aminoácidos terminais da cadeia proteica.

Em 2012 Young et al. estudaram a adição de protease exógena na forragem de milho no momento da ensilagem, em doses de 20 ou 2.000 mg/kg de MS da forragem. A silagem foi avaliada aos 45 e 150 dias após a ensilagem. A adição de protease aumentou o teor de proteína solúvel e nitrogênio amoniacal na silagem, sugerindo que houve maior degradação proteica durante a ensilagem, e a degradação apresentada foi ainda maior no tempo de 150 dias de ensilagem ( $P < 0,01$ ), com maior ganho da digestibilidade do amido.

Windle, Walker e Kung Júnior (2014) também trabalharam com adição de protease à silagem da planta de milho e encontrou diferença no estágio de maturidade da planta à colheita. A digestibilidade do amido foi estudada em digestibilidade in vitro com tempo de incubação de 7 horas, sendo que a inclusão de protease à silagem aumentou mais a digestibilidade do amido na silagem com maior teor de MS do que na forragem imatura. A silagem acrescida de protease teve digestibilidade do amido aos 45 d de ensilagem similar à digestibilidade do amido da silagem armazenada sem enzima por 150 dias.

Kung, Windle e Walker (2014) trabalharam com protease em silagem de grão úmido de milho, confeccionaram silos experimentais em sacos embalados a vácuo e abertos com 70 ou 140 dias. Silagens com protease tiveram maior concentração de proteína solúvel e nitrogênio amoniacal e menor teor de prolaminas que a silagem controle. A protease reduziu o teor de prolaminas aos 70 dias de ensilagem de 3,16 para 2,32% da MS e de 2,90 para 1,82% da MS aos 140 dias de ensilagem ( $P < 0,01$ ). A redução da prolaminas geralmente leva-nos a ideia da relação com o ganho em digestibilidade do amido na silagem tratada com protease. A degradabilidade ruminal do amido in vitro foi 44,0% no controle e 47,4% com protease. A adição de protease faz do amido da silagem aos 70 d mais digestível (61,88%) do que em silagem não tratada aos 170 d (58,34%). A degradação de prolaminas por proteases microbianas e vegetais durante a ensilagem gera também aumento na digestibilidade do milho (HOFFMAN ET AL., 2011; JUNGES ET AL., 2017).

Ferraretto, Fredin e Shaver (2015) avaliaram a utilização de protease oriunda de *Bacillus licheniformis* na ensilagem por 30 dias de grão de milho úmido e de grão maduro reidratado. Tanto a ensilagem quanto o uso de protease aumentaram a digestibilidade in vitro do amido em 7 horas de incubação ruminal. O aumento na digestibilidade do amido da silagem foi acompanhado de aumento no teor de proteína solúvel.

Junges et al. (2017) observando a composição química da silagem de grão reidratado de milho com diversas fontes proteolíticas verificou teores de MS variando de 67 a 68,3 % não

variando entre si estatisticamente ( $P>0,05$ ), para os teores de pH e ácido lático, a silagem controle obteve os melhores resultados (3,74 e 1,93), mas em contrapartida o valor de  $\text{NH}_3\text{-N}$  (N%), foi de 7,36, esse valor sugere que fontes proteolíticas aumentam a solubilidade das prolaminas, corroborando positivamente na digestibilidade do amido.

#### ***4.4 Metabolismo de carboidratos e proteínas***

A digestão de alimentos envolve um processo extremamente complexo dos microrganismos, enzimas e ações dinâmicas. A proteína da dieta dos animais é catabolizada por bactérias e protozoários no rúmen em aminoácidos e amônia e estes por consequência são produtos finais utilizados para síntese de proteína microbiana. Os carboidratos por sua vez são fermentados em ácidos graxos voláteis que são usados na produção de energia e a eficiência do crescimento microbial depende da qualidade da energia no rúmen. Os microrganismos são digeridos no abomaso e intestino delgado e os aminoácidos absorvidos são utilizados na produção de proteína pelo organismo ruminante (ALVES, 2007).

A degradabilidade ruminal da proteína e de outros nutrientes tem sido um dos mais significantes parâmetros em sistemas de avaliação de alimentos para ruminantes, tendo em vista a necessidade de suprir adequadamente a demanda microbiana por nitrogênio e energia, evitando perdas de N na forma de amônia ou de energia na forma de metano (ALVES, 2007)..

Segundo o NRC (1985), parte da proteína ingerida pelo animal pode chegar ao omaso sem sofrer a ação de microrganismos ruminais, é a chamada proteína não degradável no rúmen (PNDR). Já a fração que sofre catabolismo ruminal, chamada de proteína degradável no rúmen (PDR), tem suas ligações peptídicas quebradas, formando os peptídeos e os aminoácidos. Estes últimos podem ainda sofrer deaminação, liberando amônia ( $\text{NH}_3$ ). Tudo depende do perfil da proteína que compõe o alimento, o tipo de processamento aplicado sobre ele e o tempo de retenção no rúmen (MEDEIROS et al., 2015).

A PDR é a proteína dos alimentos que se encontra disponível para ser usada pelos microrganismos como fonte de nitrogênio, sua degradação acontece por meio de enzimas que são secretadas pelos microrganismos ruminais, são elas, proteases, deaminases e peptidases (MEDEIROS et al., 2015). Já a PNDR é fração da proteína que escapa da fermentação ruminal, sendo digerida e absorvida no abomaso e intestino delgado, as fontes ricas em PNDR mais utilizadas no Brasil são os farelos de soja, grãos de soja, farelo de amendoim, farelo de girassol, resíduos de cervejarias e farelo de grãos destilados (RIBEIRO et al., 2014).

Para que ocorra melhor aproveitamento das fontes proteicas de alta degradabilidade, é necessário o uso em conjunto de fontes energéticas também de alta degradabilidade, com isso, ocorre sincronização de energia e nitrogênio disponível no rúmen, aumentando a eficiência dos

microrganismos em fixar amônia, diminuindo perdas de energia e nitrogênio (NOCEK e RUSSEL, 1988).

A quantidade de N-amoniaco no fluido ruminal necessária para maximizar a síntese de proteína microbiana tem sido bastante pesquisada. O que parece existir de fato é que nível ótimo de nitrogênio amoniaco ruminal varia de acordo com a disponibilidade de carboidratos fermentáveis no rúmen (GABARRA, 2001).

No rúmen as bactérias necessitam de fonte de nitrogênio, energia, minerais, vitaminas e outros nutrientes para crescer. Contudo, nitrogênio e energia são exigidos em quantidades maiores e exercem maior influência no crescimento bacteriano. Quando a proteína é degradada mais rapidamente do que é disponibilizada a fonte de energia, ocorre desacoplamento da fermentação, aumentando a concentração de amônia ruminal, que é absorvida pela parede do rúmen, mas a maior proporção é excretada na urina. Norlan (1975) notificou em seus estudos que mais de 25% da proteína de origem alimentar é perdida na forma de amônia ruminal.

Contrariamente, quando grande quantidade de energia é degradada, ultrapassando a velocidade de degradação da proteína, o crescimento microbiano e a eficiência digestiva decrescem. Isto é caracterizado pela fermentação incompleta, onde os microorganismos, deficientes em nitrogênio, desviam ATP para o acúmulo de carboidrato e não para a síntese de proteína microbiana (NOCEK; RUSSELL, 1988).

Russell e Hespell (1981) e Cameron et al. (1991) observaram que a síntese de proteína microbiana e o crescimento microbiano dependem de quantidades adequadas de energia e nitrogênio, que devem estar disponíveis de forma sincronizada no fluido ruminal.

A produtividade animal pode ser melhorada com aumento na fonte de carboidratos não estruturais (CNE) que aumenta a relação de glicogênese:lipogênese, produção de ácidos graxos voláteis e reduz a concentração da amônia no rúmen, aumentando a eficiência da utilização do nitrogênio e da energia. Assim, suplementos alimentares para ruminantes que contêm altas concentrações de CNE promovem freqüentemente melhora na ingestão e digestão de forragens de baixa qualidade. Efeitos na digestão e no desempenho de ruminantes sugerem que respostas à suplementação com CNE podem ser dependentes de níveis de suplementação de proteína degradável no rúmen.

Desta forma, a técnica de sincronização da degradação ruminal de proteína e amido propõe incrementar a produção de proteína microbiana no rúmen e a eficiência de utilização de energia, pois as bactérias ruminais necessitam destes dois elementos disponíveis simultaneamente. O estudo das melhores combinações entre fontes de carboidratos e proteínas degradáveis no rúmen é de grande relevância em nutrição de ruminantes.

Os carboidratos constituem de 50 a 80% da matéria seca dos volumosos e grãos. Seu valor nutritivo depende de sua composição em açúcares e de suas ligações com compostos fenólicos. A disponibilidade nutricional dos carboidratos depende da capacidade dos animais em quebrar as ligações glicosídicas nos diferentes carboidratos e outras substâncias (VAN SOEST, 1994).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no período de julho a novembro de 2020 na propriedade “Nossa Senhora Abadia”, localizada no município de Douradina no estado de Mato grosso do Sul (clima classificado como Cwa - Mesotérmico Úmido, com precipitação e temperatura média anuais de 1500 mm e 22°C).

### 5.1 *Preparação dos animais e dietas*

Os animais utilizados no experimento são provenientes da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados. Foram utilizadas 8 vacas Jérséis (432,91 kg) alojadas em baias individuais de concretos com piso cimentado com cocho e bebedouro, os animais foram induzidos a lactação através de hormônios conforme protocolo recomendado e quando atingiram o pico de lactação (com  $45 \pm 5$  dias de lactação) foram distribuídas aleatoriamente em duplo quadrado latino 4x4, composto por 14 dias de adaptação e 5 de coleta de dados e amostragem por período, totalizando 76 dias de período experimental. As dietas foram formuladas com base no NRC (2001, tabela 01) de modo a serem isoprotéicas com 16% de PB. As dietas experimentais foram as seguintes: 1- CONTROLE (dieta basal), 2- SGR (silagem de grão reidratado de milho sem adição de protease), 3- SGR-500 (inclusão de 500 g/t de protease na silagem), 4- SGR-1000 (inclusão de 1000 g/t de protease). As dietas foram fracionadas em dois tratos diários 6h e as 14h de modo a garantir sobras diárias de 10% do fornecido garantindo assim o consumo *ad libidum*.

**Tabela 1-** Composição nutricional da dieta controle e da dieta com substituição total do milho moído por silagem de grão de milho reidratado.

Ingredientes (g/kg)	Dietas experimentais <sup>1</sup>			
	CON	SGUR		
		SGR-0	SGR-500	SGR-1000
Silagem de milho	400	400	400	400
Feno de Tifton	100	100	100	100
Milho moído	270	-	-	-

Silagem Grão reidratado de milho	-	270	270	270
Grão de soja cru inteiro	180	180	180	180
Ureia	10	10	10	10
Núcleo Mineral <sup>2</sup>	40	40	40	40
<b>Composição nutricional (g/kg)</b>	<b>CON</b>	<b>SGUR</b>		
Matéria seca	542,28	523,56		
Matéria orgânica	954,68	954,56		
Proteína bruta	162,54	163,41		
Extrato etéreo	43,65	44,12		
Amido	292,56	286,32		
Carboidrato não fibroso	422,68	428,79		
Fibra em detergente neutro	325,81	318,24		
Fibra em detergente ácido	178,22	179,54		
Lignina	24,52	25,95		
Cinzas	45,32	45,44		
Nutrientes digestíveis totais <sup>3</sup>	747,62	750,33		
Energia líquida de lactação (Mcal/kg) <sup>3</sup>	1,71	1,72		

<sup>1</sup>CON (dieta controle); SGUR (dieta com substituição total do milho moído por silagem de grão reidratado de milho reidratado); <sup>2</sup>Núcleo mineral (Ca 110 g/kg; P 42 g/kg; S 18 g/kg; Mg 20 g/kg; Na 123 g/kg; Co 14 mg/kg; Cu 600 mg/kg; Cr 20 mg/kg; Fe 1050 mg/kg; I 28 mg/kg; Mn 2000 mg/kg; Se 18 mg/kg; Zn 2800 mg/kg; biotina 80 mg/kg; vitamina A 240000 UI/kg; vitamina D 100000 UI/kg; vitamina E 100000 UI/kg. <sup>3</sup>Calculado de acordo com NRC, 2001.

Amostras de alimentos e sobras foram coletadas diariamente durante o período de amostragem e reunidas em uma amostra composta para análises químico-bromatológicas subsequentes.

### 5.2 Preparação das silagens

Os grãos de milho usados neste experimento foram colhidos durante a safra 2018/2019 sendo pertencentes à Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados que foram moídos em moinhos de facas (4 mm) hidratados e homogeneizados utilizando betoneira com água, até atingirem teor de matéria seca entre 50 a 55%.

Foram preparados três silos experimentais do tipo trincheira com as seguintes dimensões 2 m de comprimento 1 m de largura, revestidos com lona plástica dupla face. A densidade de estocagem dos silos foi de 2 toneladas de grão reidratados de milho /m<sup>3</sup>. Cada um dos silos corresponde a dose de inclusão de protease descrita anteriormente. A enzima foi adicionada durante o processo de homogeneização.

A compactação foi feita de modo manual por pisoteio e os silos foram vedados com a lona. Os silos permaneceram fechados por 30 dias, e então foi dado início ao fornecimento para os animais.

### 5.3 Consumo e digestibilidade de matéria seca e nutrientes

Diariamente foram realizadas pesagens da quantidade de fornecimento de alimentos, concentrado e das sobras de cada tratamento com a finalidade de estimar o consumo. Para a avaliação do consumo, as sobras da dieta foram pesadas diariamente sendo ajustado o fornecimento para consumo *ad libitum* com sobras das dietas calculadas entre 5 e 15%.

As sobras retiradas e pesadas e ambos, concentrado e volumoso eram pesados, em duas porções, para serem fornecidas aos animais nos dois fornecimentos diários. No fornecimento, o concentrado e o volumoso eram homogeneizados no cocho, e fornecidos na forma de dieta completa. Amostras das sobras de cada animal e ingredientes da dieta fornecida eram coletadas durante todo o período de avaliação de consumo, perfazendo amostra composta dos diferentes dias, que após coletada e eram armazenadas a -20° C.

Para estimativa da digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes, foi realizado coleta total de fezes no 15°, 16° e 17° dia de cada período experimental. As amostras obtidas foram homogeneizadas para compor uma amostra composta de cada animal em cada período. As amostras de fezes coletadas foram pré-secas em estufa com ventilação forçada (55°C/72 horas) e processadas em moinho de facas com peneiras de porosidade 1 mm.

Amostras de dietas, ingredientes concentrados, sobras e fezes foram analisadas para avaliar o consumo e a digestibilidade. As amostras foram analisadas quanto à matéria seca (MS; método 967.03), cinzas (método 942.05), proteína bruta (PB; método 981.10) e extrato etéreo (EE; método 920.39) conforme recomendações da AOAC (1990). O teor de fibra em detergente neutro corrigido para cinza e proteína (usando alfa-amilase termoestável sem sulfito de sódio) (FDN<sub>cp</sub>; Schadt, Mertens, Licitra et al., 2014) e fibra em detergente ácido (FDA) foram determinados como descrito por Van Soest et al. (1994), e a lignina foi determinada tratando o resíduo da fibra em detergente ácido com ácido sulfúrico 72% (Silva e Queiroz, 2002). Os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram estimados utilizando a fórmula proposta pelo NRC (2001). O consumo diário de matéria seca estimado por animal (CMS) da baía foi calculado a partir da diferença entre a quantidade de dieta oferecida diariamente e as sobras coletadas no dia seguinte.

Amostras da dieta total e de sobras de cada tratamento foram coletadas durante o 15°, 16° e 17° dia de cada período, formando uma amostra composta por período. A mistura total da dieta e das sobras foram analisadas para a distribuição de tamanho de partículas usando um separador de partículas com peneiras estratificadoras (Penn State Particle Separator – Nasco, Fort Atkinson, WI, EUA) como descrito por Kononoff et al. (2017). O separador de partículas utilizado apresentava quatro bandejas sobrepostas (P1 a P4) com orifícios: Peneira 1 = retenção de partículas maiores do que 19 mm, Peneira 2 = retenção de partículas entre 19 e 8 mm, Peneira

3 = retenção de partículas entre 8 e 1,18 mm e Peneira 4 (bandeja) = com fundo fechado, a qual retém partículas com diâmetro inferiores a 1,18 mm.

Para análise do teor de amido foi utilizada metodologia descrita por Hendrix (1993), onde aproximadamente 0,1 g de amostra foi pesada em duplicata em tubos de plástico, foram adicionados 2 mL de solução ácida, agitada e levada para estufa de ventilação forçada por 1 hora, em seguida adicionado 2 ml de água destilada, vedado e tratado em autoclave a 110°C durante 60 min. Em seguida adicionado 5 ml de solução tampão, adicionado enzima amilase e levada para estufa de ventilação forçada por 20 horas. Posteriormente a solução resultante foi filtrada em balão de 100 mL, completando o volume com água destilada e agitada. As análises das concentrações foram realizadas por meio de kits comerciais que utilizam método enzimático colorimétrico, sendo a leitura realizada em analisador automático.

#### ***5.4 Fermentação ruminal***

No 19º dia de cada período experimental, 4 horas após alimentação foi coletada líquido ruminal através de sonda esofágica de acordo com Ortolani et al. (1981). Imediatamente após a coleta, o pH foi mensurado através de potenciômetro. A leitura foi feita com potenciômetro digital (MB-10, Marte, Santa Rita do Sapucaí, Brasil). As amostras foram armazenadas em recipientes plásticos a -5°C. A amônia-N foi determinada pelo método colorimétrico de fenol-hipoclorito (Broderick e Kang, 1980).

A análise de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foi determinada e calculado de acordo com Moss et al (2000)., sendo as amostras centrifugadas a 15.000g (4°C), durante 50 minutos, e em seguida, analisadas em cromatógrafo líquido-gasoso (Hewlett Packard 5890 Series II GC, coluna empacotada cabopack, 3m), com temperatura do forno de 120°C, equipado com integrador (Hewlett Packard 3396 Series II Integrator) e injetor automático (Hewlett Packard 6890 Series Injector) à temperatura de 106°C, e detector tipo FID a 190°C. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio, sem rampa de aquecimento. O padrão interno utilizado foi o ácido 2-metilbutírico, sendo acrescentados, em cada tubo para leitura em cromatógrafo, 100µL do padrão interno, 800µL da amostra e 200µL de ácido fórmico. Uma mistura de ácidos graxos voláteis com concentração conhecida foi utilizada como padrão externo para a calibração do integrador (Campos et al., 2004).

### ***5.5 Balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana***

No dia 19º de cada período experimental foi realizada a coleta de urina durante a micção espontânea, às 10h00, ou seja, quatro horas após o fornecimento da refeição às 06h00. Uma alíquota de 10 mL da urina foi diluída em 40 mL de ácido sulfúrico 0,036 N.

Nesse processo, o pH foi ajustado, se necessário, para valores abaixo de 3, com gotículas de concentrado ácido sulfúrico, visando prevenir a destruição bacteriana dos derivados de purina e precipitação do ácido úrico. As amostras foram armazenadas a -18 °C para análises posteriores os derivados da purina alantoína e ácido úrico.

As análises desses derivados foram realizadas conforme a técnica descrita por Chen e Gomes (1992). Purinas microbianas absorvidas (X, mmol dia<sup>-1</sup>) foram calculados a partir da excreção de derivados de purina (Y, mmol dia<sup>-1</sup>), pela seguinte equação:  $Y = 0,84X + (0,150 BW^{0,75} e^{-0,25X})$ , em que 0,84 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados da purina urinária e  $0,150 BW^{0,75} e^{-0,25X}$  é a contribuição endógena à excreção de purinas (VERBIC et al., 1990). O fluxo intestinal dos compostos nitrogenados (Y, g N dia<sup>-1</sup>) foi calculado em função da purinas microbianas absorvidas (X, mmol dia<sup>-1</sup>), usando a seguinte equação:  $Y = (70X) / (0,83 \times 0,116 \times 1000)$ , em que 70 é o teor de N nas purinas (mg N mmol); 0,83 é a digestibilidade da microbiana purinas; e 0,116 é a Purina N: bacteriana N. A produção microbiana foi expressa como g N microbiano (gramas de N microbiano) e P microbiano (gramas de proteína microbiana).

Para o balanço de nitrogênio foi realizado a quantificação do teor de nitrogênio da urina e fezes de acordo com a (AOAC, 2000). O cálculo foi realizado de acordo com a seguintes fórmulas:

$$N_{\text{absorvido}} = N_{\text{consumido}} - (N_{\text{fezes}})$$

$$N_{\text{retido}} = N_{\text{consumido}} - (N_{\text{fezes}} + N_{\text{urina}})$$

### ***5.6 Produção e composição do leite***

As vacas foram ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia, às 6h e às 16h sendo a produção de leite (PL) registrada diariamente durante todo o período experimental e produção média considerada todos os dias do período experimental. A produção de leite foi corrigida para 3,5% de gordura (PLC) segundo fórmula de Sklan et al. (1992), onde  $PLC = (0,432 + 0,163 * G\%) * PL$ .

As amostras utilizadas para análise da composição do leite foram obtidas no 15º, 16º e 17º dias de cada período experimental, na qual cada amostra proveniente das duas ordenha diárias, com amostragens proporcionais. Foram determinados os teores de gordura, proteína e lactose, através de espectrometria de infravermelho pelo equipamento LACTOSCAN®.

Para a análise de ácidos graxos do leite foi realizada a coleta de uma amostra ( $\pm 200$  ml) de leite, sendo uma alíquota da ordenha matutina e uma da ordenha vespertina. Para o processo de extração, as amostras foram centrifugadas a  $17.800 \times g$  por 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$  e próximo a  $19.300 \times g$  por 20 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , de acordo com Feng et al. (2004). A gordura separada (300-400 mg) foi metilada e os ésteres metílicos foram formados de acordo com Kramer et al. (1997). Dois padrões internos C18:0 e C19:0 foram utilizados para corrigir as perdas durante o processo de metilação.

A extração da gordura dos alimentos foi realizada de acordo com o método de Folch et al. (1957) e de metilação realizada de acordo com Kramer et al. (1997). Os lipídeos foram extraídos por homogeneização da amostra com uma solução de clorofórmio e metanol 2:1. Em seguida os lipídeos foram isolados após a adição de solução de NaCl a 1,5%. Os ácidos graxos foram quantificados por cromatografia gasosa (GC Shimatzu 2010, com injeção automática), usando coluna capilar SP-2560 ( $100 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$  de diâmetro com  $0,02 \text{ mm}$  de espessura, Supelco, Bellefonte, PA). A temperatura inicial foi de  $70^\circ\text{C}$  por 4 minutos ( $13^\circ\text{C}/\text{minuto}$ ) até chegar a  $175^\circ\text{C}$ , mantendo por 27 minutos. Depois, um novo aumento de  $4^\circ\text{C}/\text{minuto}$ , foi iniciado até  $215^\circ\text{C}$ , mantendo durante 31 minutos. Hidrogênio ( $\text{H}_2$ ) foi utilizado como gás de arraste com fluxo de  $40 \text{ cm/s}$ . durante o processo de identificação foram utilizados quatro padrões: standard C4-C24 de ácidos graxos (Supelco ® TM 37), ácido vacênico C18:1 trans-11 (V038-1g, Sigma®), C18:2 CLA trans-10, cis-12 (UC-61M 100mg), e C18:2 cis-9, trans-11 (UC-60M 100mg), (NU-CHEK-PREP EUA ®) para identificação dos ácidos graxos que são formados durante a bio-hidrogenação de ácidos graxos insaturados.

### ***5.7 Parâmetros sanguíneos***

As coletas de sangue foram realizadas no 19º dia de cada período experimental por punção da veia e/ou artéria coccígea, anteriormente ao fornecimento das dietas no período da manhã. Imediatamente após coleta as amostras foram refrigeradas e centrifugadas a  $2000 \times g$  durante 15 minutos, para a separação do soro ou plasma. O centrifugado obtido foi transferido para tubetes plásticos, identificados e armazenados a  $-20^\circ\text{C}$ , e transferido para laboratório.

As análises das concentrações dos parâmetros sanguíneos foram realizadas no por meio de kits comerciais (Bioclin®) que utilizam método enzimático colorimétrico, sendo a leitura realizada em analisador automático de bioquímica sanguínea (Sistema de Bioquímica Automático SBA-200 CELM. Foram determinados os teores de glicose, colesterol, albumina e proteína bruta do sangue.

### **5.8 Comportamento ingestivo**

Para a avaliação dos parâmetros comportamentais, no 18º dia de cada período as medidas comportamentais de cada animal foram registradas através da observação e anotação. A cada 10 minutos foram registrados a frequência de animais se alimentando no cocho, em ruminção ou em ócio (Mezalira et al., 2011). O tempo despendido na atividade mastigatória (mastigação hora/dia) foi avaliado como sendo a soma do tempo na atividade da alimentação mais a ruminção.

### **5.9 Análises estatísticas**

Os dados obtidos foram submetidos ao SAS (Version 9.1.3, SAS Institute, Cary, NC 2004), verificando a normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias pelo PROC UNIVARIATE.

Os dados oram serão analisados, pelo PROC MIXED de acordo com a seguinte modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + A_i + P_j + Q_k + P_l + A_m + P_l(A_m) + e_{ijklm}$$

Onde:  $Y_{ijklm}$  = variável dependente,  $\mu$  = media geral,  $A_i$  = efeito de animal ( $i= 1$  a  $8$ ),  $P_j$  = efeito de período ( $j= 1$  a  $4$ ),  $Q_k$  = efeito de quadrado ( $k= 1$  a  $2$ ),  $A_m$  = efeito da silagem ( $A_m = 1$  a  $2$ ),  $P_l$  = efeito de protease ( $l = 1$  a  $2$ ),  $P_l(A_m)$  = efeito de interação e  $e_{ijklm}$  = erro. Os graus de liberdade serão corrigidos por  $DDFM = kr$ . Contraste: silagem de grão reidratado x grão de milho seco moído. Regressão polinomial para a inclusão de protease na silagem de grão de milho reidratado.

Os dados obtidos serão submetidos à análise de variância pelo comando PROC MIXED do SAS, versão 9.0 (SAS, 2009), adotando-se nível de significância de 5%.

## **6. RESULTADOS**

Analisando a fração das dietas no separador de partículas houve efeito significativo ( $P < 0,05$ ) entre grão de milho moído seco e SGR para as peneiras de 19-8 mm ( $P = 0,029$ ) e menos de 1,18 mm ( $P = 0,012$ ), sendo que na peneira de fração 19-8 mm as dietas com SGR apresentaram as maiores porcentagens de resíduo se comparadas com o concentrado padrão, já

na fração de 1,18 mm o concentrado padrão obteve maior porcentagem de alimento retido se comparado com SGR. Não foi observado efeito ( $P > 0,05$ ) da SGR para as outras frações sobre a dieta nas peneiras (Tabela 2).

**Tabela 2-** Separação de partículas da dieta de vacas leiteiras alimentadas com silagem de grão reidratado com ou sem protease

Item	Dieta experimental			EPM	Valor de P			
	CON	Protease g/ton			Cvs SGU	Linear	Quad	
		0	500					1000
<i>Dieta total</i>								
>19 mm	18,19	21,90	20,23	23,63	3,459	0,343	0,761	0,589
19-8 mm	23,88	29,47	31,70	30,08	1,645	0,029	0,518	0,865
8-1,18 mm	18,61	18,07	18,30	17,90	1,197	0,740	0,842	0,842
<1,18 mm	39,31	30,54	29,74	28,37	2,436	0,012	0,807	0,532
<i>Sobras</i>								
>19 mm	12,11	26,34	25,35	23,22	4,171	0,058	0,894	0,683
19-8 mm	23,27	26,83	31,63	33,59	2,353	0,127	0,333	0,355
8-1,18 mm	18,96	15,88	15,88	15,33	1,130	0,070	0,791	0,877
<1,18 mm	45,64	30,93	27,67	27,30	2,507	0,001	0,464	0,600
<i>Índice de seleção</i>								
>19 mm	0,641	1,39	1,62	1,08	0,161	0,024	0,376	0,082
19-8 mm	1,16	1,08	1,10	1,08	0,022	0,159	0,930	0,444
8-1,18 mm	1,11	1,07	1,07	1,07	0,008	0,050	0,929	0,907
<1,18 mm	1,07	1,31	1,83	1,20	0,1946	0,148	0,154	0,215
<i>Comportamento ingestivo (min/dia)</i>								
Alimentando	633,80	606,95	547,83	611,55	24,818	0,125	0,368	0,025
Mastigando	1246,40	1205,63	1177,96	1220,43	16,802	0,254	0,452	0,325
Ruminando	612,60	598,69	630,13	608,89	20,043	0,214	0,188	0,221
Ócio	68,33	85,05	82,53	83,04	4,745	0,025	0,214	0,558
Bebendo	125,27	149,32	179,51	136,53	16,015	0,214	0,444	0,847

<sup>1</sup>CON (dieta controle sem adição de silagem de grão úmido de milho reidratado); 0, 500, 1000 g/ton de inclusão de CINBENZA DP100® extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g em silagem de grão úmido de milho reidratado. <sup>2</sup>EPM (erro padrão da média). <sup>3</sup> COM vs SGU (dieta controle vs dieta com silagem de grão úmido de milho reidratado) Efeitos lineares e quadráticos

Para as sobras no pen state observou-se efeito ( $P = 0,001$ ) da SGR sobre o concentrado padrão para a fração menos de 1,18 mm, onde o concentrado padrão apresentou maior porcentagem de alimento retido se comparado com SGR.

Não foi possível observar efeito ( $P > 0,05$ ) da dose de enzima proteolítica nas frações nas peneiras tanto para dieta como sobras. Não houve influência ( $P > 0,05$ ) das dietas experimentais sobre o índice de seleção.

No comportamento ingestivo (min/dia), não foi observado influência ( $P > 0,05$ ) das dietas experimentais para os animais se alimentando, embora foi observado efeito quadrático

para as doses da enzima proteolíticas sendo que os animais consumindo as doses 500 g/ton passaram menos tempo se alimento se comparado com as doses de 0 e de 1000 g/ton.

Houve diferença significativa para silagem de grão reidratado e concentrado padrão, sendo que os animais que consumiram SGR ficaram mais tempo em ócio ( $P=0.025$ ) do que os animais consumindo apenas concentrado padrão. Não houve diferença ( $P >0,05$ ) quanto ao comportamento mastigando, ruminando e bebendo água para os animais e as dietas experimentais.

Não houve efeito ( $P >0,05$ ) da silagem de grão reidratado (concentrado padrão \* SGR), e nem de doses da enzima (0, 500, 1000 g/ton) sobre o consumo de nutrientes (kg/dia) de vacas leiteiras (MS=13,54; PB=2,31), exceto para fibra em detergente neutro ( $P=0,035$ ), sendo que os animais que consumiram a SGR apresentaram maior consumo de FND. Observou que houve efeito quadrático ( $P <0,05$ ) em função da dose de protease na silagem de grão reidratado, constatando que para a SGR-500 houve maior conteúdo de FDN em relação as demais doses (Tabela 3).

**Tabela 3-** Consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes de vacas leiteiras alimentadas com silagem de grão reidratado com ou sem protease.

Item	Dietas experimentais				EPM	Valor de P		
	CON	Protease g/ton				ConvS SGR	Linear	Quad
		0	500	1000				
<i>Consumo (kg/dia)</i>								
Matéria seca	13,36	13,27	13,92	13,62	0,416	0,529	0,458	0,568
Matéria orgânica	12,09	12,24	12,82	12,38	0,394	0,305	0,411	0,584
Proteína bruta	2,31	2,01	2,47	2,44	0,120	0,993	0,398	0,587
FDN	6,83	7,83	9,26	7,69	0,421	0,035	0,451	0,015
Amido	3,91	3,75	3,94	3,85	0,117	0,256	0,441	0,567
<i>Consumo (%PV)</i>								
Matéria seca	3,28	3,01	3,21	3,20	0,104	0,313	0,125	0,555
FDN	1,62	1,76	2,14	1,80	0,092	0,042	0,185	0,224
<i>Digestibilidade (g/kg)</i>								
Matéria seca	584,43	596,75	649,00	610,01	16,154	0,035	0,232	0,002
Matéria orgânica	629,55	632,51	676,36	651,94	14,322	0,015	0,223	0,023
Proteína bruta	697,10	674,65	747,22	740,80	13,952	0,045	0,311	0,011
FDN	535,24	584,45	661,96	641,07	24,015	0,038	0,222	0,022
Amido	877,81	913,35	934,19	963,56	18,927	0,001	0,325	0,525

<sup>1</sup>CON (dieta controle sem adição de silagem de grão úmido de milho reidratado); 0, 500, 1000 g/ton de inclusão de de CINBENZA DP100® extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g em silagem de grão úmido de milho reidratado. <sup>2</sup>EPM (erro padrão da média). <sup>3</sup> CON vs SGR (dieta controle vs dieta com silagem de grão de milho reidratado).

Quando observado o consumo expresso em %PV no FDN houve maior teor de FDN nas silagens com de grão reidratado se comparado com a dieta controle, não sendo observado influência ( $P>0,05$ ) da SGR e nem das doses de protease na dieta para MS em %PV.

Quanto à digestibilidade, houve diferença significativa ( $P<0,05$ ) entre a dieta controle e a SGR para MS, MO, PB, FDN e amido, onde o uso da silagem de grão reidratada na alimentação de vacas leiteiras aumentou significativamente a digestibilidade dos animais. Houve efeito quadrático ao ponto de máximo para doses de enzima na silagem para MS, MO, PB, FDN, sendo que animais consumindo a SGR-500 apresentou aumento da digestibilidade para todos os aspectos observados exceto para o amido.

Houve diferença significativa ( $P<0,05$ ) entre a dieta controle e a silagem de grão reidratado (SGR) para acetato ( $P= 0.033$ ) e propionato ( $P= 0.002$ ) (Tabela 4), onde as vacas alimentadas com silagem de grão de milho reidratada apresentaram maior produção de acetato e propionato. Houve efeito linear crescente para produção de acetato ( $P= 0.021$ ) e propionato ( $P= 0.002$ ), onde as vacas que consumiram silagem com maiores doses de protease aumentou significativo a produção destes AGVs.

**Tabela 4-** Produção de ácidos graxos voláteis de vacas leiteiras alimentadas com silagem de grão reidratado com ou sem protease.

Item	Dietas experimentais				EPM	Valor de P		
	CON	Protease g/ton				CON vs SGR	Linear	Quad
		0	500	1000				
<i>mmol/L</i>								
Acetato	50,97	51,64	54,79	57,04	2,189	0,033	0,021	0,124
Propionato	13,72	14,23	15,76	16,42	0,999	0,002	0,002	0,354
Butirato	12,36	11,14	14,07	10,87	1,077	0,654	0,235	0,021
Isobutirato	0,717	0,667	0,780	0,770	0,033	0,325	0,306	0,477
Valerato	1,123	0,998	1,058	1,137	0,104	0,235	0,438	0,952
Isovalerato	1,69	1,38	1,27	1,62	0,064	0,278	0,324	0,354
Ác. grax ramificados	2,41	2,05	2,06	2,38	0,125	0,357	0,303	0,547
Totais	81,34	82,11	82,49	90,25	3,922	0,025	0,021	0,547
acetato:propionato	3,76	3,72	3,36	3,81	0,136	0,324	0,338	0,844
Metano <sup>4</sup>	19,45	19,59	17,34	21,46	0,824	0,358	0,332	0,031
pH	6,45	6,47	6,42	6,47	0,008	0,234	0,731	0,858
N-NH <sub>3</sub> (mg/dL)	16,25	17,33	17,91	19,93	0,084	0,032	0,021	0,598

<sup>1</sup>CON (dieta controle sem adição de silagem de grão de milho reidratado); 0, 500, 1000 g/ton de inclusão de CINBENZA DP100® extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g em silagem de grão úmido de milho reidratado. <sup>2</sup>EPM (erro padrão da média). <sup>3</sup> CON vs SGU (dieta controle vs dieta com silagem de grão de milho reidratado) Efeitos lineares e quadráticos. <sup>4</sup>Calculado de acordo com Moss et al (2000).

Já para produção de butirato não houve diferença significativa ( $P= 0.654$ ) para a dieta controle e a silagem de grão reidratada, mas houve efeito quadrático ( $P=0.021$ ) quando se observou as dose de protease incluídas na silagem, as vacas alimentadas com SGR-500 apresentou maior produção de butirato, sendo observado o efeito contrário para produção de metano sendo que vacas consumindo SGR-500 apresentou menor produção de metano ( $P= 0.031$ ).

Não houve influencia ( $P>0,05$ ) na produção de Isobutirato, Valerato, Isovalerato e Ácidos graxos ramificados em vacas leiteiras alimentadas com SGR com e sem protease, o mesmo foi observado quando se avaliou a relação acetato: propionato. No entanto para produção total de ácidos graxos houve efeito do uso de dietas contendo SGR, onde as vacas alimentadas com SGR aumentou a produção total de ácidos graxos ( $P=0.025$ ) além disso houve efeito linear crescente, ou seja, a medida em que se aumentou a dose de protease também a produção total de ácidos graxos ( $P=0.021$ ) foi aumentada.

Houve efeito ( $P=0.032$ ) da substituição do concentrado grão de milho seco por SGR sobre a concentração de amônia ruminal, sendo que vacas que consumiram a dieta contendo a SGR apresentaram maior concentração de amônia ruminal em relação aquelas que consumiram o concentrado padrão, ainda houve efeito linear crescente ( $P=0.021$ ) para as doses de protease na silagem, onde as vacas que consumiram maior dose de protease foram as que apresentaram maior concentração de amônia ruminal. Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) para o pH do líquido ruminal das vacas alimentadas com as diferentes dietas experimentais.

Não houve efeito da substituição de SGR, introdução da enzima ou da interação das diferentes doses de enzima sobre o consumo de nitrogênio, excreção de N na urina e fezes das vacas em lactação. Já no Balanço de nitrogênio (g/dia), houve efeito significativo na substituição de concentrado padrão por SGR ( $P= 0.048$ ) para N-absorvível e N-retido. Ainda quando se observou as doses de enzima em cada SGR os teores de N-absorvível tenderam a aumentar ( $P=0.032$ ). Enquanto o teor de N-retido houve efeito quadrático ( $P=0.011$ ) ao ponto de máximo, onde os maiores teores foram registrados nos animais consumindo SGR-500 (Tabela 4).

Não houve efeito significativo entre consumo de SGR e concentrado em relação aos ácidos graxos presentes no leite, exceto C15:1, onde os animais consumindo SGR apresentaram os maiores teores deste no rúmen. Apenas o trans-10,cis-12 C18:2 apresentou efeito na dose de enzima proteolítica, sendo a dose 500 g/ton a que apresentou maior teor deste ácido graxo (Tabela 5).

Não houve efeito significativo entre consumo de SGR e concentrado em relação aos tipos de ácidos graxos presentes no leite, entretanto, houve interação quadrática entre as doses

de protease para ácidos graxos de 4 a 14 carbonos e ácidos graxos com mais de 16 carbonos, onde na dose de 500 apresentou a menor quantidade de ácidos graxos de 4 a 14 carbonos e maior quantidade de ácidos graxos com mais de 16 carbonos.

Não houve efeito significativo entre consumo de SGR e concentrado em relação aos tipos de ácidos graxos presentes no leite, entretanto, houve interação quadrática entre as doses de protease para ácidos graxos de 4 a 14 carbonos e ácidos graxos com mais de 16 carbonos, onde na dose de 500 apresentou a menor quantidade de ácidos graxos de 4 a 14 carbonos e maior quantidade de ácidos graxos com mais de 16 carbonos.

**Tabela 5-** Composição de ácidos graxos do leite de vacas leiteiras alimentadas com silagem de grão reidratado com ou sem protease.

Item	Dietas experimentais <sup>1</sup>				EPM <sup>2</sup>	Valor de P <sup>3</sup>		
	CON	Protease g/ton				Cvs SGU	Linear	Quad
		0	500	1000				
<i>Ácidos graxos g/100g</i>								
C4:0	1,59	1,58	1,59	1,56	0,004	0,679	0,228	0,371
C6:0	1,66	1,65	1,66	1,65	0,008	0,673	0,889	0,868
C8:0	2,94	2,91	2,95	2,89	0,014	0,417	0,656	0,277
C10:0	6,78	6,94	6,63	6,77	0,061	0,972	0,248	0,099
C12:0	4,22	4,23	4,24	4,19	0,008	0,720	0,311	0,338
C14:0	10,82	11,09	10,87	10,93	0,062	0,239	0,346	0,354
C14:1	0,053	0,054	0,051	0,057	0,001	0,780	0,452	0,155
C15:0	1,45	1,46	1,43	1,47	0,007	0,824	0,708	0,121
C15:1	0,187	0,197	0,194	0,201	0,002	0,030	0,576	0,352
C16:0	27,98	27,45	27,78	27,84	0,138	0,354	0,365	0,721
C16:1	0,961	0,970	0,968	0,983	0,009	0,524	0,566	0,703
C17:0	0,177	0,180	0,179	0,182	0,002	0,619	0,787	0,831
C17:1	0,421	0,432	0,424	0,420	0,005	0,706	0,364	0,883
C18:0	14,23	14,23	14,21	14,09	0,052	0,703	0,352	0,661
<i>cis</i> 11,C18:1	7,13	7,13	7,11	7,15	0,030	0,954	0,779	0,721
<i>cis</i> 9,C18:1	13,36	13,40	13,41	13,53	0,066	0,601	0,535	0,787
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 C18:2	1,62	1,57	1,85	1,59	0,040	0,569	0,855	0,022
<i>trans</i> -9, <i>cis</i> -11 C18:2	0,865	0,901	0,889	0,893	0,009	0,212	0,805	0,775
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 C18:3	1,59	1,61	1,61	1,58	0,011	0,753	0,442	0,843
C20:0	0,870	0,914	0,884	0,910	0,009	0,152	0,891	0,320
C22:0	0,851	0,853	0,847	0,848	0,004	0,899	0,713	0,757
C24:0	0,198	0,193	0,196	0,196	0,003	0,698	0,778	0,823
<b>Sumário</b>								
Σ 4- a 14-C <sup>4</sup>	28,07	28,46	27,98	28,07	0,101	0,613	0,092	0,002
Σ acima de 16-C <sup>5</sup>	70,27	69,86	70,37	70,25	0,102	0,563	0,102	0,023
Σ AGS <sup>6</sup>	73,79	73,71	73,48	73,56	0,103	0,420	0,676	0,611
Σ AGI <sup>7</sup>	26,21	26,29	26,51	26,43	0,102	0,420	0,676	0,611
Σ AGMI <sup>8</sup>	22,12	22,19	22,17	22,35	0,073	0,520	0,477	0,612
Σ AGPI <sup>9</sup>	4,08	4,09	4,34	4,07	0,052	0,470	0,898	0,110
Σ AGCI <sup>10</sup>	2,24	2,28	2,23	2,28	0,009	0,323	0,992	0,104

Relação sat/insat <sup>11</sup>	2,82	2,80	2,77	2,78	0,014	0,430	0,656	0,651
Relação sat/insat 18-C <sup>12</sup>	0,578	0,577	0,569	0,573	0,003	0,578	0,231	0,554

<sup>1</sup>CON (dieta controle sem adição de silagem de grão úmido de milho reidratado); 0, 500, 1000 g/ton de inclusão de CINBENZA DP100® extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g em silagem de grão úmido de milho reidratado. <sup>2</sup>EPM (erro padrão da média). <sup>3</sup>COM vs SGU (dieta controle vs dieta com silagem de grão úmido de milho reidratado) Efeitos lineares e quadráticos. <sup>4</sup>Ácidos graxos de 4 a 14 carbonos. <sup>5</sup>Ácidos graxos com mais de 16 carbonos. <sup>6</sup>Ácidos graxos saturados. <sup>7</sup>Ácidos graxos insaturados <sup>8</sup>Ácidos graxos monoinsaturados. <sup>9</sup>Ácidos graxos poliinsaturados. <sup>10</sup>Ácidos graxos de cadeia ímpar. <sup>11</sup>Relação ácidos graxos saturados/insaturados total. <sup>12</sup>Relação ácidos graxos saturados/insaturados com 18 carbonos.

Analisando a Síntese microbiana, foi observado efeito significativo para Nitrogênio e Proteína bruta quando o concentrado padrão foi substituído pela SGR na dieta das vacas, onde as vacas consumindo silagem de grão reidratada apresentaram maior Nitrogênio e Proteína bruta. Houve efeito linear crescente, onde aumentou se exponencialmente o teor de N e PB a medida em que se aumentou a quantidade de enzima proteolítica na dieta dos animais.

**Tabela 6-** Compostos químicos de vacas leiteiras alimentadas com silagem de grão reidratado com ou sem protease.

Item	Diets experimentais				EPM	Valor de P		
	CON	Protease g/ton				C vs SGU	Linear	Quad
		0	500	1000				
<i>Consumo (g/dia)</i>								
Nitrogênio	370,66	323,11	396,45	391,80	15,394	0,993	0,457	0,851
<i>Excreção (g/dia)</i>								
N-fezes	112,74	101,41	102,70	98,22	5,820	0,260	0,214	0,554
N-urina	80,58	69,17	58,18	86,57	4,782	0,398	0,255	0,602
<i>Balanço (g/dia)</i>								
N-absorvível	256,12	222,63	292,82	295,38	13,090	0,048	0,032	0,214
N-retido	176,42	153,01	235,08	207,91	15,352	0,032	0,214	0,011
<i>Síntese microbiana (g/dia)</i>								
Nitrogênio	64,02	65,46	76,44	84,46	2,327	0,001	0,001	0,254
Proteína bruta	400,17	409,15	477,79	527,89	14,542	0,001	0,001	0,254
<i>Bioquímica sanguínea (mg/dL)</i>								
Glicose	62,13	61,68	63,41	58,86	2,048	0,254	0,335	0,448
Colesterol total	138,13	120,86	128,07	127,69	4,412	0,158	0,258	0,259
Nitrogênio ureico	18,39	16,43	15,90	15,82	0,445	0,003	0,015	0,556

<sup>1</sup>CON (dieta controle sem adição de silagem de grão de milho reidratado); 0, 500, 1000 g/t de inclusão de CINBENZA DP100® extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g em silagem de

grão úmido de milho reidratado. <sup>2</sup>EPM (erro padrão da média). <sup>3</sup> COM vs SGU (dieta controle vs dieta com silagem de grão úmido de milho reidratado) Efeitos lineares e quadráticos.

Houve contraste (P=0.003) na substituição por SGR sobre o N ureico no sangue. As vacas que consumiram a dieta contendo a SGR apresentaram menor concentração de nitrogênio no sangue em relação as que consumiram apenas concentrado padrão. Houve efeito linear decrescente para o nitrogênio ureico, onde as vacas que foram alimentadas com as maiores doses de protease foram as que apresentaram menor teor de N ureico no sangue. Não houve diferença significativa (P>5) para Glicose e Colesterol total das vacas alimentadas com os diferentes tipos de dietas experimentais.

Houve diferença significativa (P<0,05) entre a dieta controle e a silagem de grão reidratado para PLC (22.43) e EC (22.34), podendo inferir que a substituição do milho seco moído por silagem de milho reidratado aumentou a produção de leite e gordura. Houve significância nos valores lineares de doses de protease na dieta podendo inferir que à medida que aumentou a dose de protease houve incremento dos valores para de produção de leite, produção corrigida e energia corrigida (Tabela 7).

**Tabela 7-** Produção e composição do leite de vacas leiteiras alimentadas com silagem de grão reidratado com ou sem protease.

Item	Dietas experimentais				EPM	Valor de P		
	CON	Protease g/ton				Cvs SGU	Linear	Quad
		0	500	1000				
<i>kg/dia</i>								
Produção de leite	17,93	18,85	19,79	20,89	0,768	0,008	0,021	0,335
PC 3,5%	19,02	19,77	21,77	22,43	0,637	0,002	0,014	0,512
EC (Mcal/dia)	19,89	19,91	21,61	22,34	0,639	0,003	0,002	0,148
Gordura	0,772	0,750	0,824	0,793	0,021	0,244	0,457	0,014
Proteína	0,637	0,648	0,642	0,640	0,033	0,245	0,547	0,577
Lactose	1,04	1,06	1,07	1,05	0,021	0,547	0,871	0,554
<i>Porcentagem</i>								
Gordura	3,97	3,81	4,25	4,07	0,110	0,154	0,527	0,023
Proteína	3,25	3,30	3,29	3,24	0,023	0,247	0,248	0,231
Lactose	5,37	5,41	5,48	5,37	0,054	0,355	0,123	0,541
<i>Eficiência produtiva</i>								
PL/CMS	1,34	1,42	1,41	1,52	0,053	0,003	0,024	0,542
PLC/CMS	1,42	1,49	1,55	1,63	0,047	0,021	0,035	0,248
ECM/CMS	1,48	1,50	1,54	1,64	0,038	0,001	0,011	0,554

<sup>1</sup>CON (dieta controle sem adição de silagem de grão úmido de milho reidratado); 0, 500, 1000 g/ton de inclusão de CINBENZA DP100® extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g em silagem de grão úmido de milho reidratado. <sup>2</sup>EPM (erro padrão da média). <sup>3</sup> COM vs SGU (dieta controle vs dieta com silagem de grão úmido de milho reidratado) Efeitos lineares e quadráticos.

Para o teor de gordura expresso em kg/dia e em porcentagem não houve significância entre a utilização do concentrado e da SGR, porém observou-se efeito quadrático ao ponto de máximo entre os níveis de proteases na dieta, sendo a dose 500 a que apresentou maior teor de gordura no leite. Não houve diferença estatística entre as dietas experimentais para proteína e Lactose expresso nem Kg/dia nem porcentagem.

A silagem de grão reidratado também foi melhor que a dieta controle (Mcal/dia) em todos os parâmetros de eficiência produtiva (PL/CMS, PLC/CMS e EC/CMS), destacando a eficiência produtiva da silagem reidratada, além disso, houve significância para eficiência produtiva (PL/CMS, PLC/CMS e EC/CMS) para os valores lineares de doses de protease, podendo inferir que à medida que aumentou a dose de protease na dieta aumentou-se a eficiência produtiva de produção de leite, produção corrigida 3,5% e energia corrigida sobre o CMS.

## 7. DISCUSSÃO

Para o comportamento ingestivos dos animais, o tempo de alimentação foi menor em função das doses, os animais ficaram menos tempo se alimentando, comportamento semelhante foi observado para o índice de seleção, onde os animais que se alimentaram mais rapidamente obtiveram um índice de seleção maior, pois selecionaram menos e consumiram a dieta mais rapidamente. Sendo tirado o poder de seleção dos animais com isso o tempo diminuiu. Embora o tempo de alimentação dos animais tenha diminuído, a capacidade digestiva dos animais não foi afetada, uma vez que as diferenças de apresentação do milho não ocasionaram interferência no consumo dos animais, onde pode ter ocorrido maior taxa de bocado, e os animais conseguiram consumir de acordo com as exigências previstas pelo NRC 2007.

O menor tempo de alimentação foi observado nos animais que receberam grão reidratado com protease, o que pode ser explicado pelo maior consumo de FDN que foi maior nas dietas com protease, bem como a maior digestibilidade gerando maior disponibilidade de nutrientes para fermentação e assim com maior saciedade, e esses animais também tiveram maior tempo de ócio em comparação ao grão moído, o que pode ter sido provocado pela menor necessidade de despendimento de tempo para consumir alimentos, uma vez que suas necessidades foram supridas. Oba e Allen (2003b) observaram que vacas consumindo milho maduro moído tiveram maior consumo por refeição comparativamente às alimentadas com milho ensilado.

Dietas ricas em amido tendem a elevar a flora aminolítica e diminuir o pH, pois seu perfil fermentativo apresenta quantidades elevadas de ácido propiônico e lactato, porém neste trabalho, não foi observada diferença no pH explicada pela maior participação de volumosos na dieta que correspondeu a 50%. As partículas ficaram retidas na primeira e na segunda peneira

sendo a grande parte da dieta dos animais, com isso houve maior estímulo a ruminação, que gerou maior estímulo a mastigação e, conseqüentemente, aumento na secreção de saliva, elevando a capacidade de tamponamento do líquido ruminal, fatores que combinados não afetaram o tempo de mastigação e o pH ruminal. A saliva utilizada para explicar o pH, é um importante agente tamponante, pois possui abundante quantidade de bicarbonato de sódio e apresenta pH em torno de 8,1. Entretanto, a produção de saliva é influenciada pela quantidade de fibras fornecidas na dieta, assim como pelo teor de umidade da mesma (Reis; Silva, 2011).

O consumo de MS pelos animais neste trabalho não foi afetado pelo processo de reidratação de grão de milho e ensilagem e nem pela adição da protease na ração, apresentando consumo médio de 13,54 kg/dia, uma vez que o consumo de MS é influenciado por muitos fatores, como exemplo níveis nutricionais e os relacionados aos aspectos comportamentais dos animais e suas relações com ambiente e os alimentos, ou ainda pode ser regulado por fatores físicos, como capacidade de distensão do rúmen. Bráulio et al. (2019) e Gervásio (2021) também não constataram diferença no consumo de MS na substituição de grão de milho moído por grão reidratado ensilado. A ausência de CMS mostra que houve um bom processo fermentativo da silagem de milho reidratado, pois segundo Jobim quando a fermentação indesejada pode favorecer crescimento de bactérias do gênero clostridium, quando não há a redução do pH e através da competição com as bactérias ácido láctico pelos carboidratos solúveis, convertem açúcares e ácidos orgânicos em ácido butírico, ocasionando em odor desagradável, redução da palatabilidade, baixa aceitação pelos animais e inibição do consumo pelos animais (Jobim et al., 2008).

A maior digestibilidade da MS na silagem de grão de milho reidratado evidencia que o processo de reidratação rompe as ligações glicosídicas do amido e que assim pode permitir maior acesso microbiano e partículas que por ventura escapem da degradação ruminal, podem ser mais facilmente digerida pelas enzimas intestinais.. Loubbe et al. (2009), relataram maior digestibilidade da MO para o grão de milho reidratado quando comparado com o milho laminado (80 vs 76,9%). O mesmo observado para PB quando utilizou SGR nas rações, aumentou-se o coeficiente de digestibilidade da PB, estando em conformidade com Bhattacharya & Harb (1973), que reportaram a alta digestibilidade da PB presente na SGR, o que pode ter favorecido esse ocorrido foi o aumento da disponibilidade de energia para os microorganismos do rumem devido ao aumento da digestibilidade de amido observada neste trabalho para SGR (913.35, 934.19 e 963.56 g/kg) gerando eficiência microbiana, permitindo aumento na disponibilidade de proteína microbiana para ser absorvida no intestino (Alves, 2010).

A digestibilidade da FDN apresentou comportamento quadrático com a inclusão da

enzima proteolítica na silagem, sendo que a 500 g/ton resultou no maior valor de digestibilidade da fibra quando comparada aos níveis de 0 e 1000 de protease, a maior digestibilidade da fibra na SGR-500, está relacionado com a geração de ácidos orgânicos durante a produção da silagem, assim o que pode ocorrer é que ocorra a solubilização da proteína ligada a fibra e torna essa FDN mais prontamente disponível aos microrganismos celulolíticos. Dietas com altos teores de proteína favorecem microrganismos proteolíticos, enquanto as altas em amido, que são baixas em fibra, estão associadas a uma grande população de utilizadores de amido e, as dietas com alta fibra favorecem as celulolíticas (Van Soest, 1994).

Neste trabalho houve aumento das concentrações de propionato para silagens reidratadas com adição de protease, o qual está relacionada ao fato da maior digestibilidade da FDN e pelo fato de o processo de ensilagem poder quebrar ligações glicosídicas do amido e da celulose.

Quanto maior a relação acetato:propionato maior a produção de metano, pois o acetato juntamente com o butirato levam a maior liberação de H<sub>2</sub> no rúmen, pois quando temos presença de carboidratos de alta fermentação, os microorganismos mudam a rota metabólica de geração de propionato e o mesmo vai para a rota de lactato, sendo que para cada mol de lactato é gerado duas vezes mais hidrogênio, conseqüentemente a produção de H<sub>2</sub> eleva o aporte de metano produzido.

A maior fermentabilidade ruminal do amido na dieta das vacas leiteiras contendo SGR e maiores doses de protease, pode ter aumentado o fluxo de AGV do rúmen para o sangue e a proporção de propionato dentre os AGV absorvidos. O propionato em excesso à capacidade gliconeogênica do fígado seria oxidado, gerando ATP capaz de induzir saciedade por estímulo cerebral mediado pelo vago (VARGAS, 2014). O aumento na produção de propionato é resposta típica em vacas alimentadas com dietas com maior concentração de carboidratos fermentáveis (FIRKINS et al., 2001).

Os resultados advindos da maior digestibilidade nutricional das vacas alimentadas com dietas contendo silagem de milho apresentaram o aumento da disponibilidade de energia para os microrganismos do rumem devido ao aumento da digestibilidade de amido observada neste trabalho. O processo de ensilagem foi capaz de melhorar a digestibilidade do amido por romper as ligações glicosídicas do amido durante o processo fermentativo.

A produção de propionato ocasiona maior eficiência energética, tanto devido ao maior aporte de substâncias gliconeogênicas (ácido propiônico), como pela diminuição na perda de energia devido à menor produção de metano, verificado nesse trabalho (Manella et al. 2003),

além disso os microrganismos celulolíticos (algumas espécies de bactérias e protozoários) e bactérias metanogênicas têm baixa tolerância a mudanças de ambiente.

Observou-se que a produção de metano e nitrogênio amoniacal também aumentaram com a inclusão da protease na silagem de grão úmido. Na dose 500 de protease o metano foi menor que os demais tratamentos, sendo contrário a digestibilidade de MS, PB e FDN, para este tratamento também observou-se menor proporção acetato:propionato. Mostrando que a protease tem o benefício de otimizar o metabolismo energético da dieta e com isso reduzir o metano.

O aumento da produção de nitrogênio amoniacal pode estar relacionada à maior quebra da fração proteica no rumen pelos microrganismos no ambiente ruminal. De acordo Kurihara et al. (1999), a maior emissão de metano ocorre em alimento com menor energia, logo, a ação da protease sobre a disponibilidade da energia favorece a redução da produção de metano.

Houve diferença no nitrogênio ureico plasmático diferindo entre tratamento com e sem SGR. A medida que se aumentou protease na dieta das vacas lactantes houve tendência de queda no NUP nas vacas alimentadas com SGR, os dados explicam que a dieta com maior dose de protease foi a mais efetiva permitindo um aumento na proteína microbiana impedindo assim que a amônia fosse para o sangue e transformasse em ureia no fígado.

O nitrogênio amoniacal aumentou com o uso de silagem reidratada pois houve maior digestibilidade de proteína também neste tratamento, sendo a proteína liberada ou seja mais nitrogênio no ambiente ruminal. O aumento da produção de nitrogênio amoniacal com o aumento das doses de protease (19,93 mg/dL) esta relacionada ao aumento da ingestão de matéria seca (649,00 g/kg) e degradação da fração proteica da dieta no rumen pelos microrganismos no ambiente ruminal. pois libera a proteína presa dentro da matriz do amido.

Os dados médios encontrados para N-NH<sub>3</sub> ruminal (19,93 mg/dL) encontram-se acima dos 5 mg/dL recomendados por Satter & Roffler (1979) como o mínimo necessário para que haja fermentação ruminal e abaixo daqueles encontrados por Mehrez & Orskov (1976), que recomendam 23 mg/dL para que os microrganismos potencializem a fermentação microbiana. A menor produção de amônia no rumen dos animais alimentados com grão de milho seco pode estar associada a menor hidrólise da proteína do grão maduro, causada pelo efeito hidrofóbico das prolaminas, corroborando para menor fermentação e conseqüentemente menor produção de amônia no rumen (Fregadolli et al., 2001).

A maior quantidade de Nitrogênio retido foi devido a maior síntese microbiana, gerando mais nitrogênio e mais proteína, conseqüentemente mais nitrogênio amoniacal, o que elevou a aumentou nitrogênio retido. O nitrogênio microbiano é de alto valor biológico, sendo um

aminoácido puro e que rapidamente é absorvido pelo intestino, cai na corrente sanguínea, e é excretado na urina e nas fezes.

A disponibilidade de carboidratos rapidamente fermentáveis, na presença de quantidades inadequadas de N, pode ter levado à competição entre as bactérias celulolíticas e as fermentadoras de carboidratos não fibrosos, inibindo as primeiras.

Os resultados da utilização de energia e nitrogênio pelas vacas estão relacionados com a ingestão de nutrientes e a digestibilidade. Os animais alimentados com dietas contendo SGR tiveram maior consumo e digestibilidade de MS e, conseqüentemente, apresentaram maior consumo de energia e equilíbrio de energia e proteína no rúmen, aumentando a síntese microbiana. Este efeito está relacionado com o aporte proteico e energético da dieta, onde os principais fatores que limitam o crescimento microbiano são a disponibilidade de nitrogênio e de energia no rúmen (Clark et al., 1992). Assim, o aporte de energia associado ao aporte proteico aumentou a eficiência de utilização dos compostos nitrogenados, reduzindo a excreção de nitrogênio.

O aumento da produção de leite nos tratamentos propostos pode ser explicado pela maior digestibilidade dos nutrientes e concentração de energia da dieta com o uso de protease nas silagens de grão reidratado. A energia é o principal limitante a produção de leite e a suplementação estratégica é necessária para obter-se níveis maiores de produção. A energia advinda da fermentação dos carboidratos não fibrosos gera maior produção de propionato sendo um dos principais substratos para a gliconeogênese hepática, resultando em aumento das concentrações plasmáticas de glicose, importante fator envolvido na produção de leite (Oba; Allen, 2003).

A maior produção de gordura e gordura em porcentagem encontrada neste trabalho para silagem de grão reidratado com 500 g/ton de protease, pode ser explicado pela dose onde a disponibilidade e carboidratos da dieta manteve o ambiente ruminal favorável a degradação da fração fibrosa da dieta sem comprometer a produção de gordura. Os dados apresentados sugerem que a fibra fisicamente efetiva contida na dieta foi suficiente para estimular a mastigação e manter o teor de gordura do leite, juntamente com a produção de acetado que é utilizado pelos tecidos musculares, mamário e adiposo como fonte de energia e precursor de gordura corporal e do leite.

A eficiência produtiva da PL/CMS, PLC/CMS e EC/CMS, aumentou linearmente com a inclusão da protease na silagem de grão reidratado em comparação ao milho moído e a silagem sem protease. O aumento da eficiência da produção de leite pelos animais quando utilizado a reidratação no milho, pode ser atribuído ao aumento do aproveitamento do amido convertendo em maior aporte de nutrientes e assim produção de leite. Já o aumento da eficiência da produção

de leite quando os animais consumiram dietas com maiores doses de protease pode ser em função do aumento da Energia Líquida corrigida.

## 8. CONCLUSÃO

Diante aos resultados apresentados conclui-se que:

O uso da técnica de reidratação e ensilagem do milho resulta em melhores características nutricionais na dieta o que melhora a eficiência produtiva do sistema.

O uso de protease associado a reidratação do milho e ensilagem trás consigo melhoras na fermentação ruminal e digestibilidade dos nutrientes até 500 g/tom.

## 9. REFERÊNCIAS

ALCALDE, C.R., GUIN, A., ANDRADE, P. et al. Efeito da granulometria do milho no desempenho de bovinos em confinamento. In: Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia, 31, 1994, Maringá. Anais... Maringá: **SBZ**, 1994. p.451

ALVES, Teresa Cristina. Efeitos de diferentes níveis de milho em grãos moídos (relação proteína: carboidratos não estruturais) em dietas para búfalos sobre o metabolismo no rúmen. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ANDRADE, L. P. DE. **Silagem de grão de milho reidratado com soro de leite e água**. 2013. 51 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade José do Rosário Vellano, 2013.

ARAÚJO, R. I., FREIRE, C., CRUZ, S., PETERS, L. P., FERREIRA, J. Identificação de isolados de fusarium encontrados em grãos de milho durante o armazenamento em silos no estado do acre. **Enciclopédia biosfera**, 18(38). 2021.

ÁVILA, N. R. B.; SILVA, N. C. D.; LEITE, R. F.; FLORENTINO, L. A.; REZENDE, A. V. Utilização de silagem do grão de milho reidratado e de resíduo de tilápia na alimentação animal. **Revista Ciência Animal**. v. 28 n.1, p. 145-161, 2018.

BARROS, K. D. C. **Qualidade de grãos de milho em mato grosso**. Dissertação de mestrado - Universidade Federal do Mato Grasso. 2015.

BATISTA, J. D. D. O. **Enzimas amilolíticas na ensilagem de milho reidratado armazenada por diferentes períodos**. Dissertação de mestrado - Universidade Federal da Grande Dourados, 2019.

BENTON, J. R., KLOPFENSTEIN, T. ERICKSON, G.E. Effects of corn moisture and length of ensiling on dry matter digestibility and rumen degradable protein. **Nebraska Beef Cattle Reports**, n. January, p. 31–33, 2005.

BBC RESEARCH, 2019. **Global markets for enzymes in industrial applications**. Disponível em: <http://bbcresearch.com/>. Acesso em: 03 dezembro de 2021.

BITENCOURT, L. L. **Substituição de milho moído por milho reidratado e ensilado ou melaço de soja em vacas leiteiras**. Tese de doutorado - Universidade Federal de Lavras, 2012.

BRÁULIO, R. C.; MOTA, D. A.; OLIVEIRA, A. R; PEREIRA, A. A.; ARAÚJO, S. A. C.; MELO, T. V.; PASSETTI, L. C. G.; NOGUEIRA, M. A. R. Comportamento ingestivo de bovinos holandeses x zebu alimentados com diferentes formas físicas do milho e uréia. *Caderno de Ciências Agrárias*, v. 11, p. 1-8, 2019.

BURIOL, L. Grain size profile and starch digestibility of corn silage submitted to different processing. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.4, p. 39680-39710 apr 2021.

CARDOSO, R. S. **Alternativas tecnológicas de milho ensilado para bovinos**. Trabalho de conclusão de curso - Universidade Federal de Roraima. 2018.

CHAPMAN, J., A. E. ISMAIL & C. Z. DINU, 2018. Industrial applications of enzymes: recent advances, techniques, and outlooks. **Catalysts** 8(6): 238. DOI: <https://doi.org/10.3390/catal8060238>.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. 2022.

COSTA, B. F. D. **Avaliação das características estruturais e do valor nutricional do grão de milho reconstituído**. Trabalho de conclusão de curso - Universidade de Brasília. 2013.

DE CASTRO MOURÃO, R.; PANCOTI, C. G.; MOURA, A. M.; FERREIRA, A. L.; BORGES, A. L. D. C. C.; REIS, R. Processamento do milho na alimentação de ruminantes. **Pubvet**, v. 6, n 1, p. 1289-1294, 2012.

DEFOOR, P. J.; BROWN, M. S.; e OWENS, F. N. Reconstitution of grain sorghum for ruminants. In: **Oklahoma cattle grain processing symposium**. Oklahoma: OSBE. 2006. ENCYCLOPEDIA BRITANNICA, 2006. Disponível em: [www.britannica.com](http://www.britannica.com).

FÉLIX, C. R., E. F. NORONHA & L. MARCO, 2004. Proteases: características e aplicações industriais. In: L. SUMMA (Ed.): Enzimas como agentes biotecnológicos. 327-347. **Editora Legis Summa**, São Paulo.

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**, Volume 98, Issue 10, October 2015, Pages 7318-7327. 10.3168/jds.2015-9891

GERVÁSIO, J. R. S.. Reidratação e ensilagem de grãos de milho com diferentes granulometrias e inclusões na dieta para bovinos de corte. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, UNESP, SP, 2021.

GIRI, S. S., S. SUKUMARAN, S. S. SEN, M. OVIYA, N. BANU & P. K. JENA, 2011. Purification and partial characterization of a detergent and oxidizing agent stable alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* VSG-4 of tropical soil. **Journal of Microbiology** 49(3): 455-461.

GOBETTI, S. T. C.; NEUMANN, M.; OLIBONI, R.; OLIVEIRA, M. R. Utilização de silagem de grão úmido na dieta de animais ruminantes. **Revista Ambiente Guarapuava**. v. 9, n. 1, p. 225-239, 2013.

GOMES, P. G. B. **Consumo de nutrientes e comportamento ingestivo de cordeiros alimentados com dietas a base de silagens de grão de milho reidratado**. (2021).

HOLDING, D. R. Recent advances in the study of prolamin storage protein organization and function. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 276, p. 1-9, 2014.

ICPLeite/Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, **Custo de produção não apresentou variação em abril**. 2019.

JOBIM, C. C.; JUNIOR, M. C.; JÚNIOR, V. H. B.; DE OLIVEIRA, F. C. L. Composição química e qualidade de conservação de silagens de grãos de milho (*Zea mays* L.) com diferentes níveis de grãos de soja (*Glycine max* Merrill). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 773-78, 2010.

KUMAR, S., N. S. SHARMA, M. R. SAHARAN & R. SINGH, 2005. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry** 40(5): 1701-1705. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.047>.

KUMAR, R. S., R. RAJESH, S. GOKULAKRISHNAN & J. SUBRAMANIAN, 2015. Screening and characterization of fibrinolytic protease producing *Bacillus circulans* from mangrove sediments Pitchavaram, South East Coast of India. **International Letters of Natural Sciences** 28: 10-16. DOI: <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ILNS.28.10>.

KUNG JR, L.; WINDLE, MC; WALKER, N. O efeito de uma protease exógena na fermentação e valor nutritivo do milho de alta umidade. **Journal of laticínios** , v. 97, n. 3, pág. 1707-1712, 2014.

KURIHARA . M, MAGNER. T, McCRABB. H, McCRABB G. Methane production and energy partition of cattle in the tropics. **British Journal of Nutrition**, 81: 227- 234, 1999.

LANDRY, J.; DELHAYE, S.; DAMERVAL, C. Padrão de distribuição de proteínas no endosperma farináceo e vítreo do grão de milho. *Química de cereais* , v. 81, n. 2, pág. 153-158, 2004.

MAGALHÃES, A. A. S., T. A. SILVA, M. F. S. TEIXEIRA, R. F. CRUZ FILHO, S. D. SILVA, D. M. D. GOMES & J. O. PEREIRA, 2019. Produção e caracterização de enzimas proteolíticas de *Lentinus crinitus* (L.) F. 1825 DPUA 1693 do bioma amazônico (Polyporaceae). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais* 14(3): 453-461

MAIA, P. H. L., DA COSTA, H. N., SOUSA, B. M., SANDES, M. D. F., COSTA, R. Â. D., VIEIRA, V. V., BORGES, J. V. O. Comparação bromatológica de matéria seca entre silagem de milho grão reidratado com água e silagem de milho grão reidratado com subprodutos industriais: polpa cítrica úmida e cevada úmida. **Revista Sinapse Múltipla**. v. 6, n. 2, p. 345-348, 2017.

MCDONALD, P., et al. Harlow, United Kingdom: Pearson Education. **Animal Nutrition** Limited, 2010. 712p.

MEDEIROS, S. R. de; GOMES, R. da C.; BUNGENSTAB, D. J. (Ed.). Nutrição de bovinos de corte: fundamentos e aplicações. Brasília, DF: Embrapa, 2015. p 18, 2015.

MENEZES, B. B. De; MORAIS, M. G.; BATISTA, R. D. S.; MACIEL, D.; JOSIAS, R.; BRIXNER, B. M.; DELGADO, I. O.; GODOY, C. De. Características Estruturais Do Grão De Milho Sobre a Digestibilidade Do Amido Em Bovinos. In: ANAIS DA X MOSTRA CIENTÍFICA FAMEZ / UFMS, CAMPO GRANDE, 2017 2017, **Anais...** [s.l: s.n.]

MIRANDA, GUILHERME ARAGAO **Enzimas fibrolíticas em dietas de novilhas leiteiras / Guilherme Aragao Miranda** - Dourados: Universidade federal da grande Dourados- UFGD, 2017.

MORAIS, G. D. **A fermentação de grãos de milho reidratados influenciada pela aplicação de aditivos: aspectos da conservação e do valor nutritivo para vacas leiteiras**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MOURÃO, R. de C.; PANCOTI, C. G.; MOURA, A. M.; FERREIRA, A. L.; BORGES, A. L. da C. C.; REIS E SILVA, R. Processamento do milho na alimentação de ruminantes. **Pubvet**, [s. l.], v. 6, n. 5, 2017.

NOCEK, J.E. Bovine acidosis: implications on lameness. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.5, p.1005-1028, 1997.

NOCEK, J.E.; RUSSELL, J.B. Protein and energy as an integrated system: Relation of ruminal protein and carbohydrates availability to microbial synthesis and milk production. **Journal of Dairy Science**, v.71, p. 2070-2107, 1988.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Dose response effects of intraruminal infusion of propionate on feeding behavior of lactating cows in early or midlactation. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2922- 2931, 2003

OLIVEIRA, V. D. S.; **Cinética da fermentação ruminal de gramíneas forrageiras irrigadas e não irrigadas**. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Sergipe. 2014.

OLIVEIRA, P. C. S.; ARCANJO, A. H. M.; MOREIRA, L. C.; JAYME, C. G.; NOGUEIRA, M. A. R.; LIMA, F. A. S.; PENA, H. C.; CAMILO, M. G. Qualidade na produção de silagem de milho. **Pubvet**. v. 8, n. 4, p. 0340-0443, 2014.

PARENTE, D. B. **Silagem de milho grão reidratado submetido a níveis crescentes de pepsina aberto em diferentes tempos**. 2021.

PENZ JR., A.M.P O milho e o sorgo na alimentação animal. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 19, 1992, Porto Alegre. Anais... Porto Alegre-RS, 1992. p.264-273

PEREIRA, M. L. R. **Degradabilidade ruminal in vitro de grão reidratado e ensilado de milho e sorgo com diferentes granulometrias**. Dissertação de mestrado-Universidade Federal de Goiás, 2013.

PEREIRA, O.G.; SANTOS, E.M. Microbiologia e o processo de fermentação em silagens. **In: Simpósio Sobre Manejo Estratégico Da Pastagem**. 3., Viçosa: UFV, 2006. Anais... Viçosa: UFV, p. 393-430, 2006.

RAMOS, BLP; PIRES, AJV; CRUZ, NT .; SANTOS, AP da S. dos.; NASCIMENTO, LMG.; SANTOS, HP; AMORIM, JMS. Perdas no processo de silagem: uma breve revisão. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, [S. l.] , v. 10, n. 5, pág. e8910514660, 2021. DOI: 10.33448 / rsd-v10i5.14660. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/14660>. Acesso em: 21 set. 2021.

RANUM, P.; PEÑA-ROSAS, J. P.; e GARCIA-CASAL, M. N. Global maize production, utilization and consumption. **Annals of the New York academy of sciences**, v. 1312, n. 1, p. 105-112, 2014.

RAVEENDRAN, S., B. PARAMESWARAN, S. B. UMMALYMA, A. ABRAHAM, A. K. MATHEW, A. MADHAVAN & A. PANDEY, 2018. Applications of microbial enzymes in food industry. **Food Technology and Biotechnology** 56(1): 16-30. DOI: <http://dx.doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>.

RIBEIRO JÚNIOR, CARLOS STEFENSON. **Quantificação de microrganismos ruminais de novilhos alimentados com cana-de-açúcar ou feno de tifton com diferentes relações volumoso:concentrado** – Jaboticabal, 2014 v, 63 p. ; 29 cm

Ribeiro, P. R.; Macedo, G. de L.; da Silva, S. P. ASPECTOS NUTRICIONAIS DA UTILIZAÇÃO DA PROTEÍNA PELOS RUMINANTES. *Vet. Not*, 2014.

REZENDE, A. V.; RABELO, C. H.; VEIGA, R. M.; ANDRADE, L. P.; HÄRTER, C. J.; RABELO, F. H.; REIS, R. A. Rehydration of corn grain with acid whey improves the silage quality. **Animal Feed Science and Technology**, v. 197, n. 1, p. 213-221, 2014.

ROCHA, M. P., DA SILVA TAVEIRA, J. H., PRADO, S. M. A., & ATAÍDE, M. V. Sistema de armazenamento e incidência dos principais fungos produtores de micotoxinas em grãos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 50176-50193, 2020.

SANTOS, S. C. **Características nutricionais e físicas do milho com diferentes texturas e tempos de armazenamento**. Tese Doutorado- Universidade Federal de Goiás, 2015.

SANTOS, J. P. Armazenagem de milho a granel na fazenda. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 6 p. ISSN 1518-4269, 2004

SILVA, B. D. C.; PACHECO, M. V. C.; GODOI, L. A.; ALHADAS, H. M.; PEREIRA, J. M. V.; RENNO, L. N.; VALADARES FILHO, S. D. C. Reconstituted and ensiled corn or sorghum grain: Impacts on dietary nitrogen fractions, intake, and digestion sites in young Nellore bulls. **Plos one**, v. 15, n. 8, p. e0237381, 2020

SILVA, M. R. H.; JOBIM, C. C.; NEUMANN, M.; OSMARI, M. P. Corn grain processing improves chemical composition and fermentative profile of rehydrated silage. **Revista Acta Scientiarum**. v. 40, n. 1, p. e42564-e42564, 2018.

SILVA, A. O; GOMES, J. A., DE OLIVEIRA, R. C., SILVA, D. A. S., VIÉGAS, I. D. J. M. Armazenamento de grãos na agricultura familiar: principais problemáticas e formas de armazenamento na região nordeste paraense. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e36610111835-e36610111835, 2021.

SOUZA, J.C., LIMA, M.L.P., MATTOS, J.C.A. et al. Desempenho de bovinos da raça caracú em prava de ganho de peso. In: Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia, 32, 1995, Brasília. Anais... Brasília: SBZ, 1995. p.238-239.

TSE, M. L. P.; BERTO, D. A.; WECHSLER, F. S.; TRINDADE NETO, M. A. Valor nutricional da silagem de grãos úmidos de milho com diferentes graus de moagem para leitões na fase de creche. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria Zootecnia**. v. 58, n. 6, p. 1214-1221, 2006.

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

WINDLE, MC; WALKER, N.; KUNG JR, L. Efeitos de uma protease exógena sobre a fermentação e valor nutritivo da silagem de milho colhida em diferentes teores de matéria seca e ensilada por vários períodos de tempo. **Journal of Dairy Science** , v. 97, n. 5, pág. 3053-3060, 2014.

ZAGONEL, Tiago Reginaldo; DA SILVA, Leonardo Xavier. A LEI E METODOLOGIAS DE CONTRATOS PARA O SETOR LÁCTEO. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 20, n. 2, 2021

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

## **Capítulo I**

**Artigo redigido de acordo com as normas da revista**

**Animal Feed Science and Technology**

# **SILAGEM DE GRÃO DE MILHO REIDRATADO ADITIVADA COM PROTEASE NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS**

32 **Silagem de grão de milho reidratado aditivada com protease na alimentação de vacas**  
33 **leiteiras**

34 Silagem de milho reidratado melhora os parâmetros de eficiência leiteiras.

35 Protease à silagem de milho reidratada melhora o desempenho e produção de leite.

36 A reidratação com dose até 1000 gramas de protease melhorou os parametros produtivos.

37

38 **Resumo:** Objetivou-se com este trabalho avaliar a adição de protease em silagem de grão de  
39 milho reidratado, fornecido como base alimentar para vacas leiteiras observando seus efeitos  
40 sobre o consumo e digestibilidade de nutrientes e metabolismo ruminal. Foram utilizadas oito  
41 vacas da raça Jersey (432,91 Kg) com  $45 \pm 5$  dias de lactação, seguindo um duplo quadrado  
42 latino 4x4. As dietas experimentais foram: 1- CONTROLE (Dieta Basal), 2- SGR-0 (silagem  
43 de grão reidratado de milho sem adição de protease), 3- SGR-500 (inclusão de 500 g/t de  
44 protease na silagem), 4- SGR-1000 (inclusão de 1000 g/t de protease). A duração de cada  
45 período foi de 14 dias de adaptação e 5 de coleta de dados, avaliando o consumo e a  
46 digestibilidade de matéria seca e nutrientes, a fermentação ruminal, o balanço de nitrogênio,  
47 síntese de proteína microbiana e produção de leite. A utilização da silagem melhorou ( $P < 0,05$ )  
48 a digestibilidade, além disso quando incluiu enzima protease nas silagens houve aumento da  
49 digestibilidade de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB) e fibra de  
50 detergente neutro (FDN). Houve efeito dos tratamentos sobre os parâmetros ruminais produção  
51 de AGV's, metano, nitrogenio amoniacal, resultantes principalmente pelo aumento da digestão  
52 de amido e no teor de NDT das dietas. A silagem de grão reidratado foi melhor que a dieta  
53 controle (Mcal/dia) em todos os parâmetros de eficiência produtiva e aumentou linearmente de  
54 acordo com as doses de protease. Conclui-se que o uso de silagem de grão de milho reidratados  
55 e/ou com enzima protease na alimentação de vacas leiteiras melhora digestibilidade e  
56 produtividade dos nutrientes e metabolismo sem modificar a composição química.

57 **Palavras-chave:** Aditivo enzimático; Digestibilidade; Ensilagem; Metabolismo.

## 58 **1. Introdução**

59 Grãos de cereais, ricos em amido como o milho são o principal concentrado energético  
60 utilizado para a alimentação de vacas leiteiras, entretanto a indústria nacional faz uso de um  
61 híbrido duro de forte matriz proteica que recobre os grânulos de amido, limitando o ataque  
62 microbiano no rúmen podendo diminuir também a ação enzimática no intestino delgado  
63 (Menezes et al., 2017). Diante disso denota-se o uso de se ensilar grãos úmidos de milho como  
64 uma alternativa para melhorar o armazenamento de grãos na propriedade rural, elevar a  
65 digestibilidade em relação ao milho seco, podendo favorecer as características fermentativas.

66 Já a hidratação e ensilagem dos grãos de milho em estágio maduro é uma opção à  
67 ensilagem de grão úmido, pois permite a compra estratégica em momentos de baixa nos preços  
68 do milho (Menezes et al., 2017), bem como minimizar as perdas quantitativas e qualitativas em  
69 função do ataque de insetos e roedores (Rocha,2020), além de possuir baixo custo de estocagem  
70 (Biaggioni et al., 2009), ainda a ensilagem de grãos reidratados aparece como uma ferramenta  
71 importante para o aumento do valor nutritivo do milho (Morais, 2016).

72 O uso de protease na reidratação e ensilagem de grãos de milho maduros surge com o  
73 intuito de otimizar a digestibilidade da dieta com a degradação das prolaminas por enzimas  
74 microbianas e vegetais, pois teor de prolamina na semente aumenta com a maturidade da planta  
75 e é maior em híbridos com endosperma de alta vitreosidade (Holding, 2014).

76 A literatura tem reportado efeitos positivos do uso as silagens de grão reidratado na  
77 digestibilidade de MS, FDN, PB (Reis; Silva 2011) e na produção de leite (Mendes 2013).  
78 Efeitos positivos também são encontrados utilizando protease na digestibilidade de MS e FDN  
79 (Windle, Walker e Kung Júnior, 2014).

80 Dentro desta ótica a proposta para este trabalho foi avaliar o uso da silagem de grão de  
81 milho reidratado, bem como a adição protease a silagem de grão de milho reidratado para dieta  
82 de vacas leiteiras observando seus efeitos sobre o consumo e digestibilidade de nutrientes,  
83 síntese de proteína microbiana, balanço de nitrogênio e fermentação ruminal, comportamento  
84 ingestivo, produção e composição do leite.

## 85 2. Material e Métodos

86 O experimento foi conduzido no período de julho a novembro de 2020 na propriedade  
 87 “Nossa Senhora Abadia”, localizada no município de Douradina no estado de Mato grosso do  
 88 Sul. Foram utilizadas 8 vacas Jérséis (432,91 kg) alojadas em baias individuais de concretos  
 89 com piso cimentado com cocho e bebedouro, os animais foram induzidos a lactação através de  
 90 hormônios conforme protocolo recomendado por Freitas et al. (2010) e quando atingiram o pico  
 91 de lactação (com  $45 \pm 5$  dias de lactação) foram distribuídas aleatoriamente em duplo quadrado  
 92 latino 4x4, composto por 14 dias de adaptação e 5 de coleta de dados e amostragem por período,  
 93 totalizando 76 dias de período experimental. As dietas foram formuladas com base no NRC  
 94 (2001, tabela 01) de modo a serem isoprotéicas com 16% de PB. As dietas experimentais foram  
 95 as seguintes: 1- CONTROLE (dieta basal), 2- SGR (silagem de grão reidratado de milho sem  
 96 adição de protease), 3- SGR-500 (inclusão de 500 g/t de protease na silagem), 4- SGR-1000  
 97 (inclusão de 1000 g/t de protease). As dietas foram fracionadas em dois tratos diários 6h e as  
 98 14h de modo a garantir sobras diárias de 10% do fornecido garantindo assim o consumo *ad*  
 99 *libidum*.

100

101 **Tabela 1-** Composição nutricional da dieta controle e da dieta com substituição total do milho  
 102 moído por silagem de grão de milho reidratado.

103

Ingredientes (g/kg)	Dietas experimentais <sup>1</sup>			
	CON	SGUR		
		SGR-0	SGR-500	SGR-1000
Silagem de milho	400	400	400	400
Feno de Tifton	100	100	100	100
Milho moído	270	-	-	-
Silagem Grão reidratado de milho	-	270	270	270
Grão de soja cru inteiro	180	180	180	180
Ureia	10	10	10	10
Núcleo Mineral <sup>2</sup>	40	40	40	40
Composição nutricional (g/kg)	CON	SGUR		
Matéria seca	542,28	523,56		

Matéria orgânica	954,68	954,56
Proteína bruta	162,54	163,41
Extrato etéreo	43,65	44,12
Amido	292,56	286,32
Carboidrato não fibroso	422,68	428,79
Fibra em detergente neutro	325,81	318,24
Fibra em detergente ácido	178,22	179,54
Lignina	24,52	25,95
Cinzas	45,32	45,44
Nutrientes digestíveis totais <sup>3</sup>	747,62	750,33
Energia líquida de lactação (Mcal/kg) <sup>3</sup>	1,71	1,72

104 <sup>1</sup>CON (dieta controle); SGUR (dieta com substituição total do milho moído por silagem de grão reidratado de  
105 milho reidratado); <sup>2</sup>Núcleo mineral (Ca 110 g/kg; P 42 g/kg; S 18 g/kg; Mg 20 g/kg; Na 123 g/kg; Co 14 mg/kg;  
106 Cu 600 mg/kg; Cr 20 mg/kg; Fe 1050 mg/kg; I 28 mg/kg; Mn 2000 mg/kg; Se 18 mg/kg; Zn 2800 mg/kg; biotina  
107 80 mg/kg; vitamina A 240000 UI/kg; vitamina D 100000 UI/kg; vitamina E 100000 UI/kg. <sup>3</sup>Calculado de acordo  
108 com NRC, 2001.

109 Os grãos de milho foram moídos em moinhos de facas (4 mm) hidratados e  
110 homogeneizados utilizando betoneira com água, até teor de matéria seca entre 50 a 55%.

111 A densidade de estocagem dos silos foi de 2 toneladas de grão reidratados de milho /m<sup>3</sup>.  
112 Cada um dos silos corresponde a dose de inclusão de protease descrita anteriormente. A enzima  
113 foi adicionada durante o processo de homogeneização. A compactação foi feita de modo manual  
114 por pisoteio e os silos foram vedados com a lona. Os silos permaneceram fechados por 30 dias,  
115 e então foi dado início ao fornecimento para os animais.

116 Diariamente foram realizadas pesagens da quantidade de fornecimento de alimentos,  
117 concentrado e das sobras de cada tratamento com a finalidade de estimar o consumo. Para a  
118 avaliação do consumo, as sobras da dieta foram pesadas diariamente sendo ajustado o  
119 fornecimento para consumo *ad libitum* com sobras das dietas calculadas entre 5 e 15%,  
120 fornecidos na forma de dieta completa. Amostras das sobras de cada animal e ingredientes da  
121 dieta fornecida eram coletadas durante todo o período de avaliação de consumo, perfazendo

122 amostra composta dos diferentes dias. Amostras de dietas, ingredientes concentrados, sobras e  
123 fezes foram analisadas para avaliar o consumo e a digestibilidade

124 Para estimativa da digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes, foi  
125 realizado coleta total de fezes no 15º, 16º e 17º dia de cada período experimental. As amostras  
126 obtidas foram homogeneizadas para compor uma amostra composta de cada animal em cada  
127 período.

128 As amostras coletadas (fezes, dieta e sobras) foram pré-secas em estufa com ventilação  
129 forçada (55°C/72 horas) e processadas em moinho de facas com peneiras de porosidade 1 mm,  
130 e foram analisadas quanto à matéria seca (MS; método 967.03), cinzas (método 942.05),  
131 proteína bruta (PB; método 981.10) e extrato etéreo (EE; método 920.39) conforme  
132 recomendações da AOAC (1990). O teor de fibra em detergente ácido (FDA) foi determinado  
133 como descrito por Van Soest et al. (1994), e a lignina foi determinada tratando o resíduo da  
134 fibra em detergente ácido com ácido sulfúrico 72% (Silva e Queiroz, 2002). Os nutrientes  
135 digestíveis totais (NDT) foram estimados utilizando a fórmula proposta pelo NRC (2001). O  
136 consumo diário de matéria seca estimado por animal (CMS) da baia foi calculado a partir da  
137 diferença entre a quantidade de dieta oferecida diariamente e as sobras coletadas no dia  
138 seguinte.

139 Amostras da dieta total e de sobras de cada tratamento foram coletadas durante o 15º,  
140 16º e 17º dia de cada período, formando uma amostra composta por período. A mistura total da  
141 dieta e das sobras foram analisadas para a distribuição de tamanho de partículas usando um  
142 separador de partículas com peneiras estratificadoras (Penn State Particle Separator – Nasco,  
143 Fort Atkinson, WI, EUA) como descrito por Kononoff et al. (2017).

144 Para análise do teor de amido foi utilizada metodologia descrita por Hendrix (1993),  
145 onde aproximadamente 0,1 g de amostra foi pesada em duplicata em tubos de plástico, foram  
146 adicionados 2 mL de solução ácida, agitada e levada para estufa de ventilação forçada por 1  
147 hora, em seguida adicionado 2 ml de água destilada, vedado e tratado em autoclave a 110°C  
148 durante 60 min. Em seguida adicionado 5 ml de solução tampão, adicionado enzima amilase e

149 levada para estufa de ventilação forçada por 20 horas. Posteriormente a solução resultante foi  
150 filtrada em balão de 100 mL, completando o volume com água destilada e agitada. As análises  
151 das concentrações foram realizadas por meio de kits comerciais que utilizam método enzimático  
152 colorimétrico, sendo a leitura realizada em analisador automático.

153 No 19º dia de cada período experimental, 4 horas após alimentação foi coletada líquido  
154 ruminal através de sonda esofágica de acordo com Ortolani et al. (1981). Imediatamente após  
155 a coleta, o pH foi mensurado através de potenciômetro digital (MB-10, Marte, Santa Rita do  
156 Sapucaí, Brasil). As amostras foram armazenadas em recipientes plásticos a -5°C. A amônia-N  
157 foi determinada pelo método colorimétrico de fenol-hipoclorito (Broderick e Kang, 1980).

158 A análise de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foi determinada e calculado de  
159 acordo com Moss et al (2000)., sendo as amostras centrifugadas a 15.000g (4°C), durante 50  
160 minutos, e em seguida, analisadas em cromatógrafo líquido-gasoso (Hewlett Packard 5890  
161 Series II GC, coluna empacotada cabopack, 3m), com temperatura do forno de 120°C, equipado  
162 com integrador (Hewlett Packard 3396 Series II Integrator) e injetor automático (Hewlett  
163 Packard 6890 Series Injector) à temperatura de 106°C, e detector tipo FID a 190°C. O gás de  
164 arraste utilizado foi o nitrogênio, sem rampa de aquecimento. O padrão interno utilizado foi o  
165 ácido 2-metilbutírico, sendo acrescentados, em cada tubo para leitura em cromatógrafo, 100µL  
166 do padrão interno, 800µL da amostra e 200µL de ácido fórmico. Uma mistura de ácidos graxos  
167 voláteis com concentração conhecida foi utilizada como padrão externo para a calibração do  
168 integrador (Campos et al., 2004).

169 No dia 18º e 19º de cada período experimental foi realizada a coleta de urina durante a  
170 micção espontânea, às 10h00, ou seja, quatro horas após o fornecimento da refeição às 06h00.  
171 Nesse processo, o pH foi ajustado, se necessário, para valores abaixo de 3, com gotículas de  
172 concentrado ácido sulfúrico, visando prevenir a destruição bacteriana dos derivados de purina  
173 e precipitação do ácido úrico. As amostras foram armazenadas a -18 °C para análises  
174 posteriores os derivados da purina alantoína e ácido úrico.

175 As análises desses derivados foram realizadas conforme a técnica descrita por Chen e  
176 Gomes (1992). Purinas microbianas absorvidas ( $X$ , mmol dia<sup>-1</sup>) foram calculados a partir da  
177 excreção de derivados de purina ( $Y$ , mmol dia<sup>-1</sup>), pela seguinte equação:  $Y = 0,84X + (0,150$   
178  $BW^{0,75} e^{-0,25X})$ , em que 0,84 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados da purina  
179 urinária e  $0,150 BW^{0,75} e^{-0,25X}$  é a contribuição endógena à excreção de purinas (VERBIC et  
180 al., 1990). O fluxo intestinal dos compostos nitrogenados ( $Y$ , g N dia<sup>-1</sup>) foi calculado em função  
181 da purinas microbianas absorvidas ( $X$ , mmol dia<sup>-1</sup>), usando a seguinte equação:  $Y = (70X) /$   
182  $(0,83 \times 0,116 \times 1000)$ , em que 70 é o teor de N nas purinas (mg N mmol); 0,83 é a digestibilidade  
183 da microbiana purinas; e 0,116 é a Purina N: bacteriana N. A produção microbiana foi expressa  
184 como g N microbiano (gramas de N microbiano) e P microbiano (gramas de proteína  
185 microbiana).

186 Para o balanço de nitrogênio foi realizado a quantificação do teor de nitrogênio da urina  
187 e fezes de acordo com a (AOAC, 2000).

188 As vacas foram ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia, às 6h e às 16h sendo a  
189 produção de leite (PL) registrada diariamente durante todo o período experimental e produção  
190 média considerada todos os dias do período experimental. A produção de leite foi corrigida para  
191 3,5% de gordura (PLC) segundo fórmula de Sklan et al. (1992), onde  $PLC = (0,432 + 0,163$   
192  $*G\%) * PL$ .

193 As amostras utilizadas para análise da composição do leite foram obtidas no 15º, 16º e  
194 17º dias de cada período experimental, na qual cada amostra proveniente das duas ordenha  
195 diárias, com amostragens proporcionais. Foram determinados os teores de gordura, proteína e  
196 lactose, através de espectrometria de infravermelho pelo equipamento LACTOSCAN®.

197 Para a análise de ácidos graxos do leite foi realizada a coleta de uma amostra ( $\pm 200$  ml)  
198 de leite, sendo uma alíquota da ordenha matutina e uma da ordenha vespertina. Para o processo  
199 de extração, as amostras foram centrifugadas a 17.800 x g por 30 minutos a 4 °C e próximo a  
200 19.300 x g por 20 minutos a 4 °C, de acordo com Feng et al. (2004). A gordura separada (300-  
201 400 mg) foi metilada e os ésteres metílicos foram formados de acordo com Kramer et al. (1997).

202 Dois padrões internos C18:0 e C19:0 foram utilizados para corrigir as perdas durante o processo  
203 de metilação.

204 Os ácidos graxos foram quantificados por cromatografia gasosa (GC Shimatzu 2010,  
205 com injeção automática), usando coluna capilar SP-2560 (100 m × 0,25 mm de diâmetro com  
206 0,02 mm de espessura, Supelco, Bellefonte, PA). A temperatura inicial foi de 70 °C por 4  
207 minutos (13°C/minuto) até chegar a 175°C, mantendo por 27 minutos. Depois, um novo  
208 aumento de 4°C/minuto, foi iniciado até 215°C, mantendo durante 31 minutos. Hidrogênio (H<sub>2</sub>)  
209 foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 40 cm/s. durante o processo de identificação  
210 foram utilizados quatro padrões: standard C4-C24 de ácidos graxos (Supelco ® TM 37), ácido  
211 vacênico C18:1 trans-11 (V038-1g, Sigma®), C18:2 CLA trans-10, cis-12 (UC-61M 100mg),  
212 e C18:2 cis-9, trans-11 (UC-60M 100mg), (NU-CHEK-PREP EUA ®) para identificação dos  
213 ácidos graxos que são formados durante a bio-hidrogenação de ácidos graxos insaturados.

214 As coletas de sangue foram realizadas no 19º dia de cada período experimental por  
215 punção da veia e/ou artéria coccígea. As análises das concentrações dos parâmetros sanguíneos  
216 foram por meio de kits comerciais (Bioclin®) com método enzimático colorimétrico e leitura  
217 automática de bioquímica sanguínea (Sistema de Bioquímica Automático SBA-200 CELM.  
218 Foram determinados os teores de glicose, colesterol, albumina e proteína bruta do sangue.

219 Para a avaliação dos parâmetros comportamentais, no 18º dia de cada período as  
220 medidas comportamentais de cada animal foram registradas através da observação e anotação.  
221 A cada 10 minutos foram registrados a frequência de animais se alimentando no cocho, em  
222 ruminação ou em ócio (Mezalira et al., 2011). O tempo despendido na atividade mastigatória  
223 (mastigação hora/dia) foi avaliado como sendo a soma do tempo na atividade da alimentação  
224 mais a ruminação.

225

226 *Análises estatísticas*

227 Os dados obtidos foram submetidos ao SAS (Version 9.1.3, SAS Institute, Cary, NC  
228 2004), verificando a normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias pelo PROC  
229 UNIVARIATE, adotando-se nível de significância de 5%.

230 Os dados oram serão analisados, pelo PROC MIXED de acordo com a seguinte modelo:

$$231 Y_{ijklm} = \mu + A_i + P_j + Q_k + Pl + Am + Pl(Am) + e_{ijklm}$$

232

233 Onde:  $Y_{ijklm}$  = variável dependente,  $\mu$  = media geral,  $A_i$ = efeito de animal ( $i= 1$  a 8),  
234  $P_j$ = efeito de período ( $j= 1$  a 4),  $Q_k$ = efeito de quadrado ( $k= 1$  a 2),  $A_m$  = efeito da silagem ( $A_m$   
235 = 1 a 2),  $Pl$ = efeito de protease ( $l = 1$  a 2),  $Pl(A_m)$  = efeito de interação e  $e_{ijklm}$  = erro. Os  
236 graus de liberdade serão corrigidos por  $DDFM = kr$ . Contraste: silagem de grão reidratado x  
237 grão de milho seco moído. Regressão polinomial para a inclusão de protease na silagem de grão  
238 de milho reidratado.

239 **3. Resultados**

240 **Tabela 2-** Separação de partículas da dieta de vacas leiteiras alimentadas com silagem de grão  
241 reidratado com ou sem protease

Item	Dietas experimentais				EPM	Valor de P		
	CON	Protease g/ton				Cvs SGU	Linear	Quad
		0	500	1000				
<i>Índice de seleção</i>								
>19 mm	0,641	1,39	1,62	1,08	0,161	0,024	0,376	0,082
19-8 mm	1,16	1,08	1,10	1,08	0,022	0,159	0,930	0,444
8-1,18 mm	1,11	1,07	1,07	1,07	0,008	0,050	0,929	0,907
<1,18 mm	1,07	1,31	1,83	1,20	0,1946	0,148	0,154	0,215
<i>Comportamento ingestivo (min/dia)</i>								
Alimentando	633,80	606,95	547,83	611,55	24,818	0,125	0,368	0,025
Mastigando	1246,40	1205,63	1177,96	1220,43	16,802	0,254	0,452	0,325
Ruminando	612,60	598,69	630,13	608,89	20,043	0,214	0,188	0,221
Ócio	68,33	85,05	82,53	83,04	4,745	0,025	0,214	0,558

Bebendo 125,27 149,32 179,51 136,53 16,015 0,214 0,444 0,847

242 <sup>1</sup>CON (dieta controle sem adição de silagem de grão úmido de milho reidratado); 0, 500, 1000 g/ton de inclusão  
 243 de CINBENZA DP100® extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g em silagem  
 244 de grão úmido de milho reidratado. <sup>2</sup>EPM (erro padrão da média). <sup>3</sup> COM vs SGU (dieta controle vs dieta com  
 245 silagem de grão úmido de milho reidratado) Efeitos lineares e quadráticos

246 Não houve influência ( $P>0,05$ ) das dietas experimentais sobre o índice de seleção. No  
 247 comportamento ingestivo (min/dia), não foi observado influencia ( $P>0,05$ ) das dietas  
 248 experimentais para os animais se alimentando, embora foi observado efeito quadrático para as  
 249 doses da enzima proteolíticas sendo que os animais consumindo as doses 500 g/ton passaram  
 250 menos tempo se alimento se comparado com as doses de 0 e de 1000 g/ton.

251 Houve diferença significativa para silagem de grão reidratado e concentrado padrão,  
 252 sendo que os animais que consumiram SGR ficaram mais tempo em ócio ( $P=0.025$ ) do que os  
 253 animais consumindo apenas concentrado padrão. Não houve diferença ( $P >0,05$ ) quanto ao  
 254 comportamento mastigando, ruminando e bebendo água para os animais e as dietas  
 255 experimentais.

256 Não houve efeito ( $P >0,05$ ) da silagem de grão reidratado (concentrado padrão \* SGR),  
 257 e nem de doses da enzima (0, 500, 1000 g/ton) sobre o consumo de nutrientes (kg/dia) de vacas  
 258 leiteiras ( $MS=13,54$ ;  $PB=2,31$ ), exceto para FDN ( $P=0,035$ ), sendo que os animais que  
 259 consumiram a SGR apresentaram maior consumo de FND. Observou que houve efeito  
 260 quadrático ( $P<0,05$ ) em função da dose de protease na silagem de grão reidratado, constatando  
 261 que para a SGR-500 houve maior conteúdo de FDN em relação as demais doses (Tabela 3).

262

263 **Tabela 3-** Consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes de vacas leiteiras alimentadas  
 264 com silagem de grão reidratado com ou sem protease.

Item	Dietas experimentais				EPM	Valor de P		
	CON	Protease g/ton				Convs SGR	Linear	Quad
		0	500	1000				
<i>Consumo (kg/dia)</i>								
Matéria seca	13,36	13,27	13,92	13,62	0,416	0,529	0,458	0,568

Matéria orgânica	12,09	12,24	12,82	12,38	0,394	0,305	0,411	0,584
Proteína bruta	2,31	2,01	2,47	2,44	0,120	0,993	0,398	0,587
FDN	6,83	7,83	9,26	7,69	0,421	0,035	0,451	0,015
Amido	3,91	3,75	3,94	3,85	0,117	0,256	0,441	0,567
<i>Consumo (%PV)</i>								
Matéria seca	3,28	3,01	3,21	3,20	0,104	0,313	0,125	0,555
FDN	1,62	1,76	2,14	1,80	0,092	0,042	0,185	0,224
<i>Digestibilidade (g/kg)</i>								
Matéria seca	584,43	596,75	649,00	610,01	16,154	0,035	0,232	0,002
Matéria orgânica	629,55	632,51	676,36	651,94	14,322	0,015	0,223	0,023
Proteína bruta	697,10	674,65	747,22	740,80	13,952	0,045	0,311	0,011
FDN	535,24	584,45	661,96	641,07	24,015	0,038	0,222	0,022
Amido	877,81	913,35	934,19	963,56	18,927	0,001	0,325	0,525

265 <sup>1</sup>CON (dieta controle sem adição de silagem de grão úmido de milho reidratado); 0, 500, 1000 g/ton de inclusão  
266 de CINBENZA DP100® extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g em silagem  
267 de grão úmido de milho reidratado. <sup>2</sup>EPM (erro padrão da média). <sup>3</sup> CON vs SGR (dieta controle vs dieta com  
268 silagem de grão de milho reidratado).

269 Quando observado o consumo expresso em %PV no FDN houve maior teor de FDN nas  
270 silagens com de grão reidratado se comparado com a dieta controle, não sendo observado  
271 influência ( $P>0,05$ ) da SGR e nem das doses de protease na dieta para MS em %PV.

272 Quanto à digestibilidade, houve diferença significativa ( $P<0,05$ ) entre a dieta controle e  
273 a SGR para MS, MO, PB, FDN e amido, onde o uso da silagem de grão reidratada na  
274 alimentação de vacas leiteiras aumentou significativamente a digestibilidade dos animais.  
275 Houve efeito quadrático ao ponto de máximo para doses de enzima na silagem para MS, MO,  
276 PB, FDN, sendo que animais consumindo a SGR-500 apresentou aumento da digestibilidade  
277 para todos os aspectos observados exceto para o amido.

278 Houve diferença significativa entre a dieta controle e a silagem de grão reidratado (SGR)  
279 para acetato ( $P= 0.033$ ) e propionato ( $P= 0.002$ ) (Tabela 4), onde as vacas alimentadas com  
280 silagem de grão de milho reidratada apresentaram maior produção de acetato e propionato.  
281 Houve efeito linear crescente para produção de acetato ( $P= 0.021$ ) e propionato ( $P= 0.002$ ),

282 onde as vacas que consumiram silagem com maiores doses de protease aumentou significativo  
283 a produção destes AGVs.

284

285 **Tabela 4-** Produção de ácidos graxos voláteis de vacas leiteiras alimentadas com silagem de  
286 grão reidratado com ou sem protease.

Item	Dietas experimentais				EPM	Valor de P			
	CON	Protease g/ton				CON	vs	Linear	Quad
		0	500	1000					
<i>mmol/L</i>									
Acetato	50,97	51,64	54,79	57,04	2,189	0,033	0,021	0,124	
Propionato	13,72	14,23	15,76	16,42	0,999	0,002	0,002	0,354	
Butirato	12,36	11,14	14,07	10,87	1,077	0,654	0,235	0,021	
Isobutirato	0,717	0,667	0,780	0,770	0,033	0,325	0,306	0,477	
Valerato	1,123	0,998	1,058	1,137	0,104	0,235	0,438	0,952	
Isovalerato	1,69	1,38	1,27	1,62	0,064	0,278	0,324	0,354	
Ác. grax ramificados	2,41	2,05	2,06	2,38	0,125	0,357	0,303	0,547	
Totais	81,34	82,11	82,49	90,25	3,922	0,025	0,021	0,547	
acetato:propionato	3,76	3,72	3,36	3,81	0,136	0,324	0,338	0,844	
Metano <sup>4</sup>	19,45	19,59	17,34	21,46	0,824	0,358	0,332	0,031	
pH	6,45	6,47	6,42	6,47	0,008	0,234	0,731	0,858	
N-NH <sub>3</sub> (mg/dL)	16,25	17,33	17,91	19,93	0,084	0,032	0,021	0,598	

287 <sup>1</sup>CON (dieta controle sem adição de silagem de grão de milho reidratado); 0, 500, 1000 g/ton de inclusão de  
288 CINBENZA DP100® extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g em silagem de  
289 grão úmido de milho reidratado. <sup>2</sup>EPM (erro padrão da média). <sup>3</sup> CON vs SGU (dieta controle vs dieta com silagem  
290 de grão de milho reidratado) Efeitos lineares e quadráticos. <sup>4</sup>Calculado de acordo com Moss et al (2000).

291 Já para produção de butirato não houve diferença significativa (P= 0.654) para a dieta  
292 controle e a silagem de grão reidratada, mas houve efeito quadrático (P=0.021) quando se  
293 observou as dose de protease incluídas na silagem, as vacas alimentadas com SGR-500  
294 apresentou maior produção de butirato, sendo observado o efeito contrário para produção de  
295 metano sendo que vacas consumindo SGR-500 apresentou menor produção de metano (P=  
296 0.031).

297 Houve efeito do uso de dietas contendo SGR produção total de ácidos graxos, onde as  
298 vacas alimentadas com SGR aumentou a produção total de ácidos graxos ( $P=0.025$ ) além disso  
299 houve efeito linear crescente, ou seja, a medida em que se aumentou a dose de protease também  
300 a produção total de ácidos graxos ( $P=0.021$ ) foi aumentada.

301 Houve efeito ( $P=0.032$ ) da substituição do concentrado grão de milho seco por SGR  
302 sobre a concentração de amônia ruminal, sendo que vacas que consumiram a dieta contendo a  
303 SGR apresentaram maior concentração de amônia ruminal em relação aquelas que consumiram  
304 o concentrado padrão, ainda houve efeito linear crescente ( $P=0.021$ ) para as doses de protease  
305 na silagem, onde as vacas que consumiram maior dose de protease foram as que apresentaram  
306 maior concentração de amônia ruminal. Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) para o pH  
307 do líquido ruminal das vacas alimentadas com as diferentes dietas experimentais.

308 Para o Balanço de nitrogênio (g/dia), houve efeito significativo na substituição de  
309 concentrado padrão por SGR ( $P= 0.048$ ) para N-absorvível e N-retido. Ainda quando se  
310 observou as doses de enzima em cada SGR os teores de N-absorvível tenderam a aumentar  
311 ( $P=0.032$ ). Enquanto o teor de N-retido houve efeito quadrático ( $P=0.011$ ) ao ponto de máximo,  
312 onde os maiores teores foram registrados nos animais consumindo SGR-500 (Tabela 4).

313 Não houve efeito significativo entre consumo de SGR e concentrado em relação aos  
314 ácidos graxos presentes no leite. Apenas o trans-10,cis-12 C18:2 apresentou efeito na dose de  
315 enzima proteolítica, sendo a dose 500 g/ton a que apresentou maior teor deste ácido graxo  
316 (Tabela 5).

317 Não houve efeito significativo entre consumo de SGR e concentrado em relação aos  
318 tipos de ácidos graxos presentes no leite, entretanto, houve interação quadrática entre as doses  
319 de protease para ácidos graxos de 4 a 14 carbonos e ácidos graxos com mais de 16 carbonos,  
320 onde na dose de 500 apresentou a menor quantidade de ácidos graxos de 4 a 14 carbonos e  
321 maior quantidade de ácidos graxos com mais de 16 carbonos.

322 **Tabela 5-** Composição de ácidos graxos do leite de vacas leiteiras alimentadas com silagem de  
323 grão reidratado com ou sem protease.

Item	Dietas experimentais <sup>1</sup>				EPM <sup>2</sup>	Valor de P <sup>3</sup>		
	CON	Protease g/ton				Cvs SGU	Linear	Quad
		0	500	1000				
<i>Ácidos graxos g/100g</i>								
C4:0	1,59	1,58	1,59	1,56	0,004	0,679	0,228	0,371
C6:0	1,66	1,65	1,66	1,65	0,008	0,673	0,889	0,868
C8:0	2,94	2,91	2,95	2,89	0,014	0,417	0,656	0,277
C10:0	6,78	6,94	6,63	6,77	0,061	0,972	0,248	0,099
C12:0	4,22	4,23	4,24	4,19	0,008	0,720	0,311	0,338
C14:0	10,82	11,09	10,87	10,93	0,062	0,239	0,346	0,354
C15:0	1,45	1,46	1,43	1,47	0,007	0,824	0,708	0,121
C16:0	27,98	27,45	27,78	27,84	0,138	0,354	0,365	0,721
C17:0	0,177	0,180	0,179	0,182	0,002	0,619	0,787	0,831
C18:0	14,23	14,23	14,21	14,09	0,052	0,703	0,352	0,661
<i>cis</i> 11,C18:1	7,13	7,13	7,11	7,15	0,030	0,954	0,779	0,721
<i>cis</i> 9,C18:1	13,36	13,40	13,41	13,53	0,066	0,601	0,535	0,787
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 C18:2	1,62	1,57	1,85	1,59	0,040	0,569	0,855	0,022
<i>trans</i> -9, <i>cis</i> -11 C18:2	0,865	0,901	0,889	0,893	0,009	0,212	0,805	0,775
C20:0	0,870	0,914	0,884	0,910	0,009	0,152	0,891	0,320
C22:0	0,851	0,853	0,847	0,848	0,004	0,899	0,713	0,757
Sumário								
Σ 4- a 14-C <sup>4</sup>	28,07	28,46	27,98	28,07	0,101	0,613	0,092	0,002
Σ acima de 16-C <sup>5</sup>	70,27	69,86	70,37	70,25	0,102	0,563	0,102	0,023
Σ AGS <sup>6</sup>	73,79	73,71	73,48	73,56	0,103	0,420	0,676	0,611
Σ AGI <sup>7</sup>	26,21	26,29	26,51	26,43	0,102	0,420	0,676	0,611
Σ AGMI <sup>8</sup>	22,12	22,19	22,17	22,35	0,073	0,520	0,477	0,612
Σ AGPI <sup>9</sup>	4,08	4,09	4,34	4,07	0,052	0,470	0,898	0,110
Σ AGCI <sup>10</sup>	2,24	2,28	2,23	2,28	0,009	0,323	0,992	0,104
Relação sat/insat <sup>11</sup>	2,82	2,80	2,77	2,78	0,014	0,430	0,656	0,651

324 <sup>1</sup>CON (dieta controle sem adição de silagem de grão úmido de milho reidratado); 0, 500, 1000 g/ton de  
325 inclusão de CINBENZA DP100® extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g em  
326 silagem de grão úmido de milho reidratado. <sup>2</sup>EPM (erro padrão da média). <sup>3</sup> COM vs SGU (dieta controle vs dieta  
327 com silagem de grão úmido de milho reidratado) Efeitos lineares e quadráticos. <sup>4</sup>Ácidos graxos de 4 a 14 carbonos.  
328 <sup>5</sup>Ácidos graxos com mais de 16 carbonos. <sup>6</sup>Ácidos graxos saturados. <sup>7</sup>Ácidos graxos insaturados <sup>8</sup>Ácidos graxos

329 monoinsaturados. <sup>9</sup>Ácidos graxos poliinsaturados. <sup>10</sup>Ácidos graxos de cadeia ímpar. <sup>11</sup>Relação ácidos graxos  
 330 saturados/insaturados total. <sup>12</sup>Relação ácidos graxos saturados/insaturados com 18 carbonos.  
 331 Analisando a Síntese microbiana, foi observado efeito significativo para N e PB quando  
 332 o concentrado padrão foi substituído pela SGR na dieta das vacas, onde as vacas consumindo  
 333 silagem de grão reidratada apresentaram maior Nitrogênio e Proteína bruta. Houve efeito linear  
 334 crescente, onde aumentou se exponencialmente o teor de N e PB a medida em que se aumentou  
 335 a quantidade de enzima proteolítica na dieta dos animais.

336

337 **Tabela 6-** Compostos químicos de vacas leiteiras alimentadas com silagem de grão reidratado  
 338 com ou sem protease.

Item	Dietais experimentais			EPM	Valor de P			
	CON	Protease g/ton			C vs SGU	Linear	Quad	
		0	500					1000
<i>Consumo (g/dia)</i>								
Nitrogênio	370,66	323,11	396,45	391,80	15,394	0,993	0,457	0,851
<i>Excreção (g/dia)</i>								
N-fezes	112,74	101,41	102,70	98,22	5,820	0,260	0,214	0,554
N-urina	80,58	69,17	58,18	86,57	4,782	0,398	0,255	0,602
<i>Balanço (g/dia)</i>								
N-absorvível	256,12	222,63	292,82	295,38	13,090	0,048	0,032	0,214
N-retido	176,42	153,01	235,08	207,91	15,352	0,032	0,214	0,011
<i>Síntese microbiana (g/dia)</i>								
Nitrogênio	64,02	65,46	76,44	84,46	2,327	0,001	0,001	0,254
Proteína bruta	400,17	409,15	477,79	527,89	14,542	0,001	0,001	0,254
<i>Bioquímica sanguínea (mg/dL)</i>								
Glicose	62,13	61,68	63,41	58,86	2,048	0,254	0,335	0,448
Colesterol total	138,13	120,86	128,07	127,69	4,412	0,158	0,258	0,259
Nitrogênio ureico	18,39	16,43	15,90	15,82	0,445	0,003	0,015	0,556

339 <sup>1</sup>CON (dieta controle sem adição de silagem de grão de milho reidratado); 0, 500, 1000 g/t de inclusão de  
 340 CINBENZA DP100® extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g em silagem de  
 341 grão úmido de milho reidratado. <sup>2</sup>EPM (erro padrão da média). <sup>3</sup>COM vs SGU (dieta controle vs dieta com silagem  
 342 de grão úmido de milho reidratado) Efeitos lineares e quadráticos.

343

344 Houve contraste (P=0.003) na substituição por SGR sobre o N ureico no sangue. As  
 345 vacas que consumiram a dieta contendo a SGR apresentaram menor concentração de nitrogênio  
 346 no sangue em relação as que consumiram apenas concentrado padrão. Houve efeito linear

347 decrescente para o nitrogênio ureico, onde as vacas que foram alimentadas com as maiores  
 348 doses de protease foram as que apresentaram menor teor de N ureico no sangue. Não houve  
 349 diferença significativa ( $P>5$ ) para Glicose e Colesterol total das vacas alimentadas com os  
 350 diferentes tipos de dietas experimentais.

351 Houve diferença significativa ( $P<0,05$ ) entre a dieta controle e a silagem de grão  
 352 reidratado para PLC (22.43) e EC (22.34), podendo inferir que a substituição do milho seco  
 353 moído por silagem de milho reidratado aumentou a produção de leite e gordura. Houve  
 354 significância nos valores lineares de doses de protease na dieta podendo inferir que à medida  
 355 que aumentou a dose de protease houve incremento dos valores para de produção de leite,  
 356 produção corrigida e energia corrigida (Tabela 7).

357 **Tabela 7-** Produção e composição do leite de vacas leiteiras alimentadas com silagem de grão  
 358 reidratado com ou sem protease.

Item	Dietas experimentais				EPM	Valor de P		
	CON	Protease g/ton				Cvs SGU	Linear	Quad
		0	500	1000				
<i>kg/dia</i>								
Produção de leite	17,93	18,85	19,79	20,89	0,768	0,008	0,021	0,335
PC 3,5%	19,02	19,77	21,77	22,43	0,637	0,002	0,014	0,512
EC (Mcal/dia)	19,89	19,91	21,61	22,34	0,639	0,003	0,002	0,148
Gordura	0,772	0,750	0,824	0,793	0,021	0,244	0,457	0,014
Proteína	0,637	0,648	0,642	0,640	0,033	0,245	0,547	0,577
Lactose	1,04	1,06	1,07	1,05	0,021	0,547	0,871	0,554
<i>Porcentagem</i>								
Gordura	3,97	3,81	4,25	4,07	0,110	0,154	0,527	0,023
Proteína	3,25	3,30	3,29	3,24	0,023	0,247	0,248	0,231
Lactose	5,37	5,41	5,48	5,37	0,054	0,355	0,123	0,541
<i>Eficiência produtiva</i>								
PL/CMS	1,34	1,42	1,41	1,52	0,053	0,003	0,024	0,542
PLC/CMS	1,42	1,49	1,55	1,63	0,047	0,021	0,035	0,248
ECM/CMS	1,48	1,50	1,54	1,64	0,038	0,001	0,011	0,554

359 <sup>1</sup>CON (dieta controle sem adição de silagem de grão úmido de milho reidratado); 0, 500, 1000 g/ton de inclusão  
 360 de CINBENZA DP100® extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g em silagem

361 de grão úmido de milho reidratado. <sup>2</sup>EPM (erro padrão da média). <sup>3</sup> COM vs SGU (dieta controle vs dieta com  
362 silagem de grão úmido de milho reidratado) Efeitos lineares e quadráticos.

363 Para o teor de gordura expresso em kg/dia e em porcentagem não houve significância  
364 entre a utilização do concentrado e da SGR, porém observou se efeito quadrático ao ponto de  
365 máximo entre os níveis de proteases na dieta, sendo a dose 500 a que apresentou maior teor de  
366 gordura no leite. Não houve diferença estatística entre as dietas experimentais para proteína e  
367 Lactose expresso nem Kg/dia nem porcentagem.

368 A silagem de grão reidratado também foi melhor que a dieta controle (Mcal/dia) em  
369 todos os parâmetros de eficiência produtiva (PL/CMS, PLC/CMS e EC/CMS), destacando a  
370 eficiência produtiva da silagem reidratada, além disso, houve significância para eficiência  
371 produtiva (PL/CMS, PLC/CMS e EC/CMS) para os valores lineares de doses de protease,  
372 podendo inferir que à medida que aumentou a dose de protease na dieta aumentou-se a  
373 eficiência produtiva de produção de leite, produção corrigida 3,5% e energia corrigida sobre o  
374 CMS.

#### 375 **4. Discussão**

376 Para o comportamento ingestivos dos animais, o tempo de alimentação foi menor em  
377 função das doses, os animais ficaram menos tempo se alimentando, comportamento  
378 semelhante foi observado para o índice de seleção, onde os animais que se alimentaram mais  
379 rapidamente obtiveram um índice de seleção maior, pois selecionaram menos e consumiram a  
380 dieta mais rapidamente. Sendo tirado o poder seleção dos animais com isso o tempo diminui.  
381 Embora o tempo de alimentação dos animais tenha diminuído, a capacidade digestiva dos  
382 animais não foi afetada, uma vez que as diferenças de apresentação do milho não ocasionaram  
383 interferência no consumo dos animais, onde pode ter ocorrido maior taxa de bocado, eos  
384 animais conseguiram consumir de acordo com as exigências previstas pelo NRC 2007.

385 O menor tempo de alimentação foi observado nos animais que receberam grão  
386 reidratado com protease, o que pode ser explicado maior consumo de FDN que foi maior nas  
387 dietas com protease, bem como a maior digestibilidade gerando maior pela maior

388 disponibilidade de nutrientes para fermentação e assim com maior saciedade, e esses animais  
389 também tiveram maior tempo de ócio em comparação ao grão moído, o que pode ter sido  
390 provocado pela menor necessidade de despender tempo para consumir alimentos, uma vez que  
391 suas necessidade foram supridas. Oba e Allen (2003b) observaram que vacas consumindo milho  
392 maduro moído tiveram maior consumo por refeição comparativamente às alimentadas com  
393 milho ensilado.

394 Dietas ricas em amido tendem a elevar a flora aminolíticas e diminuir o pH, pois seu  
395 perfil fermentativo apresenta quantidades elevadas de ácido propiônico e lactato, porém neste  
396 trabalho, não foi observado diferença no pH explicado pela maior participação de volumosos  
397 na dieta que correspondeu a 50%. As partículas ficaram retidas na primeira e na segunda peneira  
398 sendo a grande parte da dieta dos animais, com isso houve maior estímulo a ruminação, que  
399 gerou maior estímulo a mastigação e, conseqüentemente, aumento na secreção de saliva,  
400 elevando a capacidade de tamponamento do líquido ruminal, fatores que combinados não  
401 afetaram o tempo de mastigação e o pH ruminal. A saliva utilizada para explicar o pH, é um  
402 importante agente tamponante, pois possui abundante quantidade de bicarbonato de sódio e  
403 apresenta pH em torno de 8,1. Entretanto, a produção de saliva é influenciada pela quantidade  
404 de fibras fornecidas na dieta, assim como pelo teor de umidade da mesma (Reis; Silva, 2011).

405 O consumo de MS pelos animais neste trabalho não foi afetado pelo processo de  
406 reidratação de grão de milho e ensilagem e nem pela adição da protease na ração, apresentando  
407 consumo médio de 13,54 kg/dia, uma vez que o consumo de MS é influenciado por muitos  
408 fatores, como exemplo níveis nutricionais e os relacionados aos aspectos comportamentais dos  
409 animais e suas relações com ambiente e os alimentos, ou ainda pode ser regulado por fatores  
410 físicos, como capacidade de distensão do rúmen. Bráulio et al. (2019) também não constatou  
411 diferença no consumo de MS na substituição de grão de milho moído por grão reidratado  
412 ensilado. A ausência de CMS mostra que houve um bom processo fermentativo da silagem de  
413 milho reidratado, pois segundo Jobim (2008) quando a fermentação indesejada pode favorecer  
414 crescimento de bactérias do gênero clostridium, quando não há a redução do pH e através da

415 competição com as bactérias ácido lático pelos carboidratos solúveis, convertem açúcares e  
416 ácidos orgânicos em ácido butírico, ocasionando em odor desagradável, redução da  
417 palatabilidade, baixa aceitação pelos animais e inibição do consumo pelos animais.

418 A maior digestibilidade da MS na silagem de grão de milho reidratado evidencia que o  
419 processo de reidratação rompe as ligações glicosídicas do amido e que assim pode permitir  
420 maior acesso microbiano e partículas que por ventura escapem da degradação ruminal, podem  
421 ser mais facilmente digerida pelas enzimas intestinais.. Loubbe et al. (2009), relataram maior  
422 digestibilidade da MO para o grão de milho reidratado quando comparado com o milho  
423 laminado (80 vs 76,9%). O mesmo observado para PB quando utilizou SGR nas rações,  
424 aumentou-se o coeficiente de digestibilidade da PB, estando em conformidade com  
425 Bhattacharya, Harb (1973), que reportaram a alta digestibilidade da PB presente na SGR, o que  
426 pode ter favorecido esse ocorrido foi o aumento da disponibilidade de energia para os  
427 microorganismos do rumem devido ao aumento da digestibilidade de amido observada neste  
428 trabalho para SGR (913.35, 934.19 e 963.56 g/kg) gerando eficiência microbiana, permitindo  
429 aumento na disponibilidade de proteína microbiana para ser absorvida no intestino (Alves,  
430 2010).

431 A digestibilidade da FDN apresentou comportamento quadrático com a inclusão da  
432 enzima proteolítica na silagem, sendo que a 500 g/ton resultou no maior valor de  
433 digestibilidade da fibra quando comparada aos níveis de 0 e 1000 de protease, a maior  
434 digestibilidade da fibra na SGR-500, está relacionado com a geração de ácidos orgânicos  
435 durante a produção da silagem, assim o que pode ocorrer é que ocorra a solubilização da  
436 proteína ligada a fibra e torna essa FDN mais prontamente disponível aos microorganismos  
437 celulolíticos. Dietas com altos teores de proteína favorecem microorganismos proteolíticos,  
438 enquanto as altas em amido, que são baixas em fibra, estão associadas a uma grande  
439 população de utilizadores de amido e, as dietas com alta fibra favorecem as celulolíticas  
440 (Van Soest, 1994).

441 Neste trabalho houve aumento das concentrações de propionato para silagens

442 reidratadas com adição de protease, o qual está relacionada ao fato da maior digestibilidade  
443 da FDN e pelo fato de o processo de ensilagem poder quebrar ligações glicosídicas do amido  
444 e da celulose.

445 Quanto maior a relação acetato:propionato maior a produção de metano, pois o  
446 acetato juntamente com o butirato levam a maior liberação de H<sub>2</sub> no rúmen, pois quando  
447 temos presença de carboidratos de alta fermentação, os microorganismos mudam a rota  
448 metabólica de geração de propionato e o mesmo vai para a rota de lactato, sendo que para  
449 cada mol de lactato é gerado duas vezes mais hidrogênio, conseqüentemente a produção de  
450 H<sub>2</sub> eleva o aporte de metano produzido.

451 A maior fermentabilidade ruminal do amido na dieta das vacas leiteiras contendo SGR  
452 e maiores doses de protease, pode ter aumentado o fluxo de AGV do rúmen para o sangue e a  
453 proporção de propionato dentre os AGV absorvidos. O propionato em excesso à capacidade  
454 gliconeogênica do fígado seria oxidado, gerando ATP capaz de induzir saciedade por estímulo  
455 cerebral mediado pelo vago (VARGAS, 2014). O aumento na produção de propionato é  
456 resposta típica em vacas alimentadas com dietas com maior concentração de carboidratos  
457 fermentáveis (FIRKINS et al., 2001).

458 Os resultados advindos da maior digestibilidade nutricional das vacas alimentadas com  
459 dietas contendo silagem de milho apresentaram o aumento da disponibilidade de energia para  
460 os microorganismos do rumem devido ao aumento da digestibilidade de amido observada neste  
461 trabalho. O processo de ensilagem foi capaz de melhorar a digestibilidade do amido por romper  
462 as ligações glicosídicas do amido durante o processo fermentativo.

463 A produção de propionato ocasiona maior eficiência energética, tanto devido ao maior  
464 aporte de substâncias gliconeogênicas (ácido propiônico), como pela diminuição na perda de  
465 energia devido à menor produção de metano, verificado nesse trabalho (Manella et al. 2003),  
466 além disso os microrganismos celulolíticos (algumas espécies de bactérias e protozoários) e  
467 bactérias metanogênicas têm baixa tolerância a mudanças de ambiente.

468 Observou-se que a produção de metano e nitrogênio amoniacal também aumentaram  
469 com a inclusão da protease na silagem de grão úmido. Na dose 500 de protease o metano foi  
470 menor que os demais tratamentos, sendo contrário a digestibilidade de MS, PB e FDN, para  
471 este tratamento também observou-se menor proporção acetato:propionato. Mostrando que a  
472 protease tem o benefício de otimizar o metabolismo energético da dieta e com isso reduzir o  
473 metano.

474 O aumento da produção de nitrogênio amoniacal pode estar relacionada à maior quebra  
475 da fração proteica no rumen pelos microrganismos no ambiente ruminal, a maior emissão de  
476 metano ocorre em alimento com menor energia, logo, a ação da protease sobre a disponibilidade  
477 da energia favorece a redução da produção de metano.

478 Houve diferença no nitrogênio ureico plasmático diferindo entre tratamento com e sem  
479 SGR. A medida que se aumentou protease na dieta das vacas lactantes houve tendência de queda  
480 no NUP nas vacas alimentadas com SGR, os dados explicam que a dieta com maior dose de  
481 protease foi a mais efetiva permitindo um aumento na proteína microbiana impedindo assim  
482 que a amônia fosse para o sangue e transformasse em ureia no fígado.

483 O nitrogênio amoniacal aumentou com o uso de silagem reidratada pois houve maior  
484 digestibilidade de proteína também neste tratamento, sendo a proteína liberada ou seja mais  
485 nitrogênio no ambiente ruminal. O aumento da produção de nitrogênio amoniacal com o  
486 aumento das doses de protease (19.93 mg/dL) esta relacionada ao aumento da ingestão de  
487 matéria seca (649.00 g/kg) e degradação da fração proteica da dieta no rumen pelos  
488 microrganismos no ambiente ruminal. pois libera a proteína presa dentro da matriz do amido.

489 A maior quantidade de Nitrogênio retido foi devido a maior síntese microbiana, gerando  
490 mais nitrogênio e mais proteína, conseqüentemente mais nitrogênio amoniacal, o que elevou a  
491 aumentou nitrogênio retido. O nitrogênio microbiano é de alto valor biológico, sendo um  
492 aminoácido puro e que rapidamente é absorvido pelo intestino, cai na corrente sanguínea, e é  
493 excretado na urina e nas fezes.

494 A disponibilidade de carboidratos rapidamente fermentáveis, na presença de  
495 quantidades inadequadas de N, pode ter levado à competição entre as bactérias celulolíticas e  
496 as fermentadoras de carboidratos não fibrosos, inibindo as primeiras.

497 Os resultados da utilização de energia e nitrogênio pelas vacas estão relacionados com  
498 a ingestão de nutrientes e a digestibilidade. Os animais alimentados com dietas contendo SGR  
499 tiveram maior consumo e digestibilidade de MS e, conseqüentemente, apresentaram maior  
500 consumo de energia e equilíbrio de energia e proteína no rúmen, aumentando a síntese  
501 microbiana. Este efeito está relacionado com o aporte proteico e energético da dieta, onde os  
502 principais fatores que limitam o crescimento microbiano são a disponibilidade de nitrogênio e  
503 de energia no rúmen (Clark et al., 1992). Assim, o aporte de energia associado ao aporte  
504 proteico aumentou a eficiência de utilização dos compostos nitrogenados, reduzindo a excreção  
505 de nitrogênio.

506 O aumento da produção de leite nos tratamentos propostos pode ser explicado pela  
507 maior digestibilidade dos nutrientes e concentração de energia da dieta com o uso de protease  
508 nas silagens de grão reidratado. A energia é o principal limitante a produção de leite e a  
509 suplementação estratégica é necessária para obter-se níveis maiores de produção. A energia  
510 advinda da fermentação dos carboidratos não fibrosos gera maior produção de propionato  
511 sendo um dos principais substratos para a gliconeogênese hepática, resultando em aumento das  
512 concentrações plasmáticas de glicose, importante fator envolvido na produção de leite (Oba;  
513 Allen, 2003).

514 A maior produção de gordura e gordura em porcentagem encontrada neste trabalho para  
515 silagem de grão reidratado com 500 g/ton de protease, pode ser explicado pela dose onde a  
516 disponibilidade e carboidratos da dieta manteve o ambiente ruminal favorável a degradação da  
517 fração fibrosa da dieta sem comprometer a produção de gordura. Os dados apresentados  
518 sugerem que a fibra fisicamente efetiva contida na dieta foi suficiente para estimular a  
519 mastigação e manter o teor de gordura do leite, juntamente com a produção de acetado que é

520 utilizado pelos tecidos musculares, mamário e adiposo como fonte de energia e precursor de  
521 gordura corporal e do leite.

522 A eficiência produtiva da PL/CMS, PLC/CMS e EC/CMS, aumentou linearmente com  
523 a inclusão da protease na silagem de grão reidratado em comparação ao milho moído e a silagem  
524 sem protease. O aumento da eficiência da produção de leite pelos animais quando utilizado a  
525 reidratação no milho, pode ser atribuído ao aumento do aproveitamento do amido convertendo  
526 em maior aporte de nutrientes e assim produção de leite. Já o aumento da eficiência da produção  
527 de leite quando os animais consumiram dietas com maiores doses de protease pode ser em  
528 função do aumento da Energia Líquida corrigida.

## 529 **5. Conclusão**

530 O uso da técnica de reidratação e ensilagem do milho resulta em melhores características  
531 nutricionais na dieta o que melhora a eficiência produtiva do sistema.

532 O uso de protease associado a rehidratação do milho e ensilagem trás consigo melhoras  
533 na fermentação ruminal e digestibilidade dos nutrientes até 500 g/tom.

## 534 **6. Referências**

535 AOAC Association of Official Analytical Chemists International, 2005. Official methods of  
536 analysis of AOAC International, 18th ed. AOAC International, Gaithersburg, Maryland.

537

538 Alves, EM., dos Santos Pedreira, M., de Oliveira, CAS., Ferreira, DN., Moreira, BS., Freire,  
539 LDR, 2010. Importância da sincronização do complexo proteína/energia na alimentação de  
540 ruminantes. Pubvet. 4, 844-849.

541

542 Biaggioni, MAM., Lopes, ABDC., Jasper, SP., Berto, DA., Gonçalves, EV, 2009. Qualidade  
543 da silagem de grão úmido em função da temperatura ambiente e pressão interna de  
544 armazenagem. Acta Scientiarum. Agronomy. 31, 377-382.

545 <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v31i3.325>.

- 546   Bhattacharya, NA., Harb, M, 1973. Polpa cítrica seca como substituto de grãos para cordeiros  
547   Awasi. *Journal of Animal Science*. 36, n. 6, 1175-1180.  
548
- 549   Bráulio, RC., Mota, DA., Oliveira, AR, Pereira, AA., Araújo, SAC., Melo, TV., Passetti, LCG.,  
550   Nogueira, MAR, 2019. Comportamento ingestivo de bovinos holandeses x zebu alimentados  
551   com diferentes formas físicas do milho e uréia. *Caderno de Ciências Agrárias*. 11,1-8.  
552   <https://doi.org/10.35699/2447-6218.2019.15190>.  
553
- 554   De Haas, Y., Pszczola, M. Soyeurt, H., Wall, E., Lassen, J, 2017. Invited review: Phenotypes  
555   to genetically reduce greenhouse gas emissions in dairying. *Journal of Dairy Science*. 100, 855–  
556   870. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11246>.  
557
- 558   Firkins, JL., Eastridge, ML., St-Pierre, NR., Nofstger, SM, 2001. Effects of grain variability  
559   and processing on starch utilization by lactating dairy cattle. *Journal of Animal Science*,  
560   Champaign. 79, 218-238. <https://doi.org/10.2527/jas2001.79E-Supple218x>.  
561
- 562   Holding, DR, 2014. Recent advances in the study of prolamin storage protein organization and  
563   function. *Frontiers in Plant Science*. 5, 1-9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00276>.  
564
- 565   Kononoff, PJ., White, RR., Hall, MB., Firkins, JL, 2017. Physically adjusted neutral detergent  
566   fiber system for lactating dairy cow rations. *Journal of laticínios*. 100, 9551-9568.  
567
- 568   Kung JR, L., Windle, MC, Walker, N, 2014. O efeito de uma protease exógena na fermentação  
569   e valor nutritivo do milho de alta umidade. *Journal of laticínios*. 97, 1707-1712.  
570
- 571   Manella, MQ., Lourenço, AJ., Leme, PR, 2003. Recria de bovinos nelore em pastos de  
572   *Brachiaria brizantha* com suplementação protéica ou com acesso a banco de proteína de leucena

- 573 leucocephala: características de fermentação ruminal. Revista Brasileira de Zootecnia. 32, 1002-  
574 1012. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982003000400028>.
- 575
- 576 Mourão, RDC., Pancoti, CG., Moura, AM., Ferreira, AL., Borges, ALCC., Reis E Silva, R,  
577 2017. Processamento do milho na alimentação de ruminantes. Pubvet. 6, 5.
- 578
- 579 Oba, M., Allen, MS, 2003. Dose response effects of intraruminal infusion of propionate on  
580 feeding behavior of lactating cows in early or midlactation. Journal of Dairy Science, 86,2922-  
581 2931.
- 582
- 583 Rocha, MP., Da Silva Taveira, JH., Prado, SMA., Ataíde, MV, 2020. Sistema de  
584 armazenamento e incidência dos principais fungos produtores de micotoxinas em grãos.  
585 Brazilian Journal of Development. 6, 50176-50193. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n7-608>.
- 586
- 587 Silva, MRH., Jobim, CC., Neumann, M., Osmari, MP, 2011. Corn grain processing improves  
588 chemical composition and fermentative profile of rehydrated silage. Revista Acta Scientiarum.  
589 40, 42564-42564. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v40i1.42564>.
- 590
- 591 Vargas-Rodriguez, CF., Engstrom, M., Azem, E., Bradford, BJ, 2014. Effects of dietary  
592 amylase and sucrose on productivity of cows fed low-starch diets. Journal of Dairy Science. 97,  
593 4464–4470. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7845>.
- 594
- 595 Windle, MC., Walker, N., Kung JL, 2014. Efeitos de uma protease exógena sobre a fermentação  
596 e valor nutritivo da silagem de milho colhida em diferentes teores de matéria seca e ensilada  
597 por vários períodos de tempo. Journal of Dairy Science. 97, 3053-3060.