**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Influência de genótipo, maturidade e tempo de armazenamento na
qualidade de silagens de grãos de milho com alta umidade**

Juliana Fernandes

Dissertação para obtenção do título de Mestra em
Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e
Pastagens

**Piracicaba
2014**

Juliana Fernandes
Zootecnista

**Influência de genótipo, maturidade e tempo de armazenamento na qualidade de silagens
de grãos de milho com alta umidade**

Orientador:
Prof. Dr. **LUIZ GUSTAVO NUSSIO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

Piracicaba
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Fernandes, Juliana

Influência de genótipo, maturidade e tempo de armazenamento na qualidade de silagens de grãos de milho com alta umidade / Juliana Fernandes.- - Piracicaba, 2014.

97 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Milho grão dentado 2. Milho grão duro 3. Silagem de grão úmido 4. Prolamina
5. Proteína solúvel 6. Silagem de grãos úmidos reconstituídos I. Título

CDD 633.15
F363i

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte -O autor"

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes”.

Cora Coralina

*Aos meus amados pais, Aparecida e José, pelo amor incondicional,
educação e apoio.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela minha família linda, pelas oportunidades que tenho, pela fé e esperança que foram primordiais para superar as dificuldades e acreditar na realização dos meus ideais.

Aos meus pais José e Aparecida, exemplos de vida e sabedoria, pela educação, amor, incentivo, confiança e por nunca terem medido esforços para que eu pudesse realizar meus objetivos. Amo vocês eternamente.

Aos meus irmãos Jorge, Joel, Claudinéia, José Carlos e Lindormar, e a minha tia Terezinha pelo grande incentivo aos estudos, à dedicação, ao amor incondicional.

Ao meu namorado Martílio, por me dar forças e por sempre acreditar em meus ideais, além de ser meu grande amigo, companheiro e confidente em todos os momentos e por sempre me mostrar o lado bom da vida.

Aos meus sobrinhos Jefferson, Stefani, Jaquelline, Victória, Mateus, Júlia e Maria Clara. A verdadeira família é aquela unida pelo espírito e não pelo sangue.

A Sra. Maria de Lourdes (*in Memoriam*), que sempre viveu todos os dias com muita alegria e me mostrou que ser feliz sem motivo é a mais autêntica forma de felicidade.

Aos meus grandes amigos Andreza, Camila, Diana e Matheus.

A Sra. Anna Maria de Oliveira Moraes e ao Sr. Ermírio Pereira de Moraes pelo apoio financeiro e confiança.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade de estudo e experiência profissional.

Ao Prof. Dr. Luiz Gustavo Nussio, pelo grande auxílio na elaboração deste trabalho, e pela orientação na sua condução, obrigada pela oportunidade e confiança.

A pesquisadora Solidete de Fátima Paziani e a Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), pelo auxílio na condução dos trabalhos.

Aos meus colegas do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, ao grupo de Qualidade e Conservação de Forragens (QCF) e aos que por lá passaram: Adir, Alsiane, Álvaro, Attilio, Biribol, Bleine, Cristiano, Daniel, Dheyne, Edward, Fernando, Greiciele, Janaina, Janielen, João, João Pedro, Leticia, Maity, Max, Murilo, Paula, Pedro, Poka Sombra, Pumba, Sem Kina, Soldadinho... pela amizade, ajuda e convivência.

As grandes amizades construídas durante o mestrado, em especial Álvaro, Cristiano, Greici, Daniel, Janaina, João Luiz, Letícia e Pedro.

Ao Daniel e João Luiz, pelo companheirismo, pelas risadas e ajuda na condução deste trabalho, não teria conseguido sem o auxílio e paciência de vocês.

A Maria Cecília, a mascote da turma que tornou nossos dias mais “cor-de-rosa”.

Ao técnico do Laboratório de Bromatologia César, e a funcionária Tânia, pela paciência, ajuda e amizade, tornando meus dias sempre mais alegres.

Ao Laboratório de Genética, em especial à Dra. Salete A. Gaziola pela orientação nas análises.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia, Sr. Wagner, Sr. Néco, Bacana, Heleninha, Jucelino e Emerson.

A CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	23
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	25
1 INTRODUÇÃO	27
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1 A cultura do milho e sua importância.....	29
2.2 Textura do endosperma	29
2.3 Maturidade.....	32
2.4 Proteínas de reserva	33
2.5 Silagem de grão úmido	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Avaliações agrônômicas e bromatológicas	39
3.2 Características físicas	41
3.3 Composição química e perfil fermentativo	42
3.4 Extração e quantificação de proteínas prolaminas (zeínas).....	44
3.5 Degradabilidade <i>in situ</i>	44
3.6 Análises estatísticas	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Caracterizações do grão e da amostra fresca	47
4.2 Caracterização da silagem	52
4.3 Degradabilidade <i>in situ</i>	73
5 CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS	87

RESUMO

Influência de genótipo, maturidade e tempo de armazenamento na qualidade de silagens de grãos de milho com alta umidade

O experimento avaliou os efeitos da ensilagem, da maturidade e do genótipo na matriz amido-protéica e no valor nutritivo de silagens de grão de milho com alta umidade. O delineamento experimental foi blocos ao acaso, com esquema fatorial $2 \times 3 \times 5$: dois genótipos (duro ou dentado), três pontos de maturação (ponto de ensilagem de planta inteira, ponto de grão úmido e ponto de grão seco) e cinco tempos de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias), com 4 repetições. Os tratamentos foram constituídos por híbridos de milho AG 1051 (dentado) e IAC 8390 (duro). Os dados foram submetidos à análise de variância e as suas médias comparadas pelo Teste Tukey (5%). Foram avaliadas as características físicas dos grãos ao longo da maturidade, características físico-químicas, composição química e perfil fermentativo das silagens, extração e quantificação de proteínas prolaminas (zeínas) e degradabilidade ruminal *in situ* da matéria seca e de amido das silagens. Nos grãos, as concentrações de proteínas prolaminas foram maiores para o híbrido duro ($P < 0,01$) e aumentaram conforme a maturidade, sendo que a vitreosidade teve alta correlação com a concentração dessas proteínas. Já na silagem, os teores de proteínas prolaminas foram similares para grão úmido e grão seco reconstituído ao longo do período de armazenamento, independentemente do híbrido ensilado. O teor de nitrogênio amoniacal e proteína solúvel das silagens aumentaram ($P < 0,01$) ao longo do período de armazenamento. Silagens de grão seco reconstituído apresentaram maiores valores de pH, maiores teores de ácido butírico, etanol, acetona e 2,3-butanodiol. A maior degradabilidade ruminal de amido foi correlacionada negativamente ($P < 0,01$) com a concentração de proteínas prolaminas e positivamente relacionada ($P < 0,01$) aos teores de proteína solúvel e nitrogênio amoniacal. O efeito de genótipo e maturidade foram superados por tempos de armazenamento superiores a 60 dias, no tocante à degradabilidade ruminal das silagens. Silagens de grão seco reconstituído apresentaram maiores perdas de matéria seca e qualidade higiênica inferior às silagens de grão úmido.

Palavras-chave: Milho dentado; Milho duro; Silagem de grão úmido; Prolamina; Proteína solúvel; Vitreosidade

ABSTRACT

Influence of genotype, maturity and lenght of storage on silage corn grain quality with high moisture

The experiment evaluated the effects of silage maturity and genotype on starch-protein matrix and nutritive values of corn grain silage with high moisture. The experiment design was randomized blocks with $2 \times 3 \times 5$ factorial: two genotypes (flint or dent), three maturity stages (whole plant silage stage, moisture grain stage and dry grain stage) and five lengths of storage (0, 7, 21, 60 and 120 days), with four replications. The treatments were composed by two corn hybrids - AG 1051 (dent) and IAC 8390 (flint). The data were subjected to analysis of variance and the averages were compared by Tukey test (5%). Corn grains physical characteristics along the maturity, physicochemical characteristics, chemical composition and fermentation characteristics of silages, extraction and quantitation of prolamin protein (zein) and dry matter and starch *in situ* silage degradability were evaluated. In corn grains, the concentration of prolamin protein was higher for hybrid flint ($P < 0.01$) and also increased with maturity, and the vitreousness had higher correlation with the concentration of these proteins. Furthermore in silages, prolamin proteins were similar to high moisture grain and dry grain reconstituted, along with storage, regardless of the hybrid. In silage, the ammonia nitrogen and soluble crude protein contents increased ($P < 0.01$) during the length of storage. Reconstituted dry grain silages had higher pH, higher concentrations of butyric acid, ethanol, acetone and 2,3 - butanediol. The highest ruminal starch degradability was negatively correlated ($P < 0.01$) with the prolamin protein concentration and positively ($P < 0.01$) related to soluble crude protein and ammonia nitrogen protein levels. The effect of genotype and maturity were overcome by 60 days length of storage, according to ruminal degradability of silages. Reconstituted dry grain silages had higher DM losses and the hygienic quality was lower compared with high moisture corn silages.

Keywords: Dent corn; Flint corn; High moisture corn silage; Prolamin; Soluble protein; Vitreousness

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Relação entre vitreosidade do grão e disponibilidade ruminal do amido *in situ* avaliado em híbridos norte-americanos (◆) e três híbridos brasileiros (●). Disponibilidade = $108,2 - 0,7605 \times \text{Vitreosidade}$. $R^2 = 0,87$. Disponibilidade (% do amido) = $A + B [kd/(kd + kp)]$, assumindo $kp = 0,08/h$. Adaptado de Correa et al. (2002).....31
- Figura 2 - Representação da parcela experimental constituída de seis linhas para colheita de grãos nos pontos de maturação: PI, GU e GS.....38
- Figura 3 - Matéria seca (MS) de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,23$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento.....52
- Figura 4 - Capacidade de retenção de água (CRA) de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,31$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,03$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,02$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento.....53
- Figura 5 - Condutividade elétrica (CE) de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento.53
- Figura 6 - Carboidratos solúveis (CHO sol.) de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,02$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,21$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento.55

- Figura 7 - Proteína bruta (PB) de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,22$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,81$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P = 0,14$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,15$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento. 55
- Figura 8 - Teor de cinzas de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,57$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,20$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P = 0,16$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,96$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento. 56
- Figura 9 - Teor de amido de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,06$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,75$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P = 0,94$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,80$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento. 56
- Figura 10 - Teores de proteínas prolaminas de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,9541$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento. 57
- Figura 11 - Nitrogênio amoniacal (N-NH₃) de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,41$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,38$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento. 58
- Figura 12 - Proteína solúvel de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento. 59
- Figura 13 - pH de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120

dias). $P = 0,6070$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,74$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,84$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento.....60

Figura 14 - Ácido láctico de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,40$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,58$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento.....61

Figura 15 - Ácido acético de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,27$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,82$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P = 0,38$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,03$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento.....62

Figura 16 - Razão ácido láctico e ácido acético de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,41$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,29$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,15$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento.63

Figura 17 - Ácido propiônico de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,90$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,06$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P = 0,48$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,86$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento.63

Figura 18 - Ácido butírico de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,94$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,11$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,07$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento.64

Figura 19 - Etanol de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,05$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,24$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,05$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento.65

- Figura 20 - Teores de acetona de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,17$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,10$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,27$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento..... 66
- Figura 21 - Acetato de etila de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,17$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,10$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,28$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento..... 66
- Figura 22 - Álcool iso-propílico de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento. 67
- Figura 23 - Acetato de propila de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,74$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,84$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P = 0,32$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,54$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento. 67
- Figura 24 - 2-Butanol de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,82$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,73$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P = 0,48$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,12$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento..... 68
- Figura 25 - 1-Propanol de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,90$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,01$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento. 68
- Figura 26 - Lactato de etila de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e tempos de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120

dias). $P = 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,49$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,04$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento.69

Figura 27 - 2,3-Butanodiol de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,28$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,48$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,55$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento.70

Figura 28 - 1,2-Propanodiol de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento.....71

Figura 29 - Ácido iso-valérico de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,21$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,91$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P = 0,60$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,02$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento.71

Figura 30 - Ácido valérico de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,11$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,96$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P = 0,95$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,03$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento.72

Figura 31 - Perdas de matéria seca de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,66$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,10$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento.73

Figura 32 - Solubilidade *in situ* da matéria seca (MS) de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,15$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para

interação maturidade × armazenamento. $P < 0,01$ para interação híbrido × maturidade × armazenamento. 74

Figura 33 - Degradabilidade ruminal *in situ* da matéria seca (MS) em 12h de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,01$ para interação híbrido × maturidade. $P < 0,01$ para interação híbrido × armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade × armazenamento. $P = 0,17$ para interação híbrido × maturidade × armazenamento. 75

Figura 34 - Degradabilidade ruminal *in situ* da matéria seca (MS) em 24h de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,02$ para interação híbrido × maturidade. $P < 0,01$ para interação híbrido × armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade × armazenamento. $P = 0,74$ para interação híbrido × maturidade × armazenamento. 76

Figura 35 – Fração A *in situ* de amido da MS de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) em diferentes maturidades (PI, GU e GSR) e tempos de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P < 0,01$ para interação híbrido × maturidade. $P = 0,02$ para interação híbrido × armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade × armazenamento. $P < 0,01$ para interação híbrido × maturidade × armazenamento. 76

Figura 36 - Degradabilidade ruminal *in situ* de amido em 12h de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,02$ para interação híbrido × maturidade. $P < 0,01$ para interação híbrido × armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade × armazenamento. $P = 0,11$ para interação híbrido × maturidade × armazenamento. 77

Figura 37 - Degradabilidade ruminal *in situ* de amido em 24h de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P < 0,01$ para interação híbrido × maturidade. $P < 0,01$ para interação híbrido × armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade × armazenamento. $P = 0,35$ para interação híbrido × maturidade × armazenamento. 77

Figura 38 - Correlação entre prolamina e fração A de amido (A) em silagens de grãos de milho; Fração A de amido = $-1,68 \times \text{prolamina}^2 - 1,46 \times \text{prolamina} + 98,94$; $R^2 =$

0,74; $P < 0,01$; Menor erro do quadrado médio (RQME) = 5,43. Correlação entre prolamina e a degradabilidade de amido em 12 horas (B) em silagens de grãos de milho; Degradabilidade de amido 12h = $-1,29 \times \text{prolamina}^2 + 0,29 \times \text{prolamina} + 98,41$; $R^2 = 0,84$; $P < 0,01$; Menor erro do quadrado médio (RQME) = 3,03. Correlação entre prolamina e a degradabilidade de amido em 24 horas (C) em silagens de grãos de milho; Degradabilidade de amido 24 h = $-0,96 \times \text{prolamina}^2 + 2,60 \times \text{prolamina} + 95,72$; $R^2 = 0,87$; $P < 0,01$; Menor erro do quadrado médio (RQME) = 1,27..... 79

Figura 39 - Correlação entre N-NH₃ e fração A de amido (A) determinada em silagens de grãos de milho; Fração A de amido = $-1,65 \times \text{N-NH}_3^2 + 15,81 \times \text{N-NH}_3 + 54,66$; $R^2 = 0,74$; $P < 0,01$; Menor erro do quadrado médio (RQME) = 5,36. Correlação entre N-NH₃ e degradabilidade de amido em 12 horas (B) determinada em silagens de grãos de milho; Degradabilidade de amido 12 h = $-1,82 \times \text{N-NH}_3^2 + 13,61 \times \text{N-NH}_3 + 68,18$; $R^2 = 0,81$; $P < 0,01$; Menor erro do quadrado médio (RQME) = 3,31. Correlação entre N-NH₃ e degradabilidade de amido em 24 horas (C) determinada em silagens de grãos de milho. Degradabilidade de amido 24 h = $-1,00 \times \text{N-NH}_3^2 + 6,75 \times \text{N-NH}_3 + 85,51$; $R^2 = 0,77$; $P < 0,01$; Menor erro do quadrado médio (RQME) = 1,72..... 81

Figura 40 - Correlação entre PB solúvel e fração A de amido (A) determinada em silagens de grãos de milho; Fração A de amido = $-0,01 \times \text{PB solúvel}^2 + 1,18 \times \text{PB solúvel} + 49,42$; $R^2 = 0,85$; $P < 0,01$; Menor erro do quadrado médio (RQME) = 4,08. Correlação entre PB solúvel e degradabilidade de amido em 12 horas (B) determinada em silagens de grãos de milho; Degradabilidade de amido 12 h = $-0,01 \times \text{PB solúvel}^2 + 0,91 \times \text{PB solúvel} + 65,50$; $R^2 = 0,88$; $P < 0,01$; Menor erro do quadrado médio (RQME) = 2,60. Correlação entre PB solúvel e degradabilidade de amido em 24 horas (C) determinada em silagens de grãos de milho; Degradabilidade de amido 24 h = $-0,00 \times \text{PB solúvel}^2 + 0,45 \times \text{PB solúvel} + 84,20$; $R^2 = 0,80$; $P < 0,01$; Menor erro do quadrado médio (RQME) = 1,60. ..82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média dos teores de umidade (%) de grãos de híbridos de milho (IAC 8390 e AG 1051) em diferentes pontos de maturidade.....	39
Tabela 2 - Parâmetros agronômicos de plantas de milho (IAC 8390 e AG 1051) colhidas no ponto de ensilagem de planta inteira	40
Tabela 3 - Composição bromatológica de plantas de milho (IAC 8390 e AG 1051) colhidas no ponto de ensilagem de planta inteira	41
Tabela 4 - Características físicas de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) colhidos ao longo da maturidade (PI, GU e GS).....	47
Tabela 5 - Características físicas e químicas de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) no momento da ensilagem, de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR)	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CE	Condutividade elétrica
CHOsol.	Carboidratos solúveis
CRA	Capacidade de retenção de água
EE	Extrato etéreo
FDN	Fibra insolúvel em detergente neutro
GS	Grão seco
GSR	Grão seco reconstituído
GU	Grão úmido
MS	Matéria seca
MSit	Matéria seca insolúvel em tampão
MV	Matéria verde
N-NH ₃	Nitrogênio amoniacal
PB	Proteína bruta
PI	Planta inteira
TMP	Tamanho médio de partícula

1 INTRODUÇÃO

O milho é um dos cereais mais utilizados na nutrição animal devido suas qualidades nutritivas e seu alto potencial produtivo. Com a finalidade de melhorar o aproveitamento pelos animais, o milho pode ser processado de diversas formas, já que a digestibilidade do amido pode ser influenciada pelo método de processamento e tipo de grão. Dentre os tipos de processamento, o interesse pela ensilagem de grãos de milho com alta umidade (25% a 35%) é crescente, devido a suas vantagens zootécnicas e econômicas (COSTA et al., 2002; JOBIM; REIS, 2001; MADER; RUST, 2006; OWENS; ZINN, 2005).

As características físicas do grão podem auxiliar na escolha do híbrido que melhor atenda o aproveitamento desse alimento pelo animal. Porém, estas características são raramente avaliadas, principalmente em relação às suas propriedades nutricionais que podem ser levadas em consideração na formulação de rações e algumas dessas características poderiam explicar em parte a interação entre a microbiota ruminal e a degradação de alimentos (GIGER-REVERDIN, 2000; PHILIPPEAU; LE DESCHAULT de MONREDON; MICHALET-DOREAU, 1999).

Fatores intrínsecos ao tipo de grão de cereal são: a vitreosidade (CORREA et al., 2002) e principalmente, a presença da matriz protéica revestindo os grânulos de amido (McALLISTER et al., 2006). A vitreosidade ou textura do grão de milho está associada à estrutura física do endosperma e a degradação do amido no rúmen (PHILIPPEAU; LE DESCHAULT de MONREDON; MICHALET-DOREAU, 1999). No grão de milho, o endosperma consiste de uma área translúcida, que é referida como vítrea ou córnea, e por uma área amorfa opaca, caracterizada como macia ou farinácea. A proporção entre as duas regiões varia com o cultivar e determina a textura do grão como dentado ou duro (MORAES et al., 2008; RIBAS et al., 2007).

A degradabilidade ruminal do amido do grão de milho pode ser estimada rigorosamente pela vitreosidade de grãos e rapidamente quantificada pelas características físicas (PHILIPPEAU; LE DESCHAULT de MONREDON; MICHALET-DOREAU, 1999). Assim, as características químicas demonstram o valor nutricional do alimento, mas as características físicas podem influenciar no aproveitamento dos nutrientes.

No endosperma dos grãos, a matriz protéica é vista como barreira físico-química para digestão dos grânulos de amido. Dentre estas proteínas, as prolaminas, conhecidas no milho como zeínas, são as principais causadoras de variações na acessibilidade do amido pelos microrganismos do rúmen, dificultando a sua digestão (GIUBERT; GALLO; MASOERO,

2012; OWENS; ZINN; KIM, 1986; PHILIPPEAU; MICHALET-DOREAU, 1997). As zeínas são proteínas hidrofóbicas primárias, e compreendem 50 a 60% da proteína total no grão de milho (HAMAKER et al., 1995).

Com o avanço da maturidade, a vitreosidade e a ocorrência de prolaminas (zeínas) no grão aumentam, enquanto a disponibilidade de amido diminui (CORREA et al., 2002; MURPHY; DALBY, 1971), portanto, quanto maior a proporção de endosperma vítreo menor é a digestibilidade do amido. A ensilagem de grãos aumenta a degradação ruminal do amido, não somente por ser colhido em estágio fisiológico de menor maturidade, mas também por efeito do ambiente da fermentação no silo. Esse processo de conservação pode aumentar a acessibilidade dos grânulos por microrganismos do rúmen, pois as proteínas prolaminas (zeínas) podem ser degradadas por solubilização e/ou ação das enzimas proteolíticas (DEFOOR; BROWN; OWENS, 2006; HOFFMAN et al., 2011; OWENS; ZINN, 2005; PHILIPPEAU; MICHALET-DOREAU, 1997; PRIGGE, 1976; ROONEY; PFLUGFELDER, 1986).

O armazenamento de grãos de milho na forma de silagem pode ser definido como um ambiente em que, alterações qualitativas e quantitativas podem ocorrer ocasionadas por interações entre os fatores físicos, químicos e biológicos. Dentro deste contexto, torna-se importante estabelecer os efeitos da ensilagem, da maturidade e do genótipo na matriz amido-protéica e no valor nutritivo de silagens de grão de milho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do milho e sua importância

O milho (*Zea mays*), provavelmente originário do México, é um dos cereais mais cultivado e utilizado como alimento humano e animal ao redor do mundo, devido ao seu alto potencial produtivo, propriedades nutritivas e sua diversidade de aplicação. Segundo o Ministério da Agricultura, cerca de 70% da produção mundial de milho é destinada à alimentação animal, podendo este percentual chegar a 85%, em países desenvolvidos. Em termos gerais, apenas 15% de toda a produção mundial destina-se ao consumo humano, de forma direta ou indireta.

Os grãos de milho são, geralmente, amarelos ou brancos, podendo apresentar colorações variando desde o preto até o vermelho. Embora a constituição dos grãos possa mudar de acordo com a variedade; fatores ambientais e tipos de solo, o peso individual do grão é, em média, 250 a 300 mg e sua composição em base seca é 73% de amido, 10% de proteínas, 12% de fibra e 5% de óleo. O grão de milho é formado por quatro principais estruturas físicas: endosperma (82%), gérmen (11%), pericarpo (5%) e ponta (2%), as quais diferem em composição química e também na organização dentro do grão (WATSON, 1994; ZUBER; DARRAH, 1994).

O milho, nas diferentes regiões do mundo, pode apresentar variações na sua qualidade nutricional, proporcionando diferenças na textura do endosperma, o que pode influenciar a digestibilidade dos nutrientes (PEREIRA et al., 2004). Nas últimas décadas, avanços significativos têm sido alcançados na produção de milho com base no melhoramento genético e do maior grau de conhecimento agrônomo da planta, resultante do aprimoramento das técnicas de cultivo e manejo (ZOPOLLATTO, 2007).

2.2 Textura do endosperma

Atualmente, o mercado oferece grande variedade de materiais genéticos, com o intuito de atender as exigências de cada região, de acordo com os fatores ambientais, produtividade, resistência a pragas e doenças, e principalmente o ciclo vegetativo e o tipo de endosperma do grão. A planta de milho apresenta ciclos vegetativos variados, com genótipos extremamente precoces, nos quais a polinização pode ocorrer 30 dias após a emergência, ou então com genótipos cujo ciclo pode atingir 300 dias (ZOPOLLATTO, 2007).

O endosperma representa aproximadamente 83% do peso seco do grão, consistindo principalmente de amido (98%), organizado na forma de grânulos (ECKHOFF; PAULSEN, 1996). O amido é um polissacarídeo composto por polímeros de amilose (20 a 30% do amido) e amilopectina (70 a 80% do grânulo de amido) e possui função de reserva (ROONEY; PFLUGFELDER, 1986; STONE, 1996).

A amilose é um polímero linear com ligações α -1,4 entre as suas unidades de glicose. A amilopectina é um polímero ramificado, com cadeias lineares de D-glicose (α -1,4) e com pontos de ramificações (α -1,6) a cada 20 a 25 moléculas de glicose. As moléculas de amilose e amilopectina são mantidas unidas por pontes de hidrogênio, resultando em grânulos de amido com estrutura altamente organizada (VAN SOEST, 1994). Os grânulos são formados pela deposição de anéis de crescimento que consistem de camadas alternadas de regiões amorfas e cristalinas. As regiões cristalinas são compostas principalmente por amilopectina, enquanto as regiões amorfas são compostas principalmente por amilose (McALLISTER et al., 2006; NOCEK; TAMMINGA, 1991).

O endosperma consiste de uma região translúcida, que é referida como vítrea ou córnea, e por uma região amorfa opaca, caracterizada como macia ou farinácea. A proporção entre as regiões depende, entre outros fatores, do cultivar e determina a textura do grão (RIBAS et al., 2007). Assim, dois grupos genéticos de milho podem ser definidos: dentado e duro. No Brasil, predominam híbridos duros (flint – *Zea mays ssp. Indentura*), enquanto na América do Norte, predominam materiais dentados (dent – *Zea mays ssp. Indentata*) (CORREA et al., 2002).

O milho dentado é assim denominado porque há concentração de endosperma farináceo na região central do grão entre a ponta e o extremo superior e possui amido farináceo e poroso com baixa densidade. Durante o processo de maturação fisiológica da planta, ocorre perda de umidade do grão, o endosperma farináceo e macio reduz o seu volume mais do que as camadas duras no lado do endosperma, assim se origina a indentação, pelo enrugamento do endosperma no topo da semente (BRIEGER; BLUMENSCHIN, 1966; PAES, 2006; PEREIRA et al., 2004). Já no milho duro, a maior quantidade de endosperma vítreo resulta em grãos lisos e mais arredondados com aparência dura e vítrea e baixa concentração de endosperma farináceo (PAES, 2006; PEREIRA et al., 2004).

Philippeau e Michalet-Doreau (1997), trabalhando com grãos de milho, dentado e duro, em diferentes estágios de maturação, observaram que a vitreosidade no estágio maduro correspondeu a 72,3% para o duro e 48,1% para o dentado. A vitreosidade é definida como a proporção de endosperma duro (vítreo) em relação ao endosperma total. Do ponto de vista da

nutrição animal, quanto maior a proporção de endosperma vítreo menor é a digestibilidade do amido presente no grão (CORONA; OWENS; ZINN, 2006; CORREA et al., 2002; PHILIPPEAU; MICHALET-DOREAU, 1997).

Em cultivares com endosperma farináceo, a taxa de desaparecimento é mais rápida comparada com grãos que possuem endosperma vítreo ou duro (KOTARSKI; WANISKA; THURN, 1992). Ao contrário do endosperma farináceo, grânulos de amido no endosperma vítreo são protegidos por uma matriz protéica contínua que contém entidades protéicas e limitam a acessibilidade de amido pelos microrganismos do rúmen (PHILIPPEAU; MICHALET-DOREAU, 1997). O amido no endosperma farináceo é mais susceptível a forças externas, tais como a digestão ou processamento de grãos, já que a matriz protéica é fina e incompleta, com espaços vazios e menor densidade (HUNTINGTON, 1997; PIOVESAN; OLIVEIRA; GEWEHR, 2011).

Figura 1 - Relação entre vitreosidade do grão e disponibilidade ruminal do amido *in situ* avaliado em híbridos norte-americanos (◆) e três híbridos brasileiros (●). Disponibilidade = $108,2 - 0,7605 \times \text{Vitreosidade}$. $R^2 = 0,87$. Disponibilidade (% do amido) = $A + B [kd/(kd + kp)]$, assumindo $kp = 0,08/h$. Adaptado de Correa et al. (2002)

Correa et al. (2002), trabalhando com híbridos brasileiros (flint) e comparando com híbridos de milho dentado cultivados nos Estados Unidos (Figura 1), constataram que a vitreosidade dos híbridos brasileiros variou de 64,2% a 80,0% no estágio maduro, com média de 73,1%. Já os híbridos norte-americanos, a vitreosidade ficou entre 34,9% a 62,3%, com média de 48,2%. Estes autores ainda concluem que com o avanço da maturidade, a vitreosidade e a densidade do grão aumentam, enquanto a disponibilidade de amido diminui, todavia, a densidade pode ser uma medida prática de vitreosidade. A diferença de densidade entre os tipos dentado e duro poderia ser explicada não só pela diferença na composição bioquímica, mas também por diferenças na quantidade de espaços dentro do endosperma e,

conseqüentemente, sua proporção farinácea (PHILIPPEAU; LE DESCHAULT; MICHALET-DOREAU, 1999; WATSON, 1994).

A seleção de cultivares é uma das formas de manipular o potencial de degradação do amido (JURJANZ; MONTEILS, 2005). A estrutura e a composição de amido no grão de milho e suas interações com proteínas desempenham um papel importante na digestibilidade e valor nutritivo para ruminantes, sendo a estrutura das proteínas responsável pelo tipo de textura do endosperma (PHILIPPEAU; MICHALET-DOREAU, 1997; ROONEY; PFLUGFELDER, 1986).

2.3 Maturidade

A maturidade fisiológica é caracterizada pela interrupção da translocação de nutrientes da planta para os grãos por meio do pedículo e ocorre a formação da camada preta no grão. Normalmente, isto ocorre cerca de 50 dias após a polinização, quando o grão atinge entre 36 e 40% de umidade, dependendo do híbrido, clima e outros fatores relacionados ao desenvolvimento da cultura (JOBIM; BRANCO; SANTOS, 2003; LAZZARI; LAZZARI, 2001). Assim, os nutrientes são armazenados no grão, primeiramente como açúcares e, posteriormente, como amido. Nessa fase, há aumento no teor de matéria seca da planta, evoluindo entre 20% no florescimento para mais de 40% quando atinge a maturidade plena (JOBIM; BRANCO; SANTOS, 2003; WILKINSON; NEWMAN; ALLEN, 1998).

Um dos principais fatores que pode influenciar a composição química e a qualidade da silagem de grãos é a umidade. Portanto, grãos úmidos para ensilagem, colhidos no ponto ideal, apresentam entre 25 a 35 % de umidade. O milho muito seco ou muito úmido está propenso à rápida deterioração quando retirado do silo ou mesmo durante a armazenagem, caso a fermentação seja insatisfatória (JOBIM; REIS; RODRIGUES, 1997). Deste modo, o teor de umidade pode afetar os produtos da fermentação, o teor e a digestibilidade do amido e a estabilidade aeróbia (ALLEN; OBA; CHOI, 1997). Bal, Coors e Shaver (1997) avaliaram plantas de milho colhidas no ponto de maturidade fisiológica e observaram reduções de 4,5 unidades percentuais na digestibilidade do amido em relação ao estágio de 2/3 da linha do leite.

Pereira et al. (2004), avaliaram os efeitos de textura (vitreosidade) e estágio de maturidade sobre a degradabilidade ruminal de grãos de milho. Dois híbridos dentados e dois híbridos duros foram colhidos nos estádios: dentado inicial, metade da linha do leite e linha

preta, a proporção de endosperma vítreo foi de 38,2; 46,9 e 47,9% para híbridos dentados e 59,9; 67 e 72,4% para híbridos duros, respectivamente. A degradação ruminal da matéria seca em 24 horas foi 63,3% nos grãos dentados e 52,4% nos duros. O resíduo após 72 horas de incubação de híbridos dentados e duros foram 7,6% e 15,6%, respectivamente. A degradabilidade ruminal foi similar nos estádios dentado inicial e metade da linha do leite. O efeito da textura sobre a degradabilidade ruminal foi acentuado no estádio linha preta. Pereira et al. (2004), ressaltaram ainda que a utilização de híbridos dentados, comparativamente a híbridos duros, pode resultar em menor queda relativa na digestão ruminal do amido em situações de colheita tardia dos grãos.

2.4 Proteínas de reserva

Os grãos de milho apresentam em média 9-11% de proteínas, sendo que 70 a 90% são consideradas proteínas de reserva. As proteínas do grão de milho podem ser classificadas em quatro frações: albumina, globulina, glutelina e prolamina (zeína) (LANDRY; MOUREAUX, 1970). Segundo Landry et al. (2005), albuminas representam 3-5% da proteína total, globulinas: 10-20% da proteína total, glutelinas: 35-45% da proteína total, e as zeínas com 60 a 70% do conteúdo total de proteína dos grãos maduros. Forato (2000) afirma que 20% são proteínas solúveis em água (albumina e globulina), 40% são solúveis em álcool (prolaminas) e 40% são insolúveis em água e álcool (glutelina).

As albuminas e as globulinas se localizam principalmente no embrião e nas células de aleurona que envolve o endosperma, possuem funções metabólicas e estruturais, são também chamadas de proteínas citoplasmáticas formadas por uma série de proteínas com alto teor de lisina (RIZZI, 2013). Embora as glutelinas se localizem no endosperma e apresentem estruturas semelhantes às proteínas prolaminas, elas formam polímeros de elevado peso molecular estabilizados por ponte de dissulfeto inter-cadeias e não são solúveis em álcool (SHEWRY; TATHAM, 1990).

As proteínas prolaminas estão localizadas principalmente no endosperma, possuem grande quantidade de prolina e aminas, e sua principal função é fornecer nitrogênio durante a germinação e estágios primários de crescimento das plântulas (HERMAN; LARKINS, 1999). A matriz amido-protéica do milho é vista como uma barreira físico-química para a digestão do amido em animais ruminantes (OWENS; ZINN; KIM, 1986). As prolaminas são proteínas hidrofóbicas primárias na matriz amido-protéica e são as causas das variações de acessibilidade do amido pelos microrganismos do rúmen, dificultando a sua digestão

(GIUBERT; GALLO; MASOREO, 2012; OWENS; ZINN; KIM, 1986; PHILIPPEAU; CHAMPION; MICHALET-DOREAU, 1996).

As zeínas (prolaminas) são classificadas de formas distintas de acordo com a estrutura primária e solubilidade em etanol 70% (ADAM et al., 2004; SHEWRY; HALFORD, 2002): α -zeína (19 e 22 kDa) codificada por uma família multigênica, representa aproximadamente 60% das zeínas; β -zeína (15 kDa) codificada por um gene, constitui cerca de 5 a 10% das zeínas; γ -zeína (16, 27 e 50 kDa) codificada por três genes, representa cerca de 25% das zeínas e δ -zeína (10 e 18 kDa) codificada por dois genes, representa cerca de 5% das zeínas.

O grão de milho úmido é colhido no estágio fisiológico de “linha negra”, anterior ao milho seco, tendo em vista que o aumento da proteína zeína ocorre com o avanço da maturidade (MURPHY; DALBY, 1971). Grânulos de amido de milho são encapsulados por proteínas zeínas, que são insolúveis em água ou em fluído ruminal (LARSON; HOFFMAN, 2008; PHILIPPEAU; MICHALET-DOREAU, 1997), mas são solúveis em ácido, e durante a fermentação no processo de ensilagem, estas proteínas poderiam sofrer proteólise na matriz amido-protéica (BARON, STEVENSON; BUCHANAN-SMITH, 1986; HOFFMAN et al., 2011; LAWTON, 2002).

2.5 Silagem de grão úmido

Com a finalidade de melhorar o aproveitamento do grão de milho pelos ruminantes, o milho pode ser processado de diversas formas: moagem grosseira, laminação a seco, moagem fina, extrusão, floculação a vapor ou ensilagem na forma de grão úmido (HALE, 1973). Dentre os tipos de processamento, o interesse pela ensilagem de grãos de milho com umidade entre 25% a 35% é crescente, ou seja, os grãos são colhidos logo após a maturação fisiológica do grão (MADER; GUYER; STOCK, 1983; POPINIGIS, 1977).

A ensilagem de grãos úmidos de milho deve ser considerada como estratégia para uso deste cereal em dietas de ruminantes. Apesar do milho em grão ser largamente utilizado na alimentação de ruminantes, o uso de grãos úmidos ou reconstituídos ensilados é pouco empregado no Brasil, sendo uma tecnologia em expansão (REIS et al., 2001).

Conservar grãos de milho na forma de silagem pode ser uma estratégia vantajosa e economicamente viável, pois aumenta a digestibilidade do amido, resultando em melhor desempenho animal e menor perda de nutrientes. As vantagens zootécnicas e econômicas são: baixo investimento para armazenagem; antecipação da colheita em três a quatro semanas, o que possibilita a liberação da área para outras culturas; redução da contaminação e perdas no

campo (acamamento, insetos e fungos), e durante o processo de colheita, menores perdas qualitativas e quantitativas dos grãos armazenados secos, devido ao ataque de pragas no armazenamento e sua principal vantagem está relacionada com a digestibilidade de amido e também redução de custos em relação ao milho seco (COSTA et al., 2002; JOBIM; REIS, 2001; MADER; RUST, 2006; OWENS; SODERLUND, 2007; OWENS; ZINN, 2005).

Durante o processo de ensilagem, a umidade propicia a ocorrência de fermentação, com proteólise da matriz protéica, resultando em maior digestibilidade de nutrientes que, conseqüentemente, pode aumentar o desempenho ou a eficiência alimentar (GOODRICH, BYERS; MEISKE, 1975; HENRIQUE et al., 2007). Philippeau e Michalet-Doreau (1997) relataram que a ensilagem de grãos aumenta a degradação ruminal de amido e que esse processo de conservação poderia aumentar a acessibilidade de grânulos de amido por microrganismos do rúmen, uma vez que as proteínas hidrofóbicas são parcialmente degradadas.

Reis et al. (2001), avaliaram o uso de grãos de milho em diferentes formas (grãos de milho seco, silagem de grãos de milho reidratado e silagem de grãos de milho úmido) sobre o desempenho de cordeiros terminados em confinamento e constataram que dieta com substituição total dos grãos de milho seco por silagem de grãos de milho úmido apresentou maior ganho de peso aos 73 dias em relação aqueles obtidos aos 28 e 56 dias de confinamento. Os autores ainda afirmaram que este fato pode ser explicado pela melhor digestibilidade apresentada pelas silagens e que silagem de grão úmido pode ser usada com eficácia em dietas para cordeiros.

Hoffman et al. (2011) trabalharam com dois cultivares de milho contendo 25,7% e 29,3% de umidade, os grãos foram ensilados e estocados por 0, 15, 30, 60, 120 e 240 dias. A silagem de grão úmido foi inoculada com ou sem 600,000 ufc/g de *Lactobacillus buchneri*, numa tentativa de alterar o perfil de fermentação. A partir dos resultados os autores concluíram que as proteínas hidrofóbicas (zeínas) da matriz amido-protéica são degradadas pela atividade proteolítica, ao contrário da hipótese inicial estabelecida com base na solubilização ácida. No período de armazenamento (0 versus 240 dias) houve redução de 10 para 40% das subunidades de prolaminas (zeínas) α , β e δ . A degradação da subunidade γ na matriz amido-protéica foi proeminente (60% de redução). As proteínas zeínas γ e β são as principais responsáveis por ligações cruzadas dos grânulos de amido, que dificultam a digestão do amido. Informações detalhadas sobre o destino das proteínas hidrofóbicas, que impedem a digestão do amido em ruminantes durante o processo de ensilagem de milho com

alta umidade, são praticamente desconhecidas (BARON; STEVENSON; BUCHANAN-SMITH, 1986; HOFFMAN et al., 2011).

Philippeau e Michalet-Doreau (1997), trabalhando com genótipos e estágios de maturação de milho na degradação ruminal *in situ* de amido, relataram que a degradabilidade ruminal de amido de grãos de milho foi maior para o milho dentado do que para o tipo duro. No entanto, estes autores ainda afirmam que mais estudos são necessários para examinar se as diferenças na degradabilidade ruminal de amido entre os grãos persistem após o processo de ensilagem. Philippeau e Michalet-Doreau (1998), avaliando a influência de genótipo e silagem de grãos de milho na degradabilidade ruminal *in situ* de amido, constaram que quando grãos de milho são colhidos na metade da linha do leite, a degradabilidade ruminal de amido encontrada antes ou após o processo de ensilagem, foi maior para o milho dentado em relação ao milho duro. Estes autores ainda concluem que a ensilagem induz ao aumento da degradabilidade ruminal *in situ* de amido, e o grau desse aumento foi o mesmo, independentemente do genótipo estudado.

Portanto, a possibilidade de conhecer o comportamento de híbridos de milho para produção de silagem de grão, com base nas características físicas, matriz protéica, degradabilidade e perfil fermentativo, permitirá avaliar se essas diferenças influenciam o processo de ensilagem e a qualidade nutricional deste alimento para ruminantes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) em Pindorama – SP. A cidade de Pindorama está localizada na latitude 21° 11' 12'' Sul e longitude 48° 54' 34'' Oeste, com altitude de 542 metros. O clima da região é Aw (clima tropical com estação seca) segundo classificação de Köppen-Geiger.

A semeadura do milho ocorreu no dia 22 de novembro de 2011, o ensaio foi instalado utilizando semeadora adubadora de 4 linhas, utilizando-se croquis da gleba, delimitou-se o comprimento das parcelas com trenas e barbantes de algodão e foi usado na semeadura matraca “bengala” (matraca especial para ensaio). Todas as sementes foram tratadas com inseticida CropStar (Thiodicarb + Imidacloprid) contra pragas de solo. Foram utilizados 30 kg/ha de nitrogênio (N) e 65 kg/ha de óxido de potássio (K₂O) no momento da semeadura, e duas adubações de cobertura, sendo a primeira com 300 kg/ha da fórmula NPK 20-0-20 (até o estágio de 4/6 folhas, aproximadamente 21 dias após a semeadura) e a segunda com 40 kg/ha de N na forma de sulfato de amônio (até o estágio de 8 folhas, aproximadamente 35 dias após a semeadura).

Entre 15 e 30 dias após o plantio, foram retiradas as plantas em excesso de cada linha (desbaste), já que inicialmente a cada 20 cm foi realizada uma cova de milho com 1 a 2 sementes, após o desbaste foi deixado em cada cova apenas uma planta para obter a população desejada. Nos locais onde houve falha, ou seja, não nasceu nenhuma semente na cova, a cova anterior ou posterior à falha foi deixada com duas plantas para compensar a cova sem planta. O estande inicial do milho foi de 25 plantas em 5,0 m (80 cm de espaçamento), correspondendo à população média de 62.500 plantas por hectare. Realizou-se capina na fase do florescimento para facilitar protocolos e a colheita do ensaio, controle de plantas daninhas com herbicidas específicos e controle da lagarta-do-cartucho, por meio de pulverizador costal.

O delineamento experimental foi blocos ao acaso, com esquema fatorial 2×3×5: dois genótipos (duro ou dentado), três pontos de maturação (ponto de ensilagem de planta inteira, ponto de grão úmido e ponto de grão seco) e cinco tempos de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias), com 4 repetições. A parcela experimental foi constituída de seis linhas (duas linhas para ponto planta inteira, duas linhas para grão úmido e duas linhas para grão seco) de 5 m espaçadas de 80 cm entre linhas (Figura 2). As colheitas foram definidas de acordo com o teor de matéria seca (MS) da planta ou do grão, sendo os seguintes pontos de corte:

- planta inteira (PI) com 30 a 35% MS na planta;
- grão úmido (GU) com 28 a 33% de umidade no grão;
- grão seco (GS) com 15 a 20% de umidade no grão.

Para determinação do momento exato da colheita dos grãos no ponto de “PI” foram realizados os seguintes procedimentos: avaliação da linha do leite dos grãos e determinação da MS da PI em forno micro-ondas (SOUZA; NOGUEIRA; RASSINI, 2002). Para colheita dos grãos no ponto de GU foi utilizado equipamento de determinação de umidade de grãos portátil e determinação da MS do grão em forno micro-ondas. O mesmo procedimento foi realizado para colheita do GS.

Figura 2 - Representação da parcela experimental constituída de seis linhas para colheita de grãos nos pontos de maturação: PI, GU e GS

Os tratamentos foram constituídos por híbridos de milho AG 1051 (híbrido duplo, convencional, ciclo semiprecoce e dentado) e IAC 8390 (híbrido intervarietal, convencional, ciclo normal e duro). Do total de plantas colhidas por parcela, no ponto de maturação “PI” (aproximadamente 54 plantas), 16 plantas foram utilizadas para avaliações agronômicas e bromatológicas e nas 27 plantas restantes foram colhidas espigas para a debulha manual do grão. Nos pontos de maturação de GU e GS foram colhidas apenas as espigas para debulha manual do grão.

Para preparo das silagens, os grãos de milho colhidos em cada ponto de maturação, foram moídos em picador estacionário, com peneira de 12 mm. Como silos experimentais

foram utilizados mini bags com dimensões 22×35 cm; 0,18 mm de espessura e 3 soldas, selados à vácuo. Os mini bags foram pesados no momento da ensilagem e após a abertura para estimativa de perdas de MS. Os grãos de milho colhidos nos pontos ‘silagem de PI’ e ‘silagem de GU’ foram ensilados com umidade original. Os grãos secos, colhidos com 15 a 20% de umidade, foram reconstituídos com água destilada até atingir 30 a 33% de umidade. As médias dos teores de umidade dos híbridos avaliados estão apresentadas na Tabela 1.

Antes do processo de ensilagem, os grãos de milho nos diferentes pontos de maturação foram amostrados para realização das características físicas. No momento da ensilagem e após a abertura dos mini bags, 4 sub amostras foram coletadas e mantidas à -20 °C para caracterizações físicas, fermentativas, quantificação de proteínas prolaminas (zeínas) e degradabilidade *in situ*. As amostras foram transportadas segundo recomendação do produtor e processadas na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP – Piracicaba, SP.

Tabela 1 - Média dos teores de umidade (%) de grãos de híbridos de milho (IAC 8390 e AG 1051) em diferentes pontos de maturidade

Híbrido	Planta inteira ¹	Grão úmido	Grão seco reconstituído ²
IAC 8390	45,22	28,87	32,09
AG 1051	49,37	32,95	31,11

¹Os teores de MS das plantas no ponto ‘PI’ foram 33,6% (IAC 8390) e 31,5% (AG 1051)

²Os teores de umidade dos grãos secos antes da reconstituição foram 16,96% (IAC 8390) e 20,30% (AG 1051)

3.1 Avaliações agronômicas e bromatológicas

Previamente à realização do corte das plantas de milho (5 cm do solo), foi contado o número total de plantas, plantas quebradas e acamadas, em duas linhas por parcela, correspondentes ao primeiro ponto de maturação a ser avaliado (PI). Após o corte, do total de plantas colhidas nas duas linhas (aproximadamente 54 plantas) da parcela, foram separadas aleatoriamente cinco plantas por linha, totalizando dez plantas por parcela, para avaliação das características morfológicas: altura da planta (correspondente à altura até a inserção da última folha); altura da primeira espiga (correspondente à altura da primeira espiga formada); contagem do número de folhas verdes (folhas com no máximo 50% de senescência) e folhas secas.

Essas plantas foram fracionadas manualmente (sabugo, grão, brácteas e colmo+bainha+pendão) e pesadas para determinação de massa verde. As frações sabugo+grão, brácteas e colmo foram pesadas separadamente e trituradas em picador

estacionário para homogeneização do material. As amostras (aproximadamente 500g) foram acondicionadas em sacos de papel, pesadas e desidratadas em estufa de ventilação forçada a 55°C, por cerca de 72 horas para determinação do teor de MS.

Para análise bromatológica descritiva da planta inteira no ponto de maturação 'PI', foram coletadas aleatoriamente três plantas por linha, totalizando seis plantas por parcela e trituradas em picador estacionário. Foram coletadas amostras de aproximadamente 500g, acondicionadas em sacos de papel, pesadas e levadas para estufas de ventilação forçada a 55 °C, por cerca de 72 horas para determinação do teor de MS. As amostras foram moídas em moinho tipo Willey com peneira de malha 1 mm, acondicionadas em potes plásticos e identificadas.

Com base nos dados obtidos, as seguintes variáveis foram estimadas: produção de massa verde da planta por área (kg MV/ha), produção de MS da planta por área (kg MS/ha), produção de grãos com base na matéria seca por área (kg MS/ha), teor de MS da planta, das folhas, do grão, da espiga, do colmo, das brácteas e participação expressa em porcentagem de folhas, grãos, espiga, colmo, brácteas.

Tabela 2 - Parâmetros agrônômicos de plantas de milho (IAC 8390 e AG 1051) colhidas no ponto de ensilagem de planta inteira

Item	IAC 8390	AG 1051
Produção de MV da planta, kg/há	48535	54557
Produção de MS da planta, kg/há	17820	19097
Produção de grãos, kg MS/há	6628	5891
População de plantas, /há	59385	51060
Altura da planta, cm	200,25	225,25
Altura da primeira espiga, cm	91,75	124,50
MS planta, %	33,6	31,5
MS folhas, %	31,7	37,2
MS do grão, %	54,7	45,4
MS da espiga, %	44,4	39,1
MS do colmo, %	30,4	28,2
MS brácteas, %	30,5	29,3
Proporção de folhas, % MS	19,2	26,2
Proporção de grãos, % MS	36,2	31,2
Proporção de espiga, % MS	57,4	47,7
Proporção de colmo, % MS	23,2	25,9
Proporção de brácteas, % MS	14,3	12,8

A determinação da composição bromatológica da planta inteira, foi realizada utilizando-se o método de espectroscopia de reflectância de infravermelho proximal (NIRS) (BERZAGHI; COZZI; ANDRIGHETTO, 1997; COZZOLINO; ACOSTA; GARCIA, 2001). O material moído foi escaneado para obtenção dos espectros em espectrômetro modelo NIRS 5000 (NIRSystems®, Silver Spring, MD, USA) acoplado a microcomputador equipado com software WinISI II versão 6.2 (Intrasoft International, PA). As amostras escaneadas geraram as seguintes variáveis: proteína bruta, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, celulose, hemicelulose, extrato etéreo e amido.

Tabela 3 - Composição bromatológica de plantas de milho (IAC 8390 e AG 1051) colhidas no ponto de ensilagem de planta inteira

Item	IAC 8390	AG 1051
Proteína bruta, %MS	7,68	7,56
Fibra em detergente neutro, %MS	52,91	55,94
Fibra em detergente ácido, %MS	26,31	28,53
Celulose, %MS	24,79	26,33
Hemicelulose, %MS	30,06	31,16
Extrato etéreo, %MS	1,95	1,97
Amido, % MS	23,42	22,29

3.2 Características físicas

Na primeira sub amostra de grãos, dentado e duro, coletada antes do processo de ensilagem, nas amostras obtidas em cada ponto de maturação e na primeira sub amostra da massa ensilada congelada a - 20° C foram realizadas as seguintes análises: Condutividade elétrica (CE), por meio de um condutivímetro portátil (4301 - Lutron®), segundo metodologia de Kraus et al. (1997). Amostras de 25 gramas de silagem foram homogeneizadas com 300 mL de água deionizada, na temperatura de 25°C. A mistura foi agitada por um minuto, filtrada e medida a CE (mS/cm). Essa análise foi realizada para todos os tempos de abertura. A densidade de partícula (g/cm³), segundo metodologia de Danielson e Sutherland (1986), foi obtida nas amostras de grãos ensiladas (tempo 0 de armazenamento), pelo método do picnômetro a gás hélio, (ACCUPYC 1330, Micrometrics Instruments Corporation®).

Seguindo a metodologia de Berquist e Thompson (1992), avaliou-se a proporção de grão boiantes, também chamado de flotação (% de grãos boiantes). A análise consiste em preparar uma solução de nitrato de sódio 31,3° Baumé, que corresponde à densidade específica de 1,275 g/mL. Adicionou-se aproximadamente 175g de nitrato de sódio (NaNO₃)

em 250 ml de água destilada. A densidade da solução foi monitorada a cada 30 minutos para manter a densidade específica correta. Foram contados 50 grãos de amostra de milho e colocados em um bquer de 400 mL contendo a solução. A solução foi agitada por 30 segundos. O número de grãos boiantes foi contado na sequência. A capacidade de retenção de água (CRA) da massa ensilada foi estimada em todos os tempos de abertura, segundo metodologia descrita por Robertson e Eastwood (1981) adaptado por Giger-Reverdin (2000). Uma massa de 2,5 g de amostra foi deixada em repouso durante 16 ± 24 h em 250 ml de água destilada, de modo que a água estivesse em excesso. A amostra foi então filtrada por meio de um cadinho de vidro sinterizado (porosidade 2) e as paredes do copo foram cuidadosamente lavadas. A amostra molhada foi pesada após deixar decantar a água durante 10 minutos.

Para determinação da solubilidade da MS realizada no momento da ensilagem (tempo 0), a amostra filtrada, recolhida após passagem através do filtro, foi seca em estufa a 105 °C durante 72 horas, pesadas, e, subsequentemente, calcinadas a 550 °C, durante a noite e posteriormente, pesadas (GIGER-REVERDIN, 2000). Para determinação do tamanho médio de partícula (TMP), amostras coletadas no momento da ensilagem (tempo 0), foram homogeneizadas e passadas por peneiras das seguintes malhas: 8; 4,76; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,106 mm. As peneiras foram agitadas manualmente e pesadas para determinação da quantidade retida em cada peneira (ZANOTTO; BELLAYER, 1996). A vitreosidade foi realizada por dissecação manual do grão, segundo Dombrink-Kurtzman e Bietz (1993). Os grãos foram imersos em água por três minutos e em seguida retirou-se o pericarpo e o gérmen. Esse material ficou de 12 a 24 horas em estufa a 55 °C, para retirada do endosperma farináceo (PEREIRA et al., 2004).

3.3 Composição química e perfil fermentativo

Na segunda sub amostra coletada antes do processo de ensilagem foi determinado o pH. Para tanto, realizou-se a confecção do extrato aquoso, adicionando-se 25g de amostra em 225 mL de água destilada e homogeneização em liquidificador por um minuto. Análises de fibra em detergente neutro (FDN) segundo metodologia de Van Soest, Robertson e Lewis (1991) e extrato etéreo (EE) segundo a Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1990), foram realizadas apenas no momento da ensilagem (tempo 0) para caracterização dos grãos.

Depois de decorridos os tempos de armazenamento, os mini bags foram abertos e coletadas amostras para determinação do teor de matéria seca (MS) a 55 °C. Na segunda sub

amostra, após abertura, o extrato aquoso foi obtido para determinação de pH e produtos de fermentação. A concentração de ácido láctico foi determinada por método colorimétrico (PRYCE, 1969), onde as leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro MARCONI® Janway 6305, com $\lambda=565$ nm. Os teores de álcoois, ésteres, ácidos graxos voláteis e acetona foram determinados em cromatógrafo gasoso com detector de massas (GC-MS) (GCMS QP 2010 plus, Shimadzu®, Kyoto, Japan), usando coluna capilar (Stabilwax, Restek®, Bellefonte, USA; 60 m, 0,25 mm ϕ , 0,25 μ m crossbond carbowax polyethylene glycol) e parâmetros analíticos conforme as recomendações do fabricante. O nitrogênio amoniacal (N-NH₃) foi determinado por colorimetria, com base na metodologia descrita por Chaney e Marbach (1962), utilizou-se o extrato aquoso da silagem para sua determinação. Esta metodologia tem por base a reação da amônia presente nas amostras com soluções de hipoclorito e fenol, utilizou-se como catalisador o nitroprussiato diidratado, levando à formação de indofenol. A leitura das amostras foi realizada em leitor de microplacas Asys® Expert Plus a 550 nm.

O teor de carboidratos solúveis (CHO_{sol}) foi determinado em extrato alcoólico, pelo método Fenol-Sulfúrico (HALL, 2000). Para a obtenção do extrato foi pesado 0,5 g de amostra seca e moída em peneira com orifício de 1,0 mm, em balões do tipo *Erlenmeyer* e adicionou-se 100 mL de solução alcoólica (solução etanol 80%). As bocas dos balões foram vedadas e em seguida os mesmos foram submetidos à agitação durante 4h. Após o período de agitação os extratos foram filtrados em papel Whatman N° 541 e armazenados em tubos do tipo *Eppendorf*® de 2,0 mL a -20°C. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro MARCONI® Janway 6305, com $\lambda=490$ nm. A proteína solúvel (PB solúvel) foi determinada por meio de solução borato-fosfato, para tanto, pesou-se 0,5 g de amostra com 5 mL de solução de álcool butílico terciário (10%) e 25 mL de solução borato fosfato em becker de 100 mL e deixado por 1 hora a 39 °C em repouso, em seguida, foi filtrado em papel Whatman 541 (KRISHNAMOORTHY et al., 1982). A concentração de proteína bruta do resíduo para determinação da PB solúvel e a PB da amostra foi determinada de acordo com os métodos descritos por Wiles, Gray e Kissling (1998), por meio da combustão das amostras segundo o método de Dumas, utilizando auto-analisador de nitrogênio, marca LECO modelo FP-528.

3.4 Extração e quantificação de proteínas prolaminas (zeínas)

A terceira sub amostra coletada no momento da ensilagem (tempo 0) e após abertura dos mini bags (7, 21, 60 e 120 dias), nos diferentes pontos de maturação, foram secas a 55 °C, moídas em moinho tipo Willey com peneira de malha 1 mm para determinação de proteínas prolaminas, de acordo com Nellis, Hoffman e Shaver (2013). Primeiramente, obteve-se a matéria seca insolúvel em tampão (MSit), para tanto, 500 mg de cada amostra foi acondicionada em potes plásticos com tampa e adicionado uma solução de tampão borato fosfato e colocado em banho-maria a 39 °C por 1 hora. O conteúdo foi filtrado em papel de filtro Whatman N° 541 e seco em estufa a 55°C por 24 horas. Em seguida, uma sub amostra de 200 mg da MSit foi pesada dentro de tubos para centrifuga e uma solução aquosa de álcool, composta por álcool butílico terciário e mercaptoetanol, foi adicionada e o tubo foi submetido a agitação por 4 horas. Após centrifugar as amostras, 50 microlitros do sobrenadante de cada amostra foram pipetados dentro de cuvetas, 2,5 mL de reagente Bradford foi adicionado (BRADFORD, 1976), e as amostras foram cobertas e deixadas em temperatura ambiente por 5 minutos. A absorbância de cada amostra foi mensurada a 595 nm e utilizou-se como curva padrão zeína purificada.

3.5 Degradabilidade *in situ*

A quarta sub amostra foi utilizada para determinação da degradabilidade *in situ* da MS e de amido nas silagens. As amostras foram secas a 55 °C por 72 horas e foram incubadas com tamanho de partícula original. Todos os tratamentos (5 g por amostra) foram acondicionados em sacos de náilon (20 cm × 10 cm) com porosidade de 30µm e incubados no rúmen de três vacas mestiças recebendo dieta (% MS) *ad libitum* de silagem de milho (38%), feno (10%), farelo de soja (20,7%), mineral (2%), polpa citrica (11,5%) e milho moído (17,3%). Os tempos de incubação foram de 12 e 24 horas. Os sacos foram incubados de forma reversa aos tempos e retirados de uma só vez. Imediatamente após sua remoção do rúmen, os sacos de tempo 0 foram lavados com os sacos incubados durante o mesmo ciclo da máquina de lavar (CHERNEY; PATTERSON; LEMENAGER, 1990), e utilizados para estimar a fração A. Após a lavagem, os sacos foram secos em estufa a 55 °C por 72 horas. Após secagem, as amostras foram moídas em moinho tipo Willey a 1 mm. Posteriormente, foi determinado o resíduo da MS e amido.

O teor de amido foi avaliado por hidrólise enzimática e a determinação da glicose resultante, analisada por espectrometria com leitura de 505 nm (HALL, 2009). Em tubos de 50 mL foi pesado 2 mg de amostra e adicionada solução tampão de acetato de sódio e 300 µL de α -amilase termo-estável Novozymes (Termamyl, 2X). Os tubos foram deixados em estufa por 1 h a 105 °C. Após, foi adicionado 500 µL da enzima amiloglucosidase (300U/mL – *Aspergillus niger*, Novozymes (Sigma® A7095, 50mL) e os tubos incubados por 2 horas a 50 °C. As amostras foram diluídas na proporção 1:1 (500 µL de amostra digerida + 500 µL de água destilada). A leitura da concentração de glicose resultante da hidrólise enzimática do amido foi realizada em espectrofotômetro a 505 nm, utilizou-se a kit Doles® (método glicose oxidase).

3.6 Análises estatísticas

Os dados foram analisados pelo procedimento MIXED do SAS, utilizando-se o seguinte modelo:

$$y = \mu + B_i + H_j + BH_{ij} + M_k + HM_{jk} + BM(H)_{ik(j)} + A_l + HA_{jl} + MA_{kl} + HMA_{jkl} + \varepsilon_{ijkl};$$

onde:

μ : média geral;

B_i : efeito aleatório de bloco ($i = 1$ a 4);

H_j : efeito fixo de híbrido ($j = \text{IAC 8390 ou AG 1051}$);

BH_{ij} : termo de erro para testar efeito de híbrido;

M_k : efeito fixo de maturidade ($k = \text{PI, GU ou GSR}$);

HM_{jk} : interação entre híbrido e maturidade;

$BM(H)_{ik(j)}$: termo de erro para testar efeito de maturidade e interação entre híbrido e maturidade;

A_l : efeito de tempo de armazenamento ($l = 0, 7, 21, 60$ ou 120 dias);

HA_{jl} : interação entre híbrido e tempo de armazenamento;

MA_{kl} : interação entre maturidade e tempo de armazenamento

HMA_{jkl} : interação entre híbrido, maturidade e tempo de armazenamento;

ε_{ijkl} : resíduo.

Medidas realizadas no momento da colheita foram analisadas com modelo incluindo efeito fixo de híbrido e efeito aleatório de bloco. A degradabilidade ruminal de amido foi modelada considerando cinco regressões não-lineares, utilizando-se o procedimento

NLMIXED do SAS: 1) exponencial, 2) logístico, 3) *Broken-line* com primeiro segmento linear, seguido de platô (linear, platô); 4) *Broken-line* com primeiro segmento linear, seguido de segmento linear (linear, linear); e 5) *Broken-line* com primeiro segmento quadrático, seguido de segmento linear (quadrática, linear). Os ajustes dos modelos foram comparados considerando o R^2 - ajustado, (quanto maior melhor), a raiz quadrada do quadrado médio do erro (quanto menor melhor) e o critério de informação de Akaike (quanto menor melhor). Correlações entre degradabilidade de amido e as concentrações de prolamina, amônia e proteína solúvel foram estabelecidas com o procedimento REG do SAS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterizações do grão e da amostra fresca

As características físicas de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) estão apresentadas na Tabela 4. Como esperado, o teor de MS dos grãos aumentou com o avançar da maturidade da cultura. Apesar da pequena variação, o teor de MS do híbrido duro apresentou-se superior ao do híbrido dentado em todos os pontos de colheita, provavelmente pela maior taxa de perda de água apresentada por este genótipo.

O índice de flotação estima a densidade relativa dos grãos e é uma medida indireta de dureza. Como esperado, a flotação (% de grãos boiantes) foi superior para o híbrido dentado, que não apresentou alterações durante a maturação. Ao contrário, o híbrido duro apresentou menor proporção de grãos boiantes, e esta proporção foi diminuída conforme o avanço da maturidade. Isso indica que a vitreosidade pode ter aumentado, com a maturidade, especialmente no híbrido duro, conforme descrito por Correa et al. (2002).

Em relação ao peso de 100 sementes, não houve diferença entre os híbridos nos pontos PI e GS. Já no ponto GU, o grão dentado (AG 1051) mostrou-se superior, devido ao depósito de MS ser mais rápido nessa fase (0,705 g/d para 100 sementes) em relação ao híbrido IAC 8390 (0,560 g/d para 100 sementes). Após o ponto de maturidade GU, o híbrido dentado manteve seu peso enquanto o híbrido duro continuou o depósito de MS (0,170 g/d para 100 sementes).

Tabela 4 - Características físicas de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) colhidos ao longo da maturidade (PI, GU e GS)

Item	IAC8390			AG 1051			EPM ⁴	P		
	PI ¹	GU ²	GS ³	PI	GU	GS		H ⁵	M ⁶	H×M
Matéria seca, %	54,78 ^d	71,14 ^b	83,04 ^a	45,43 ^c	67,05 ^c	79,69 ^a	0,72	<0,01	<0,01	<0,01
Flotação, %	98,5 ^a	92,50 ^b	58,50 ^c	100 ^a	97,5 ^a	100 ^a	1,02	<0,01	<0,01	<0,01
Peso 100 grãos, g	19,75 ^c	27,59 ^b	32,71 ^a	17,71 ^c	32,74 ^a	31,99 ^a	0,88	0,36	<0,01	<0,01
Vitreosidade, %	59,04 ^b	58,11 ^b	79,20 ^a	25,38 ^c	57,82 ^b	59,15 ^b	3,17	<0,01	<0,01	<0,01

¹Planta inteira; ²Grão úmido; ³Grão seco; ⁴Erro padrão da média; ⁵Híbrido; ⁶M: maturidade

A vitreosidade foi superior no híbrido duro no estágio de GS, valores estes que corroboram com os resultados apresentados por Correa et al. (2002), que encontraram média de 73,1% de vitreosidade em híbridos duros. Cantarelli (2003) observou valores de vitreosidade de 75,9% para grão seco duro e 57,2% para grão seco dentado. No híbrido dentado, a proporção de endosperma farináceo foi maior no estágio de PI em relação aos demais pontos de maturação. A vitreosidade é uma medida para determinar a quantidade de

endosperma vítreo em relação ao farináceo existente no grão de milho, que pode influenciar a sua digestibilidade. Philippeau e Michalet-Doureau (1997) observaram que o aumento da vitreosidade do milho foi associado com a diminuição da degradação de amido no rúmen. Segundo Barajas et al. (2006), em grãos duros, pela presença de endosperma vítreo, o amido é menos disponível para as enzimas microbianas do rúmen e do intestino.

Na Tabela 5 estão apresentadas as características físico-químicas de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR), no momento da ensilagem (tempo 0 de armazenamento). A CRA foi maior ($P < 0,05$) para grãos de milho dentado em todos os pontos de maturidade. A CRA tem forte influência na colonização das partículas pelos microrganismos (BENNINK et al., 1978) e pode influenciar a repleção ruminal (enchimento), alterando a taxa de passagem (EHLE, 1984), enquanto o TMP pode influenciar a área de superfície disponível ao ataque por microrganismos (OWENS; GOETSCH, 1988; PEREIRA et al., 2009). Segundo Giger-Reverdin (2000), alimentos com alta CRA podem apresentar menor densidade, uma vez que a baixa densidade, em geral, corresponde à presença de bolsas de ar entre os componentes da matriz orgânica da parede celular. Este autor ainda afirma que as bolsas de ar podem reter água quando em excesso no rúmen, tendo maior capacidade de enchimento e menor taxa de trânsito, porém maior tempo para a ação das enzimas dos microrganismos e, conseqüentemente, maior degradação.

A solubilidade da MS (%) não foi influenciada pelo híbrido. Em relação à maturidade da planta, quando o milho foi colhido no ponto de PI, a solubilidade foi maior ($P < 0,01$). Contudo, a evolução na maturação do grão determinou redução na solubilidade. Segundo Queiroz et al. (2010), essa característica está relacionada com a CRA e pode influenciar a solubilidade de nutrientes no rúmen, já que alimentos que oferecem maior solubilidade concomitantemente dispõem de maior fração potencialmente degradável e menor fração não degradável. A solubilização da MS diminuiu com a maturidade devido à organização do endosperma.

Tabela 5 - Características físicas e químicas de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) no momento da ensilagem, de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR)

Item	IAC 8390			AG 1051			EPM	P		
	PI ¹	GU ²	GSR ³	PI	GU	GSR		H ⁴	M ⁵	H×M
CRA ⁶ , L/kg MS	1,05 ^b	1,27 ^{ab}	1,01 ^b	1,43 ^a	1,50 ^a	1,44 ^a	0,06	0,02	0,01	0,24
Solubilidade da MS, %	12,73 ^a	8,44 ^{bc}	5,60 ^c	14,08 ^a	9,55 ^b	6,37 ^c	0,55	0,11	<0,01	0,89
CE ⁷ , μS/cm	0,53 ^b	0,24 ^d	0,20 ^e	0,67 ^a	0,36 ^c	0,23 ^d	0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Densidade de partículas, g/cm	1,44 ^a	1,42 ^c	1,42 ^c	1,44 ^{ab}	1,42 ^c	1,43 ^{bc}	0,002	0,28	<0,01	0,02
TMP ⁸ , cm	2,33 ^{bc}	2,56 ^{ab}	2,71 ^a	2,17 ^c	2,44 ^{abc}	2,56 ^{ab}	0,07	0,08	<0,01	0,97
FDN ⁹ , %MS	12,48 ^{ab}	12,86 ^a	9,82 ^{bc}	10,36 ^{abc}	9,83 ^{abc}	8,16 ^c	0,66	0,03	<0,01	0,55
EE ¹⁰ , %MS	3,90 ^c	4,14 ^{bc}	4,20 ^{bc}	5,15 ^a	5,07 ^a	4,85 ^{ab}	0,15	<0,01	0,82	0,21
CHO _{sol.} ¹¹ , %MS	7,81 ^b	7,25 ^b	9,46 ^a	4,94 ^c	6,77 ^b	10,24 ^a	0,32	0,04	<0,01	<0,01
Amido, %MS	58,75 ^c	68,76 ^a	65,74 ^{ab}	60,77 ^{bc}	68,86 ^a	66,73 ^{ab}	1,40	0,43	<0,01	0,79
PB ¹² , %MS	11,73 ^a	11,02 ^{ab}	10,71 ^{ab}	10,85 ^{ab}	10,76 ^{ab}	10,07 ^b	0,29	0,12	0,02	0,52
Cinzas, %MS	1,64 ^a	1,43 ^{ab}	1,39 ^{ab}	1,70 ^a	1,45 ^{ab}	1,27 ^b	0,09	0,87	<0,01	0,52
Prolamina, %MS	2,63 ^d	4,96 ^{ab}	5,14 ^a	2,47 ^d	3,82 ^c	4,04 ^{bc}	0,20	0,02	<0,01	0,04

¹Planta inteira; ²Grão úmido; ³Grão seco reconstituído; ⁴Híbrido; ⁵Maturidade; ⁶Capacidade de retenção de água; ⁷Condutividade elétrica; ⁸Tamanho médio de partículas;

⁹Fibra em detergente neutro; ¹⁰Extrato etéreo; ¹¹Carboidratos solúveis; ¹²Proteína bruta; EPM: Erro padrão da média

A CE diminuiu conforme o aumento da maturidade ($P < 0,01$), sendo inversa ao aumento do teor de MS. Segundo Jobim et al. (2007) a CE não expressa especificamente quais os íons que estão presentes em determinada amostra, mas pode contribuir para a mensuração das perdas de conteúdo intracelular oriundos do processamento na ensilagem. Então, na presença de alto teor de umidade, consequentemente, haverá maior extravasamento celular em função de processos mecânicos. A CE foi maior para o ponto de colheita de PI. Da mesma forma, o híbrido dentado apresentou maior CE nos pontos de colheita PI e GU. Isso pode estar relacionado à facilidade de trituração deste tipo de grão, e novamente, aumento do extravasamento celular.

A densidade de partículas não foi influenciada pelo híbrido. Ambos os híbridos apresentaram maior densidade ($P < 0,01$) de partículas na maturidade PI comparativamente aos pontos GU e GSR, refletindo o efeito do menor TMP obtido após a moagem dos grãos colhidos no estágio PI. A densidade de partículas aumentou com a diminuição de TMP porque, segundo Manickam e Suresh (2011), a porosidade diminui com o menor TMP. Houve tendência ($P = 0,08$) de maior TMP para o híbrido IAC8390 (duro) independentemente do estágio de maturidade, provavelmente pela maior presença de proteínas prolaminas, resultando em maior resistência do endosperma à cominuição durante a moagem. No presente estudo, a determinação da densidade em amostras moídas (partículas) deve ser uma justificativa plausível para a ausência de correlação entre densidade e vitreosidade. Contudo, a vitreosidade do endosperma tem sido correlacionada positivamente com a densidade de grãos inteiros em trabalhos prévios (CORREA et al., 2002).

Não houve interação ($P > 0,05$) entre híbrido e maturidade para o teor de FDN, que diminuiu com o decorrer da maturidade. Ao se comparar os híbridos, independentemente da maturidade, o híbrido AG 1051 apresentou, em média, menor teor de FDN (9,45% vs 11,72% da MS) e, consequentemente, maior solubilidade da MS (10,00% vs 8,92% da MS) em relação ao híbrido IAC 8390. Passini et al. (2002) e Pinto et al. (2012) trabalhando com silagem de grãos úmidos de milho, encontraram teores de FDN no momento da ensilagem, de 9,77% e 10% da MS, respectivamente. Esses teores foram semelhantes aos obtidos nesse estudo para grãos de milho no momento da ensilagem, do híbrido AG 1051.

O teor de extrato etéreo (EE) não foi influenciado pela maturidade. O híbrido dentado (AG 1051) apresentou maior teor de EE ($P < 0,01$) em relação ao híbrido duro (IAC 8390), para todos os pontos de colheita. Valores semelhantes foram encontrados na literatura, entre 3,90 e 4,18% de EE (DANIEL et al., 2012; ITAVO et al., 2006; MELLO et al., 2004; PASSINI et al., 2002). Em relação ao teor de CHO_{sol} , houve interação ($P < 0,01$) entre

híbrido e maturidade. Segundo Johnson et al. (2003), com o avanço da maturidade das plantas de milho, o teor de CHO_{sol}. diminui enquanto o teor de amido aumenta. No presente estudo, o teor de CHO_{sol}. aumentou com o avanço da maturidade. Em relação ao teor de amido, no momento da colheita, os grãos de milho no ponto de GU e GSR apresentaram teores similares de amido, provavelmente porque a maturidade fisiológica já tinha sido alcançada, e consequentemente, a translocação de nutrientes da planta para os grãos foi cessada. O teor de amido para GU foi próximo ao encontrado por Hoffman et al. (2011), que trabalharam com grãos de milho úmido para silagem com valores entre 65,5 e 69,1% de amido da MS. Não houve efeito de híbrido para teores de PB e cinzas, que diminuíram ao longo da maturidade ($P < 0,05$). Os valores encontrados para teores de PB e cinzas foram similares aos relatados por Daniel et al. (2012).

As concentrações de proteínas prolaminas foram maiores para o híbrido duro, e aumentaram conforme a maturidade e apresentaram interação ($P < 0,05$) entre híbrido e maturidade. Phillippeau, Landry e Michalet-Doreau (2000) reportaram correlação positiva entre concentração de proteínas prolaminas e a vitreosidade do grão, determinada por dissecação manual do endosperma, ao concluírem que grãos de milho mais vítreos contêm mais proteínas prolaminas em relação aos grãos de milho menos vítreos. Segundo Hoffman e Shaver (2011), estes dados definem as diferenças na composição química entre o endosperma vítreo e o endosperma farináceo. Neste sentido, no presente estudo a vitreosidade (Tabela 4) teve alta relação com a concentração de proteínas prolaminas.

No milho duro, as camadas mais externas do endosperma encontram-se totalmente ligadas pela proteína prolamina, formando camadas vítreas e duras, enquanto que nas camadas mais internas há uma pequena proporção de endosperma farináceo, apresentando núcleo arredondado e não dentado (ZOPOLLATTO, 2007). Já o híbrido dentado é caracterizado pela presença de certa quantidade de proteínas prolaminas, entretanto, as camadas córneas não cobrem toda a superfície do endosperma, conferindo aspecto vítreo apenas nas laterais do grão, e o centro do grão que se estende à coroa apresenta textura farinácea (ZOPOLLATTO, 2007). Valores similares de proteínas prolaminas em grãos de milho úmido dentado foram apresentados por Nellis, Hoffman e Shaver (2013), trabalhando com o mesmo protocolo utilizado no presente estudo.

4.2 Caracterização da silagem

As características físico-químicas das silagens nos diferentes períodos de armazenamento estão apresentadas nas figuras, à seguir. Na Figura 3 estão apresentados os teores de MS de silagens de grão de milho de acordo com a maturidade e tempo de armazenamento. Como esperado, o teor de MS foi diferente entre os grãos colhidos no ponto PI e os demais. Amostras GU ou GSR apresentaram teores similares de umidade ($\bar{x} = 31,9\%$), devido a reidratação dos grãos secos. Já os grãos PI apresentaram teores de umidade inicial de 54,93% (AG 1051) e 46,14% (IAC 8390). A CRA (L/kg MS) foi maior ($P < 0,05$) para silagens de grãos de milho colhidos no estágio PI com 120 dias de armazenamento (Figura 4). Durante o período de armazenamento, a CRA aumentou nas silagens de grãos em PI. Segundo Giger-Reverdin (2000), quanto maior a CRA, maior a solubilidade de nutrientes no rúmen.

Figura 3 - Matéria seca (MS) de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,23$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Figura 4 - Capacidade de retenção de água (CRA) de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,31$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,03$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,02$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento.

Figura 5 - Condutividade elétrica (CE) de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento.

A CE está diretamente relacionada à concentração de solutos eletricamente carregados na solução, que podem se originar de extravasamento celular por rompimento de parede e membrana celular e também pela conversão de compostos eletricamente neutros em compostos eletricamente carregados por meio da fermentação. Segundo Vieira e Carvalho (1994), a CE baseia-se na modificação da resistência elétrica causada pela lixiviação de eletrólitos dos tecidos dos grãos para a solução em que este é imerso e tem como princípio avaliar o aumento da permeabilidade da membrana à medida que esta se deteriora.

A conversão de açúcares em produtos de fermentação (ex. ácidos orgânicos) também deve ter contribuído significativamente para o aumento da CE ao longo do armazenamento. Houve interação de CE ($P < 0,01$) entre híbrido, maturidade e armazenamento (Figura 5). Embora a CE tenha diminuído com o avanço da maturidade, por outro lado, aumentou com o período de armazenamento, indicando que a quantidade de compostos eletricamente carregados aumentaram com a fermentação de $\text{CHO}_{\text{sol.}}$ em ácidos orgânicos. A liberação de íons por rompimento celular devido ao período de armazenamento também pode explicar este fato. Em relação ao teor de $\text{CHO}_{\text{sol.}}$, houve interação ($P < 0,01$) entre híbrido, maturidade e armazenamento (Figura 6). Os valores encontrados corroboram com os descritos por Daniel et al. (2012) para silagens de GU. Embora silagens de grãos apresentem baixos teores de $\text{CHO}_{\text{sol.}}$ (KUNG Jr.; WINDLE; WALKER, 2014), a quantidade de substratos fermentescíveis encontrados no momento da ensilagem é suficiente para a ocorrência de fermentação satisfatória, havendo $\text{CHO}_{\text{sol.}}$ remanescente nas silagens analisadas.

Figura 6 - Carboidratos solúveis (CHO sol.) de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,02$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,21$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Figura 7 - Proteína bruta (PB) de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,22$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,81$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P = 0,14$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,15$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Figura 8 - Teor de cinzas de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,57$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,20$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P = 0,16$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,96$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Os teores de PB, cinzas (Figura 7 e 8) e teores de amido (Figura 9) não foram influenciados pelos tratamentos. Os valores de cinzas, PB e amido foram similares aos relatados por Daniel et al. (2012) e Passini et al. (2002). Em geral, o teor de amido aumenta com a maturidade da planta e o enchimento de grãos, assim, os nutrientes são armazenados no grão, primeiramente como açúcares e posteriormente como amido (JOBIM; BRANCO; SANTOS, 2003; WILKINSON; NEWMAN; KISSLING, 1998).

Figura 9 - Teor de amido de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,06$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,75$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P = 0,94$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,80$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Figura 10 - Teores de proteínas prolaminas de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,9541$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Após 60 dias de armazenamento os grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) das silagens GU e GSR apresentaram valores similares de proteínas prolaminas (Figura 10), sendo que essas proteínas apresentaram interação ($P < 0,01$) entre híbrido, maturidade e armazenamento. Durante o processo de ensilagem, as proteínas prolaminas são degradadas por proteólise e aumentam a acessibilidade aos grânulos de amido por microrganismos do rúmen (HOFFMAN et al., 2011). As zeínas se desenvolvem e aumentam com o avançar da maturidade, as zeínas β e γ formam ligações cruzadas e as zeínas α e δ penetram na matriz do endosperma, encapsulando os grânulos de amido em uma matriz protéica hidrofóbica (MUFORSTER; WASSERMAN, 1998). Antes do processo de ensilagem as proteínas prolaminas apresentaram 2,47% e 2,63% da MS para os híbridos AG 1051 e IAC 8390 no ponto de PI, respectivamente. Tal efeito pode ser explicado pelo fato de que o grão foi colhido antes da maturidade fisiológica, período no qual a matriz protéica não está totalmente formada. No mesmo período, no ponto de GSR esses valores aumentaram em aproximadamente 3 unidades percentuais. É importante ressaltar que os teores de proteína prolamina foram similares para silagens de GU e GSR ao longo do período de armazenamento, independentemente do híbrido ensilado.

Figura 11 - Nitrogênio amoniacal (N-NH₃) de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,41$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,38$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Ocorreu aumento ($P < 0,01$) do teor de N-NH₃ durante o período de armazenamento (Figura 11). O GU IAC8390 apresentou menor teor de N-NH₃, seguido do híbrido AG 1051 na mesma maturidade. A concentração de N-NH₃ parece ser função da extensão da fermentação. A redução da concentração de proteínas prolaminas (Figura 10), por atividade proteolítica, é suportada pelos dados de N-NH₃ e aumento no teor de proteína solúvel, sugerindo que estas proteínas são solubilizadas e deaminadas com o avanço do tempo da ensilagem (HOFFMAN et al., 2011; KUNG Jr.; WINDLE; WALKER, 2014). Os teores de N-NH₃ para o híbrido GU dentado (2,92 N-NH₃/N total) foram similares aos encontrados por estes mesmos autores. Em silagens de grãos úmidos de milho, o teor de N-NH₃ está positiva e significativamente correlacionado com a digestibilidade de amido, assim como a PB solúvel (WINDLE, 2013).

As concentrações de PB solúvel aumentaram ao longo do período de armazenamento e apresentaram interação ($P < 0,01$) entre híbrido, maturidade e armazenamento (Figura 12). Aos 60 dias de armazenamento, as silagens de GSR (AG 1051) e GU (IAC 8390 e AG 1051) apresentaram teores de PB solúvel (% PB) entre 40,40% e 41,36%, respectivamente. Aos 120 dias de armazenamento, as silagens de GU ($\bar{x} = 41,92\%$) também diferiram em 1 unidade percentual a PB solúvel em relação as silagens de GSR ($\bar{x} = 40,81\%$). Os resultados para silagens de GU corroboram com os apresentados por Kung Jr., Windle e Walker (2014), que

encontraram 42% de PB solúvel em silagens controle de GU, armazenadas por 140 dias. Silagens de PI apresentaram altos teores de PB solúvel, provavelmente porque a matriz protéica não estava totalmente formada. O aumento de $N-NH_3$ e PB solúvel são indicadores de atividade proteolítica na massa ensilada (DER BEDROSIAN; NESTOR; KUNG, 2012), associados a baixas concentrações de proteínas prolaminas nessas silagens, e consequentemente, maior degradabilidade de amido (HOFFMAN et al., 2011). A proteólise é um mecanismo intrínseco na fermentação de silagens de grãos úmidos (BARON et al., 1986).

Figura 12 - Proteína solúvel de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Figura 13 - pH de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,6070$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,74$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,84$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento.

Houve interação ($P < 0,01$) entre maturidade e armazenamento para o pH das silagens (Figura 13). As silagens de GSR apresentaram maiores valores de pH em todos os tempos de armazenamento. No caso de silagens de planta inteira de milho bem conservadas, valores de pH entre 3,8 e 4,2 são considerados adequados, pois nessa faixa há restrição da atividade de microrganismos indesejáveis, sendo suficiente para preservar o material ensilado (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991; TOMICH et al., 2004). Segundo Woolford (1984), embora o pH entre 3,8 e 4,2 seja ideal, em silagens úmidas este indicador não pode ser considerado como critério único para avaliação da fermentação, pois seu efeito inibidor sobre as bactérias depende da velocidade do declínio da concentração iônica e do grau de umidade do meio. Hoffman et al. (2011) encontraram valores similares de pH para silagens de grãos de milho dentado (pH = 4,3). As silagens apresentaram estabilização de pH após o processo fermentativo inicial, o que corrobora com McDonald, Henderson e Heron (1991), da existência de um período de queda de pH, seguido de estabilização, em torno de sete dias após a ensilagem.

Figura 14 - Ácido láctico de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,40$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,58$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

A produção de ácidos orgânicos em silagem de grãos úmidos, tais como, láctico, acético, propiônico, butírico, dentre outros, depende das práticas de confecção, do estágio de maturação, e também, umidade dos grãos, e da população de microrganismos do material ensilado (MAHANNA, 1994 apud LOPES et al., 2005). Juntamente com o pH (Figura 13), o ácido láctico nas silagens estabilizou aos 7 dias de armazenamento (Figura 14). Segundo KUNG Jr. et al. (2004), em silagens de GU com teores de MS ao redor de 70%, há mais substrato disponível para a produção de ácido láctico, determinando rápido decréscimo do pH e inibição da ação de bactérias. No presente estudo, embora silagens de GU e GS tenham apresentado maiores teores de CHO_{sol} . (Figura 6), essas silagens apresentaram menores teores de ácido láctico em relação as silagens de grãos de milho colhidos no estágio PI que apresentaram maior teor de ácido láctico durante todos os períodos de armazenamento. Por outro lado, esta maior preservação de nutrientes pode tornar o material mais instável quando exposto ao oxigênio atmosférico, pois altas concentrações de ácido láctico não são suficientes para garantir a estabilidade aeróbia da silagem (KUNG Jr. et al., 2004). Silagens bem fermentadas, com altos teores de carboidratos solúveis e ácido láctico são mais susceptíveis à deterioração (WEINBERG; MUCK, 1996).

Segundo Lawton (2002), as proteínas prolaminas são solúveis em ácido láctico e acético e na matriz protéica essas proteínas poderiam ser solubilizadas. Porém, a proteólise

também é um mecanismo intrínseco na fermentação de silagens de grãos de milho. Hoffman et al. (2011) afirmam que as proteínas prolaminas são degradadas por atividade proteolítica nessas silagens e concluíram que ao inocular silagens de grão de milho úmido com altas concentrações de ácido lático e acético, não tiveram efeito na degradação dessas proteínas.

Figura 15 - Ácido acético de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,27$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,82$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P = 0,38$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,03$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Silagens de milho de alta qualidade incluem concentração elevada de ácido orgânicos, como lático e acético, baixo pH e baixo conteúdo de amônia. Segundo McDonald, Henderson e Heron (1991), os ácidos orgânicos funcionam como preservativos para silagem e como energia para ruminantes. Em silagens bem fermentadas, as taxas de crescimento de fungos e leveduras são reduzidas com a elevação nas concentrações de ácido acético (MUCK, 1991). Os teores de ácido acético encontrados (Figura 15) foram próximos aos obtidos por Daniel et al. (2012) e Hoffman et al. (2011) em silagens de grão úmido. Embora as silagens PI tenham apresentado maiores teores de ácido acético, a razão ácido lático e ácido acético (Figura 16) apresentou interação ($P < 0,01$) entre maturidade e armazenamento, o maior teor de ácido acético não necessariamente proporcionou maior fermentação heterolática, mas que, de forma geral, houve maior produção de produtos de fermentação. O teor de ácido propiônico foi baixo e similar entre as silagens (Figura 17).

Figura 16 - Razão ácido láctico e ácido acético de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,41$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,29$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,15$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Figura 17 - Ácido propiônico de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,90$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,06$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P = 0,48$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,86$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Figura 18 - Ácido butírico de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,94$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,11$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,07$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

O ácido butírico é considerado um produto exclusivo de clostrídios, no entanto, outros microrganismos, tais como leveduras e bacilos também podem produzir esse ácido em pequenas quantidades (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Segundo Pahlow et al. (2003), fermentações indesejáveis são geralmente associadas com o desenvolvimento de bactérias do gênero *Clostridium*, podendo ser divididas em três grupos: as que produzem ácido butírico pela fermentação de açúcares; as de caráter proteolítico, degradando aminoácidos; e as que degradam tanto açúcares quanto aminoácidos.

As silagens GSR apresentaram maiores teores ($P < 0,01$) de ácido butírico com o aumento do período de armazenamento (Figura 18), com 0,23% (AG 1051) e 0,18% (IAC 8390) da MS. Provavelmente, grãos secos sofrem mais estresse a campo, o que consequentemente, pode interferir na qualidade higiênica sanitária das silagens desses grãos. Em estudo análogo de amostras compartilhadas com o presente estudo, a análise microbiológica revelou elevada proporção de Clostrídios entre os microrganismos prevalentes em silagens de GSR (CARVALHO, 2014), sugerindo que as condições em campo favoreceram sua ocorrência em relação às cepas de microrganismos concorrentes. Silagens de GU, bem fermentadas, apresentam ácido butírico menor que 0,1% da MS (MAHANNA, 1994 apud JOBIM et al., 1999). Produtos como ácido butírico e etanol, são geradores de perdas nas silagens, pois na conversão de açúcar a etanol ou a ácido butírico ocorrem perdas na forma de

CO₂ (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Já as silagens de GU e PI apresentaram teores de ácido butírico dentro do ideal.

Na Figura 19 estão apresentados os teores de etanol. As silagens no ponto GSR apresentaram maiores valores de etanol, com interação ($P < 0,01$) entre maturidade e armazenamento. O processo fermentativo de silagens de GSR, provavelmente proporcionou atividade de leveduras que convertem açúcares à etanol, dióxido de carbono e água (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Figura 19 - Etanol de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,05$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,24$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,05$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Outros produtos de fermentação encontrados nas silagens foram, acetona, acetato de etila, álcool iso-propílico, acetato de propila, 2-butanol, 1-propanol, lactato de etila, 2,3-butanodiol, 1,2-propanodiol, ácido iso-valérico e ácido valérico. A acetona, provavelmente, é um metabolito do metabolismo de clostrídios (ROOKE; HATFIELD, 2003). O teor de acetona foi superior ($P < 0,01$) para as silagens GSR, que aumentou ao longo do armazenamento (Figura 20), assim como o teor de ácido butírico. O teor de acetato de etila também aumentou ao longo do armazenamento (Figura 21). A presença de etanol e ácido acético em meio ácido são fatores determinantes da formação de acetato de etila, por simples reação química (HANGX et al., 2001). Em relação ao álcool iso-propílico, o híbrido IAC 8390 colhido no ponto de maturidade GSR apresentou teor superior às outras silagens (Figura

22). O acetato de propila (Figura 23) e o 2-butanol (Figura 24) não foram diferentes entre os tratamentos.

Figura 20 - Teores de acetona de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,17$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,10$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,27$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Figura 21 - Acetato de etila de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,17$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,10$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,28$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Figura 22 - Álcool iso-propílico de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Figura 23 - Acetato de propila de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,74$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,84$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P = 0,32$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,54$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Figura 24 - 2-Butanol de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,82$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,73$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P = 0,48$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,12$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Figura 25 - 1-Propanol de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,90$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,01$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Tipicamente, o ácido propiônico e o 1-propanol têm sido considerados produtos de bactérias do ácido propiônico e leveduras, respectivamente (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Entretanto, cepas de *Lactobacillus diolivorans* também têm sido associadas à produção de ácido propiônico e o 1-propanol a partir de 1,2-propanodiol (KROONEMAN et al., 2002). Teores de 1-propanol foram maiores para silagens GSR (AG 1051) e aumentaram com o período de armazenamento (Figura 25), e apresentaram interação ($P < 0,01$) entre híbrido, maturidade e armazenamento. Em relação ao lactato de etila, os tratamentos apresentaram baixas concentrações e variação ao longo do tempo, com interação ($P < 0,05$) entre híbrido, maturidade e armazenamento (Figura 26).

Figura 26 - Lactato de etila de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e tempos de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,49$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,04$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Figura 27 - 2,3-Butanodiol de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,28$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,48$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,55$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

O 2,3-butanodiol é produzido por bactérias (enterobactérias, bacilos, e possivelmente, bactérias lácticas) (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991; NISHINO; SHINDE, 2007). Na fermentação realizada por enterobactérias, o piruvato é catabolizado e condensado para formação de acetoina, e reduzida à 2-3 butanodiol (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Por outro lado, a atividade clostrídica (*Clostridium beijerinckii*) também produz 2,3-butanodiol pela ação da acetoina redutase (SIEMERINK et al., 2011). Silagens no ponto GSR apresentaram maiores teores ($P < 0,05$) de 2,3-butanodiol ao longo do período de armazenamento (Figura 27).

Houve interação ($P < 0,01$) entre híbrido, maturidade e armazenamento para os teores de 1,2-propanodiol, sendo que o híbrido IAC 8390 colhido no ponto de GU apresentou maior resultado ao longo do período de armazenamento (Figura 28). A ocorrência de 1,2-propanodiol tem sido associada à atividade de *L. buchneri*, *L. brevis* e outras bactérias heterofermentativas (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; SPOELSTRA, 1999). Os ácidos iso-valérico e valérico também foram encontrados nas silagens, esses compostos são típicos da degradação de proteína (LEEK, 2006). Novamente, silagens de GSR apresentaram valores superiores de ácido iso-valérico aos 120 dias de armazenamento (Figuras 29). Em relação ao ácido valérico (Figura 30), as silagens apresentaram baixa concentração e certa variação entre os tratamentos ($P < 0,05$).

Figura 28 - 1,2-Propanodiol de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Figura 29 - Ácido iso-valérico de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,21$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,91$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P = 0,60$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,02$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Figura 30 - Ácido valérico de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,11$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,96$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P = 0,95$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,03$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Em relação às perdas de MS, houve interação ($P < 0,01$) entre maturidade e armazenamento (Figura 31). Híbridos no estágio GSR apresentaram maiores perdas de MS, em consequência do pH mais elevado (Figura 13) dessas silagens, que possibilitou maior produção de etanol e ácido butírico, dentre outros produtos da fermentação e condições do meio. Além desse tipo de fermentação ser responsável por perdas de MS, os produtos gerados por clostrídios reduzem a aceitação do alimento por parte dos ruminantes (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). As silagens de GSR (IAC 8390 e AG 1051) e silagens PI (IAC 8390) apresentaram perdas de MS superiores ($\bar{x} = 6,59\%$), aos 120 dias de armazenamento. Já as silagens GU apresentaram menores perdas de MS para todos os períodos de armazenamento.

Morais et al. (2012) trabalhando com silagens de grão úmido de milho com 34,27% de umidade encontraram valores de 1,18% de perdas de matéria seca aos 64 dias de armazenamento em tubos PVC com capacidade de 3 kg. Daniel et al. (2012) publicaram meta-análise e reportaram teores de umidade de 25,6 a 40,5% em silagens de grão úmido. As perdas de MS durante a fermentação foram 2,47% para silagens de GU sem aditivos, sendo que o valor máximo relatado foi de 6,9% de perdas de MS. Estes valores foram próximos aos encontrados nas silagens de GU aos 60 dias de armazenamento (2,22% de perdas de MS).

Figura 31 - Perdas de matéria seca de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,66$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,10$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

4.3 Degradabilidade *in situ*

Na figura 32 estão apresentados os dados de solubilidade *in situ* da MS de silagens de grãos de milho de acordo com a maturidade e o tempo de armazenamento. Ocorreu interação ($P < 0,01$) entre híbrido, maturidade e armazenamento. Amostras ensiladas por mais de 60 dias apresentaram maiores teores de solubilidade da MS. Silagens PI (AG 1051) apresentaram maior fração A em relação às demais silagens, embora as silagens GSR (IAC 8390) com 120 dias de armazenamento aumentaram 42 unidades percentuais a solubilidade da MS, em relação às silagens PI (AG 1051) diferiram em 12 unidades entre o tempo 0 e 120 dias de armazenamento. De fato, a ensilagem aumentou a solubilidade da MS no decorrer do tempo de armazenamento, independente do híbrido e maturidade.

Figura 32 - Solubilidade *in situ* da matéria seca (MS) de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,15$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Segundo Arrigoni et al. (1998), a ensilagem de GU aumenta a degradabilidade devido atividade proteolítica que ocorre na matriz protéica, facilitando o ataque enzimático pelas bactérias ruminais. Benton, Klopfenstein e Erickson (2005), conduziram ensaio “*in situ*” para avaliar o efeito do tempo de ensilagem na degradabilidade da MS de silagens GU de milho e afirmaram que a degradabilidade da MS aumentou rapidamente nos primeiros 28 dias de ensilagem, mas continuou aumentando até o final dos 372 dias do período de ensilagem. Esses mesmos autores afirmaram que o aumento na degradabilidade foi maior para silagens de GU de milho com 30% de umidade e menor para silagens que apresentaram 24% de umidade.

No presente trabalho, os materiais ensilados apresentaram valores similares de degradabilidade entre 60 e 120 dias de armazenamento (Figura 33). Os resultados obtidos foram condizentes aos encontrados por Ladely et al. (1995) e Passini et al. (2002). Estes autores afirmaram que grãos de milho ensilados com teor de umidade acima de 28% apresentam aumento na degradação ruminal. Aos 60 dias de armazenamento, as silagens de GU e GSR do híbrido duro (IAC 8390) revelaram valores de 75,08% e 76,42% de degradabilidade da MS em 12 horas, respectivamente. No caso do híbrido dentado (AG 1051), indiferente da maturidade (GU e GSR), apresentou os mesmos valores de degradabilidade, com 80,20% da MS.

A degradabilidade ruminal *in situ* da MS em 24 horas está apresentada na Figura 34. A degradação máxima também foi alcançada quando as silagens de grãos estavam armazenadas por 60 dias. Amostras com 120 dias de armazenamento apresentaram degradabilidade entre 89,36% e 92,40% de degradabilidade ruminal da MS. Existem evidências na literatura (BENTON; KLOPFENSTEIN; ERICKSON, 2005; HOFFMAN; NGONYAMO-MAJEE; SHAVER, 2010) que sugerem que o aumento da fração degradável de silagens de grão de milho aumenta moderadamente com o tempo de armazenamento no silo.

Figura 33 - Degradabilidade ruminal *in situ* da matéria seca (MS) em 12h de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,17$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Figura 34 - Degradabilidade ruminal *in situ* da matéria seca (MS) em 24h de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,02$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,74$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Figura 35 - Fração A *in situ* de amido da MS de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) em diferentes maturidades (PI, GU e GSR) e tempos de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P = 0,02$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Figura 36 - Degradabilidade ruminal *in situ* de amido em 12h de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P = 0,02$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,11$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Figura 37 - Degradabilidade ruminal *in situ* de amido em 24h de silagens de grãos de milho (IAC 8390 e AG 1051) de acordo com a maturidade (PI, GU e GSR) e o tempo de armazenamento (0, 7, 21, 60 e 120 dias). $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ maturidade. $P < 0,01$ para interação híbrido $\times$ armazenamento. $P < 0,01$ para interação maturidade $\times$ armazenamento. $P = 0,35$ para interação híbrido $\times$ maturidade $\times$ armazenamento

Em relação a fração A de amido houve interação ($P < 0,01$) entre híbrido, maturidade e armazenamento (Figura 35). Como esperado, a silagem no ponto de PI (AG 1051) apresentou maiores valores de fração A (93,58%). Aos 120 dias de armazenamento, a diferença entre as silagens foi diminuída, com teores de fração A de amido da MS variando entre 85,13% a 93,58%. Já na degradabilidade ruminal de amido em 12 horas (Figura 36), houve aumento de degradabilidade das amostras ensiladas entre o período 0 e 7 dias de armazenamento. A degradabilidade das amostras ensiladas por 120 dias variou entre 95,71% (AG 1051) para PI e 90,91% (IAC 8390) para GSR, diferindo apenas em 5 unidades percentuais.

Segundo Correa et al. (2002), trabalhando com grãos vítreos e farináceos, foi constatado que a correlação entre vitreosidade e degradabilidade ruminal de amido foi negativa e alta. Resultados semelhantes também foram apresentados por Philippeau e Michalet-Doureau (1997). Porém, quando o grão é ensilado, independente da maturidade, pode-se inferir que essas diferenças não persistiram. Os tratamentos apresentaram média de 95% de degradabilidade ruminal *in situ* de amido em 24 horas com amostras armazenadas por 60 dias (Figura 37). O aumento da degradabilidade ruminal de amido pode ser explicado pela atividade proteolítica, e consequentemente, degradação das proteínas prolaminas (HOFFMAN et al., 2011).

Figura 38 - Correlação entre prolamina e fração A de amido (A) em silagens de grãos de milho; Fração A de amido = $-1,68 \times \text{prolamina}^2 - 1,46 \times \text{prolamina} + 98,94$; $R^2 = 0,74$; $P < 0,01$; Menor erro do quadrado médio (RQME) = 5,43. Correlação entre prolamina e a degradabilidade de amido em 12 horas (B) em silagens de grãos de milho; Degradabilidade de amido 12h = $-1,29 \times \text{prolamina}^2 + 0,29 \times \text{prolamina} + 98,41$; $R^2 = 0,84$; $P < 0,01$; Menor erro do quadrado médio (RQME) = 3,03. Correlação entre prolamina e a degradabilidade de amido em 24 horas (C) em silagens de grãos de milho; Degradabilidade de amido 24 h = $-0,96 \times \text{prolamina}^2 + 2,60 \times \text{prolamina} + 95,72$; $R^2 = 0,87$; $P < 0,01$; Menor erro do quadrado médio (RQME) = 1,27

A influência negativa das proteínas prolaminas na digestão de amido em ruminantes é agravada pela degradação lenta dessas proteínas por bactérias ruminais (HOFFMAN; SHAVER, 2011). Quando o grão de milho é ensilado, há aumento na digestibilidade de amido devido à fragilização e ao rompimento da matriz protéica que envolve os grânulos de amido no endosperma (MOURA, 2013). Assim, há grande dissociação dos grânulos de amido e, conseqüentemente, aumento da superfície de contato dos grânulos de amido para as bactérias do rúmen (HUNTINGTON; HARMON; RICHARDS, 2006). No presente estudo, ocorreu correlação negativa entre fração A de amido e a concentração de prolaminas na silagem ($R^2 = 0,74$; $P < 0,01$), de forma que quanto maior a quantidade de proteína prolamina, menor a fração A de amido (Figura 38a). A matriz amido protéica no endosperma dos grãos é análoga à matriz da ligno-celulósica das forragens. Assim, a degradação de proteínas prolaminas na matriz aumenta a disponibilidade de amido (KUNG Jr.; Der BEDROSIAN, 2010). As observações no presente estudo (Figuras 38b e 38c) também são apoiadas pelas medições detalhadas em silagens de grão úmido de milho realizadas por Hoffman et al. (2011). Estes autores inferiram que como as proteínas prolaminas são degradadas na silagem, há aumento na degradabilidade de amido.

Jurjanz e Monteils (2005) ensilaram grãos com alta umidade e observaram que a degradabilidade ruminal de amido aumentou de 70,2% em grãos não ensilados para 92,3% em grãos ensilados. Esses autores ainda afirmaram que o processo de ensilagem melhorou a degradação de amido e alterou a fração A de amido (80,7% versus 65,6%) e a taxa fracional de degradação ruminal de amido (12,4%/h versus 8,0%/h). Dados sobre o efeito de ensilagem em grãos de milho de diferentes híbridos e pontos de maturidade são escassos na literatura. A quantificação das proteínas prolaminas pode levar à melhor compreensão de fatores relacionados à degradabilidade de amido e sua digestibilidade, e conseqüentemente, desempenho animal (GIUBERT; GALLO; MASOERO, 2012).

Figura 39 - Correlação entre N-NH_3 e fração A de amido (A) determinada em silagens de grãos de milho; Fração A de amido = $-1,65 \times \text{N-NH}_3^2 + 15,81 \times \text{N-NH}_3 + 54,66$; $R^2 = 0,74$; $P < 0,01$; Menor erro do quadrado médio (RQME) = 5,36. Correlação entre N-NH_3 e degradabilidade de amido em 12 horas (B) determinada em silagens de grãos de milho; Degradabilidade de amido 12 h = $-1,82 \times \text{N-NH}_3^2 + 13,61 \times \text{N-NH}_3 + 68,18$; $R^2 = 0,81$; $P < 0,01$; Menor erro do quadrado médio (RQME) = 3,31. Correlação entre N-NH_3 e degradabilidade de amido em 24 horas (C) determinada em silagens de grãos de milho. Degradabilidade de amido 24 h = $-1,00 \times \text{N-NH}_3^2 + 6,75 \times \text{N-NH}_3 + 85,51$; $R^2 = 0,77$; $P < 0,01$; Menor erro do quadrado médio (RQME) = 1,72

Figura 40 - Correlação entre PB solúvel e fração A de amido (A) determinada em silagens de grãos de milho; Fração A de amido = $-0,01 \times \text{PB solúvel}^2 + 1,18 \times \text{PB solúvel} + 49,42$; $R^2 = 0,85$; $P < 0,01$; Menor erro do quadrado médio (RQME) = 4,08. Correlação entre PB solúvel e degradabilidade de amido em 12 horas (B) determinada em silagens de grãos de milho; Degradabilidade de amido 12 h = $-0,01 \times \text{PB solúvel}^2 + 0,91 \times \text{PB solúvel} + 65,50$; $R^2 = 0,88$; $P < 0,01$; Menor erro do quadrado médio (RQME) = 2,60. Correlação entre PB solúvel e degradabilidade de amido em 24 horas (C) determinada em silagens de grãos de milho; Degradabilidade de amido 24 h = $-0,00 \times \text{PB solúvel}^2 + 0,45 \times \text{PB solúvel} + 84,20$; $R^2 = 0,80$; $P < 0,01$; Menor erro do quadrado médio (RQME) = 1,60

Na Figura 39a, está apresentada a correlação entre N-NH₃ e fração A de amido ($R^2 = 0,74$; $P < 0,01$). Der Bedrosian et al. (2012) trabalhando com silagens de milho e Kung Jr., Windle e Walker (2014), avaliando o efeito de protease na fermentação e valor nutritivo de silagens de grão úmido, encontraram alta correlação entre N-NH₃ e digestibilidade *in vitro* de amido. No mesmo sentido, no presente trabalho o aumento da degradabilidade *in situ* de amido está positivamente correlacionado com o teor de N-NH₃ (Figuras 39b e 39c) e com a PB solúvel (Figura 40) ($R^2 = 0,81$ e $R^2 = 0,88$, para degradabilidade *in situ* de amido em 12 h para N-NH₃ e PB solúvel, respectivamente) e negativamente correlacionada com as concentrações de proteínas prolaminas ($R^2 = 0,84$ para degradabilidade *in situ* de amido em 12 h). Essas observações são semelhantes aos dados encontrados por Ferraretto et al. (2014) e Kung Jr., Windle e Walker (2014), trabalhando com digestibilidade *in vitro* de silagens de grão úmido de milho. Assim, a maior degradabilidade de amido está correlacionada com o aumento de N-NH₃, PB solúvel e diminuição nas concentrações de proteínas prolaminas da massa ensilada, indicando atividade proteolítica ao longo do período de armazenamento das silagens (DER BEDROSIAN; NESTOR; KUNG, 2012; HOFFMAN et al., 2011).

Em silagens de culturas com teores elevados de proteína (ex. leguminosas) a proteólise é considerada indesejável, pois resulta em aumento da fração solúvel da proteína e dos teores de nitrogênio não proteico, associados ao desempenho animal insatisfatório (ESTRUME, 1987 apud KUNG Jr.; WINDLE; WALKER, 2014). Porém, estudos recentes sugerem que em silagens de grão úmido a proteólise é considerada um importante mecanismo na degradação de proteínas prolaminas e, conseqüentemente, em ganhos de degradação ruminal de amido (HOFFMAN et al., 2011; KUNG Jr.; WINDLE; WALKER, 2014; WINDLE et al., 2013). Silagens de grãos de milho incubadas *in situ* por 12 horas (Figuras 38b, 39b e 40b) apresentaram melhores efeitos do aumento da degradabilidade de amido em relação às incubadas por 24 horas (Figuras 38c, 39c e 40c). Silagens de grãos de milho com aproximadamente 90% de degradabilidade de amido apresentaram teores entre 2% a 3% de proteínas prolaminas (%MS), 2% de N-NH₃ (N-total) e aproximadamente 40% de PB solúvel (%PB).

5 CONCLUSÃO

Quando grãos de milho com endosperma vítreo ou farináceo são ensilados, as proteínas prolaminas presentes na matriz protéica são degradadas, aumentando a disponibilidade dos grânulos de amido e a degradação ruminal deste nutriente. Então, maior degradabilidade ruminal de amido foi correlacionada negativamente com a concentração de proteínas prolaminas e positivamente relacionada aos teores de proteína solúvel e nitrogênio amoniacal. O efeito de genótipo e maturidade foram superados por tempos de armazenamento superiores a 60 dias, no tocante à degradabilidade ruminal das silagens. Silagens de grão seco reconstituído apresentaram maiores perdas de matéria seca e qualidade higiênica inferior às silagens de grão úmido.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, W.R.; HUANG, S.; KRIZ, A.L.; LUETHY, M.H. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of zeins in mature maize kernels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 7, p. 1842-1849, 2004.
- ALLEN, M.S.; OBA, M.; CHOI, B.R. Silage: feed costs and performance affected by type of corn hybrid. **Feedstuffs**, Minneapolis, v. 69, n. 28, p. 11, 1997.
- ARRIGONI, M.D.B.; VIEIRA, P.F.; SILVEIRA, A.C.; FURLAN, L.R.; COSTA, C.; CHARDULO, A.L.; CURI, P.R. Estudos dos efeitos da restrição alimentar no desempenho de bovinos jovens confinados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 6, p. 987-992, 1998.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington, 1990. v. 1, 1117 p.
- BAL, M.A.; COORS, J.G.; SHAVER, R.D. Impact of maturity of corn for use as silage in the diets of dairy cows on intake, digestion and milk production. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 80, n. 10, p. 2497-2503, 1997.
- BARAJAS, R.; CERVANTES, B.J.; VIRGILIO, R.J.; ROMO, J.M.; LOMELI, J.J. Effect of white corn processing method on feedlot performance of Brahman cross finishing bulls. In: WESTERN SECTION AMERICAN SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE, 57., 2006, Phoenix. **Proceedings...** Phoenix: ASAS Western Section, 2006. p. 389-391.
- BARON, V.S.; STEVENSON K.R.; BUCHANAN-SMITH, J.G. Proteolysis and fermentation of corn-grain ensiled at several moisture levels and under several simulated storage methods. **Canadian Journal Animal Science**, Ottawa, v. 66, p. 451-461, 1986.
- BENNINK, M.R.; TYLER, T.R.; WARD, G.M.; JOHNSON, D.E. Ionic milieu of bovine and ovine rumen as affected by diet. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 61, p. 315-323, 1978.
- 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. Lincoln: University of Nebraska, 2005. p. 31-33.
- BERQUIST, R.; THOMPSON, D.L. Densidade de grãos de milho caracterizada por duas técnicas de gravidade específica. **Crop Science**, Madison, v. 32, p. 1287, 1992.
- BERZAGHI, P.; COZZI, G.; ANDRIGHETTO, I. The use of near infrared analysis for in situ studies. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 80, n. 12, p. 3263-3270, 1997.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, p. 248-259, 1976.
- BRIEGER, F.G.; BLUMENSCHN, A. Botânica e origem do milho. In: INSTITUTO BRASILEIRO DE POTASSA. **Cultura e adubação do milho**. São Paulo, 1966. cap. 3, p. 81-107.

CANTARELLI, V.S. **Composição química, vitreosidade e digestibilidade de diferentes híbridos de milho para suínos**. 2003. 39 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

CARVALHO, P.A. **Influência de genótipo e maturidade na diversidade microbiológica em milho grão para silagem**. 2014. 95 p. Dissertação (Mestre em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014. No prelo.

CHANEY, A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 8, p. 130-137, 1962.

CHERNEY, D.J.R.; PATTERSON, J.A.; LEMENAGER, R.P. Influence of in situ bag rinsing technique on determination of dry matter disappearance. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 73, p. 391-397, 1990.

CHURCH, D.C. **The ruminant animal digestive physiology and nutrition**. Englewood Cliffs: O & Books, 1988. 564 p.

CORONA, L.; OWENS, F.N.; ZINN, R.A. Impact of corn vitreousness and processing on site and extent of digestion by feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 3020-3031, 2006.

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

COSTA, C.; ARRIGONI, M.D.B.; SILVEIRA, A.C.; OLIVEIRA, H.N. Desempenho de bovinos superprecoces alimentados com silagem de milho ou feno de aveia e grãos 16 de milho ensilados ou secos. **Acta Scientiarum of Animal Science**, Maringá, v. 24, n. 4, p. 1175-1183, 2002.

COZZOLINO, D.; ACOSTA, Y.; GARCIA, J. Application of near infrared reflectancy spectroscopy (NIRS) to forage evaluation in Uruguay. In: INTERNATIONAL GRASSLANDS CONGRESS, 19., 2001. São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 370.

DANIEL, J.L.P. **Contribuição da fração volátil no valor nutritivo de silagens**. 2011. 162 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

DANIEL, J.L.P.; MORAIS, G.; FERNANDES, J.; CARVALHO, P.A.; NUSSIO, L.G. Additives in high moisture grain silages: a meta-analysis. In: BEEF CATTLE SYMPOSIUM/BEEF CATTLE INTERNATIONAL CONGRESS - GRAIN PROCESSING, 7., 2012, São Pedro. **Proceedings....** Piracicaba: FEALQ, 2012. p. 1-20.

DANIELSON, R.E.; SUTHERLAND, P.L. **Methods of soil analysis: physical and mineralogical methods**. Madison: American Society of Agronomy, 1986. 1188 p.

DEFOOR, P.J.; BROWN, M.S.; OWENS, F.N. Reconstitution of grain sorghum for ruminants. In: OKLAHOMA CATTLE GRAIN PROCESSING SYMPOSIUM, 9., 2006, Oklahoma. **Proceedings...** Oklahoma: OSBE, 2006. p. 93-98.

DER BEDROSIAN, M.C.; NESTOR, K.E.; KUNG JR., L. The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 9, p. 5115-5126, 2012.

DOMBRINK-KURTZMAN, M.A.; BIETZ, J.A. Zein composition in hard and soft endosperm of maize. **Cereal Chemical**, Washington, v. 70, p. 105-108, 1993.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; SPOELSTRA, S.F. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology**, New Jersey, v. 87, p. 583-594, 1999.

ECKHOFF, S.R.; PAULSEN, M.R. Maize. In: HENRY, R.J.; KETTLEWELL, P.S. (Ed.). **Cereal grain quality**. London: Chapman & Hall, 1996. v. 3, p. 77-89.

EHLE, F.R. Influence of feed particle density on particulate passage from rumen of holstein cow. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 67, p. 693-697, 1984.

FERRARETTO, L.F.; TAYSOM, K.; TAYSOM, D.M.; SHAVER, R.D.; HOFFMAN, P.C. Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia-nitrogen, and ruminal in vitro starch digestibility in high-moisture corn samples, **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, p. 1-7, 2014.

FORATO, L.A. **Estudos das estruturas das zeínas por RMN, FTIR e MFA**. 2000. 176 p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

GIGER-REVERDIN, S.G. Characterization of feedstuffs for ruminants using some physical parameters. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 86, p. 53-69, 2000.

GIUBERT, G.; GALLO, A.; MASOERO, F. Technical note: Quantification of zeins from corn, high-moisture corn, and corn silage using a turbidimetric method: Comparative efficiencies of isopropyl and *tert*-butyl alcohols. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, p. 3384-3389, 2012.

GOODRICH, R.D.; BYERS, F.M.; MEISKE, J.C. Influence of moisture content, processing and reconstitution on the fermentation of corn grain. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 41, n. 3, p. 876-881, 1975.

HALE, W.H. Influence of processing of the utilization of grains (starch) by ruminants. Tucson. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 37, n. 4, p. 1075-1083, 1973.

HALL, M.B. **Neutral detergent-soluble carbohydrates nutritional relevance and analysis**. Gainesville: University of Florida, 2000. 42 p. (Bulletin, 339).

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

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

HANGX, G.; KWANT, G.; MAESSEN, H.; MARKUSSE, P.; URSEANU, I. **Reaction Kinetics of the esterification acid towards ethyl acetate**: technical report on the European Commission. Dortmund: INTINT, 2001. p. 1-5. (Deliverable, 22).

HENRIQUE, W.; BELTRAME FILHO, J.A.; LEME, P.R.; LANNA, D.P.D.; ALLEONI, G. F.; COUTINHO FILHO, J.L.V.; SAMPAIO, A.A.M. Avaliação da silagem de grãos de milho úmido com diferentes volumosos para tourinhos em terminação. Desempenho e características de carcaça. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 1, p. 183-190, 2007.

HERMAN, E.M.; LARKINS, B.A. Protein storage bodies and vacuoles. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 4, p. 601-614, 1999.

HOFFMAN, P.C.; SHAVER, R.D. Grain quality: a dairy cow's perspective. In: WISCONSIN CROP MANAGEMENT CONFERENCE, 5., 2011, Madison. **Proceedings...** Madison: University of Wisconsin-Extension, 2011. p. 51-73.

HOFFMAN, P.C.; NGONYAMO-MAJEE, D.; SHAVER, R.D. Determination of corn hardness in diverse corn germplasm using near infrared reflectance baseline shift as a measure of grinding resistance. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, p. 1685-1689, 2010.

HOFFMAN, P.C.; ESSER, N.M.; SHAVER, R.D.; COBLENTZ, W.H.; SCOTT, M.P.; BODNAR, A.L.; SCHMIDT, R. J.; CHARLEY, R.C. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, p. 2465–2474, 2011.

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

HUNTINGTON, G.B.; HARMON, D.L.; RICHARDS, C.J. Sites, rates, and limits of starch digestion and glucose metabolism in growing cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. E14-E24, 2006.

ÍTAVO, C.C.B.F.; MORAIS, M.G.; ÍTAVO, L C.V.; SOUZA, A.R.D.L.; DAVY, F.C.A.; ALBERTINI, T.Z.; COSTA, C.; LEMPP, B.; JOBIM, C.C. Padrão de fermentação e composição química de silagens de grãos úmidos de milho e sorgo submetidas ou não a inoculação microbiana. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, p. 655-664, 2006.

JOBIM, C.C.; REIS, R.A. Produção e utilização de silagem de grãos úmidos de milho. In: MATTOS, W.R.S. (Ed.). **A produção animal na visão dos brasileiros**. Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 912-927.

JOBIM, C.C.; BRANCO, A.B.; SANTOS, G.T. Silagem de grãos úmidos na Alimentação de bovinos leiteiros. In: SIMPÓSIO GOIANO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE BOVINOS DE CORTE E LEITE, 5., 2003, Goiânia: CBNA, 2003. p. 357-376.

JOBIM, C.C.; REIS, R.A.; RODRIGUES, L.R.A. Presença de microrganismos na silagem de grãos úmidos de milho ensilado com diferentes proporções de sabugo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 201-204, 1997.

JOBIM, C.C.; NUSSIO, L.G.; REIS, R.A.; SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, p. 101-119, 2007.

JOBIM, C.C.; REIS, R.A.; SCHOKEN-ITURRINO, R.B.; ROSA, B. Desenvolvimento de microrganismos durante a utilização de silagens de grãos úmidos de milho e de espigas de milho sem brácteas. **Acta Scientiarum of Animal Science**, Maringá, v. 21, n. 3, p. 671-676, 1999.

JOHNSON, L. M.; HARRISON, J.H.; DAVIDSON, D.; MAHANNA, W. C.; SHINNERS, K. Corn silage management: effects of hybrid, maturity, inoculation, and mechanical processing on fermentation characteristics. **Journal of Dairy Science**, Champagn, v.86, p.287-308, 2003.

JURJANZ, S.; MONTELS, V. Ruminant degradability of corn forages depending on the processing method employed. **Animal Research**, London, v. 3, p. 15-23, 2005.

KOTARSKI, S.F.; WANISKA, R.D.; THURN, K.K. Starch hydrolysis by the ruminal microflora. **Journal of Nutrition**, Rockville, v. 122, p. 178-190, 1992.

KRAUS, T.J.; KOEGEL, R.G.; STRAUB, R.J.; SHINNERS, K. Leachate conductivity as an index for quantifying level of forage conditioning. In: ASAE ANNUAL INTERNATIONAL MEETING, 6., 1997, Minneapolis. **Proceedings...** Minneapolis: ASAE, 1997. p. 1-12.

KRISHNAMOORTHY, U.; MUSCATO, T.V.; SNIFFEN, C.V.; VAN SOEST, P.J. Borate phosphate procedure as detailed in nitrogen fractions in selected feedstuffs. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 65, p. 217-225, 1982.

KROONEMAN, J.; FABER, F.; ALDERKAMP, A.C.; OUDE ELFERINK, S.J.H.W.; DRIEHUIS, F.; CLEENWERCK, I.; SWINGS, J.; GOTTSCHAL, J.C.; VANCANNEYT, M. *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 52, p. 639-646, 2002.

KUNG Jr., L.; DER BEDROSIAN, M.C. Effect of time of storage on changes in nutrient composition and value of silages. In: COLLEGE OF AGRICULTURAL SCIENCES, 4., 2010, Newark. **Proceedings...** Newark: University of Delaware, Department of Animal and Food Sciences, 2010. p. 1-5.

KUNG Jr., L.; WINDLE, M.C.; WALKER, N. The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, p. 1-6, 2014.

KUNG Jr., L.; MYERS, C.L.; NEYLON, J.M.; TAYLOR, C.C.; LAZARTIC, J.; MILLS, J.A.; WHITER, A.G. The effects of buffered propionic acid-based additives alone or combined with microbial inoculation on the fermentation of high moisture corn and whole crop barley. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, p. 1310-1316, 2004.

LADELY, S.R.; STOCK, R.A.; GOEDEKEN, F.K.; HUFFMAN R.P. Effect of corn hybrid and grain processing method on rate of starch disappearance and performance of finishing cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, p. 360-364, 1995.

LANDRY, J.; MOUREAUX, T. Heterogeneity of glutelins of corn seeds – selective extraction and composition of amino acids of 3 isolated fractions. **Bulletin de la Societe de Chimie Biologique**, Paris, v. 52, n. 10, p. 1021, 1970.

LANDRY, J.; DAMERVAL, C.; AZEVEDO, R.A.; DELHAYE, S. Effect of the opaque and floury mutations on the accumulation of dry matter and protein fractions in maize endosperm. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 43, n. 6, p. 549-556, 2005.

LARSON, J.; HOFFMAN, P.C. Technical note: a method to quantify prolamin proteins in corn that are negatively related to starch digestibility in ruminants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, p. 4834-4839, 2008.

LAWTON, J.W. Zein: a history of processing and use. **American Association of Cereal Chemistry**, Minnesota, v. 79, n. 1, p. 1-18, 2002.

LAZZARI, F.A.; LAZZARI, S.M.N. Aspectos sanitários da silagem de grãos úmidos de milho. In: Lazzari & Lazzari. **Silagem de grãos úmidos de milho**. Curitiba: Leal Ltda, 2001. p. 39-46.

LEEK, B.F. Digestão no estômago do ruminante. In: REECE, W.O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 404-437.

LOPES, A.B.R.C.; BIAGGIONI, M.A.M.; BERTO, D.A.; SARTORI, J.R.; BOFF, C.E. Método de reconstituição da umidade de grãos de milho e a composição química da massa ensilada. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, n. 1, p. 95-101, 2005.

MADER, T.; RUST, S. High moisture grains: harvesting, processing and storage. In: OKLAHOMA CATTLE GRAIN PROCESSING SYMPOSIUM, 9., 2006, Oklahoma. **Proceedings...** Oklahoma: OSBE, 2006. p. 88-92.

MADER, T.; GUYER, P.; STOCK, R. **Feeding high moisture corn**. Lincoln: University of Nebraska, 1983. 100 p. (Extension Circular, G74-100).

MANICKAM, I.N.; SURESH, S.R. Effect of moisture content and particle size on bulk density, porosity, particle density and coefficient of friction of coir pith. **International Journal of Engineering Science and Technology**, Chennai, v. 3, p. 2596-2602, 2011.

McALLISTER, T.A.; GIBB, D.J.; BEAUCHEMIN, K.A.; WANG, Y. Starch type, structure and ruminal digestion. In: OKLAHOMA CATTLE GRAIN PROCESSING SYMPOSIUM, 9., 2006, Oklahoma. **Proceedings...** Oklahoma: OSBE, 2006. p. 30-41.

McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2nd ed. Marlow: Chalcomb Publ., 1991. 340 p.

MELLO, R. Silagem de milho, sorgo e gramíneas tropicais. **Revista Eletrônica Nutritime**. Viçosa, v. 1, n. 1, p. 48-58, 2004.

MORAES, G.J.; COSTA, C.; MEIRELLES, P.R.L.; OLIVEIRA, K.; FACTORI, M.A.; ROSALES, L.A.; SANTOS, T.A.B. Produtividade e valor nutritivo das plantas de milho de textura dentada ou dura em três estádios de colheita para silagem. **Boletim da Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 65, n. 2, p. 155-166, abr./jun. 2008.

MORAIS, M.G.; ÍTAVO, C.C.B.F.; BUNGENSTAB, D.J.; RIBEIRO, C.B.; OLIVEIRA, L.B. Inoculação de silagens de grãos úmidos de milho, em diferentes processamentos. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, Salvador, v. 13, n. 4, p. 969-981 out./dez. 2012.

MOURA, A.M. **Milho diferindo no processamento para vacas leiteiras em pastejo**. 2013. 80 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

MUCK, R.E. Silage fermentation. In: ZEIKUS, G.; JOHNSON, E.A. (Ed.). **Mixed cultures in biotechnology**. New York: McGraw-Hill, 1991. p. 171-204.

MU-FORSTER, C.; WASSERMAN, B.P. Surface localization of zein storage proteins in starch granules from maize endosperm: proteolytic removal by thermolysin and in vitro cross-linking of granule-associated polypeptides. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 116, p. 1563-1571, 1998.

MURPHY, J.J.; DALBY, A. Changes in the protein fractions of developing normal and opaque 2 maize endosperm. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 48, p. 336-349, 1971.

NELLIS, S.E.; HOFFMAN, P.C.; SHAVER, R.D. A modified method to quantify prolamin proteins in dry and high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 96, p. 4647-4652, 2013.

NOCEK, J.E.; TAMMIMGA, S. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 74, n. 8, p. 3598-3629, 1991.

NISHINO, N.; SHINDE, S. Ethanol and 2,3-butanediol production in whole-crop rice silage. **Japanese Society of Grassland Science**, Senbonmatsu, v. 53, p. 196-198, 2007.

OWENS, F.N.; GOETSCH, A.L. Digesta passage and microbial protein synthesis. In: MILLIGAN, L.P.; GROVUM, W.L.; DOBSON, A. (Ed.). **Control of digestion and metabolism in ruminants**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1988. p. 196-223.

OWENS, F.N.; SODERLUND, S. Ruminal and post ruminal starch digestion by cattle: pioneer hi-bred. In: A DUPONT BUSINESS CONFERENCE, 5., 2007, Johnston. **Proceedings...** Johnston: DUPONT, 2007. p. 1-13.

OWENS, F.N.; ZINN, R.A. Corn grain for cattle: influence of processing on site and extent of digestion. In: SOUTHWEST NUTRITION CONFERENCE, 5., 2005, Tucson. **Proceedings...** Tucson: Nutriad, 2005. p. 86-112.

OWENS, F.N.; ZINN, R.A.; KIM, Y.K. Limits to starch digestion in the ruminant small intestine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 63, p. 1634-1648, 1986.

PAES, M.C.D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, CNPMS, 2006. 6 p. (Circular Técnico, 75).

PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; SPOELSTRA, S.F. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America, 2003. chap. 2, p. 31-93.

PASSINI, R.; SILVEIRA, A.C.; RODRIGUES, P.H.M.; CASTRO, A.L.; TITTO, A.L.; ARRIGONI, M.B.; COSTA, C. Digestibilidade de dietas a base de grão úmido de milho ou de sorgo ensilados. **Acta Scientiarum of animal Science**, Maringá, v. 24, n. 4, p. 1147-1154, 2002.

PEREIRA, E.S.; MIZUBUTI, I.Y.; RIBEIRO, E.L.A.; VILARROEL, A.B.S.; PIMENTEL, P.G. Consumo, digestibilidade aparente dos nutrientes e comportamento ingestivo de bovinos da raça Holandesa alimentados com dietas contendo feno de capim-tifton 85 com diversos tamanhos de partícula. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 1, p. 190-195, 2009.

PEREIRA, M.N.; VON PINHO, R.G.; BRUNO, R.G.S.; CALESTINE, G.A. Ruminant degradability of hard or soft texture corn grain at three maturity stages. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 4, p. 358-363, 2004.

PHILIPPEAU, C.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of genotype and stage of maturity of maize on rate of ruminal starch degradation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 68, p. 25-35, 1997.

PHILIPPEAU, C.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of genotype and ensiling of corn grain on in situ degradation of starch in the rumen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, p. 2178-2184, 1998.

PHILIPPEAU, C.; CHAMPION, M.; MICHALET-DOREAU, B. Influence du genotype et du stade de maturité sur la digestion ruminale de l'amidon de maïs récolté au stade ensilage. In: SYMPOSIUM ON SILAGE MAIZE, 9., 1996, Nantes. **Annales...** Nantes: INRA, 1996. p. 379-380.

PHILIPPEAU, C.; LANDRY, J.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of the protein distribution of maize endosperm on ruminal starch degradability. **Journal of Science of Food and Agriculture**, New Jersey, v. 80, p. 404-408, 2000.

PHILIPPEAU, C.; LE DESCHAULT de MONREDON, F.; MICHALET-DOREAU, B. Relationship between ruminal starch degradation and the physical characteristics of corn grain. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, p. 238-243, 1999.

PINTO, R.S.; DIAS, F.J.S.; COSTA, K.A.P.; BANY, V.L.; RIBEIRO, M.G. Qualidade da silagem de grãos úmidos de diferentes forrageiras. **Global Science and Technology**, Rio Verde, v. 5, n. 3, p. 124-136, 2012.

PIOVESAN, V.; OLIVEIRA, V.; GEWEHR, C.E. Milhos com diferentes texturas de endosperma e adição de alfa-amilase na dieta de leitões. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, p. 2014-2019, 2011.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1977. 290 p.

PRIGGE, E. Ensiling conditions and soluble nitrogen and high moisture corn utilization. In: OKLAHOMA CATTLE GRAIN PROCESSING SYMPOSIUM, 9., 2006, Oklahoma. **Proceedings...** Oklahoma: INTINT, 2006. p. 76-93.

PRYCE, J.D. A modification of Barker-Summerson method for determination of lactic acid. **Analyst**, Cambridge, v. 94, p. 1151-1152, 1969.

QUEIROZ, M.A.A.; SUSIN, I.; PIRES, A.V.; FERREIRA, E.M.; MENDES, C.Q.; MOURÃO, G.B. Características físico-químicas de fontes proteicas e suas interações sobre a degradação ruminal e a taxa de passagem, **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 7, p. 1587-1594, 2010.

REIS, W.; JOBIM, C.C.; MACEDO, F.A.F.; MARTINS, E.N.; CECATO, U.; SILVEIRA, A. Desempenho de cordeiros terminados em confinamento, consumindo silagens de milho de grãos com alta umidade ou grão de milho hidratados em substituição aos grãos de milho seco da dieta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 596-603, 2001.

RIBAS, M.N.; GONÇALVES, L.C.; HIBRAHIM, G.H.F.; RODRIGUEZ, N.M.; BORGES, A.L.C.C.; BORGES, I. Consumo voluntário e digestibilidade aparente de silagem de milho com grãos de diferentes vitreosidades. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 6, p. 104-115, 2007.

RIZZI, V. **Caracterização das enzimas chaves para o controle do metabolismo de lisina em milho (*Zea mays L.*) geneticamente modificado**. 2013. 113 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

ROBERTSON, J.A.; EASTWOOD, M.A. An investigation of the experimental conditions which could affect water-holding capacity of dietary fibre. **Journal of Science of Food and Agriculture**, New Jersey, v. 32, p. 819-825, 1981.

ROOKE, J.A.; HATFIELD, R.D. Biochemistry of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America, 2003. p. 251-304.

ROONEY, L.W.; PFLUGFELDER, R.L. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 63, p. 1607-1623, 1986.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide**: version 8.2. 5th ed. Cary, 2001. 846 p.

SHEWRY, P.R.; HALFORD, N.G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 947-958, 2002.

SHEWRY, P.R.; TATHAM, A.S. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. **The Biochemical Journal**, London, v. 267, n. 1, p. 1-12, 1990.

SIEMERINK, M.A.J.; KUIT, W.; LOPEZ CONTRERAS, A.M.; EGGINK, G.; VAN DER OOST, J.; KENGEN, S.W.M. D 2,3-butanediol production due to heterologous expression of an acetoin reductase in *Clostridium acetobutylicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 2, p. 2582-2588, 2011.

SOUZA, G.B. de; NOGUEIRA, A.R.A; RASSINI, J.B. **Determinação de matéria seca e umidade em solos e plantas com forno de micro-ondas doméstico**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2002. 9 p. (Embrapa Pecuária Sudeste, Circular Técnica, 33).

STONE, B.A. Cereal grain carbohydrates. In: HENRY, R.J.; KETTLEWELL, P.S. (Ed.). **Cereal grain quality**. London: Chapman & Hall, 1996. v. 9, p. 251-282.

TOMICH, T.R.; GONÇALVES, L.C.; TOMICH, R.G.P.; RODRIGUES, J.A.S.; BORGES, I.; RODRIGUEZ, N.M. Características químicas e digestibilidade in vitro de silagens de girassol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1672-1682, 2004. Suplemento, 1.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Ed.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164 p.

WATSON, S.A. Structure and composition. In: WATSON, S.A.; RAMSTAD, P.E. (Ed.). **Corn: chemistry and technology**. Minnesota: American Association of Cereal Chemists, 1994. v. 3, p. 53-82.

WEINBERG, Z.G.; MUCK, R.E. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. **FEMS Microbiology Reviews**, London, v. 19, p. 53-68, 1996.

WILES, P.G.; GRAY, I.K.; KISSLING, R.C. Routine analysis of protein by Kjeldahl and Dumas methods: review and inter laboratory study using dairy products. **Journal of the AOAC International**, Washington, v. 81, p. 620-632, 1998.

WILKINSON, J.M.; NEWMAN, G.; ALLEN, D.M. **Maize: producing and feeding maize silage**. Lincoln: Chalcombe, 1998. 73 p.

WINDLE, M. C. **The effects of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of corn silage and high moisture corn.** 2013. 131 p. Thesis (Doctor degree in Philosophy in Animal Science) – University of Delaware, Newark, 2013.

WINDLE, M.; MERRILL, C.; ROSA, L.; AGARUSSI, M.; SAVAGE, R.; ASAY, C.; WALKER, N.; KUNG Jr., L. The effects of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 96, suppl. 1, p. 313, 2013.

WOOLFORD, M.K. **The silage fermentation.** New York: Marcel Dekker, 1984. 350 p.

ZANOTTO, D.L.; BELLAVER, C. **Método de determinação da granulometria de ingredientes para uso em rações de suínos e aves.** Concórdia: EMBRAPA Suínos e Aves, 1996. 5 p. (Comunicado Técnico, 215).

ZOPOLLATTO, M. **Produtividade, composição morfológica e valor nutritivo de cultivares de milho (*Zea mays L.*) para produção de silagem sob os efeitos da maturidade.** 2007. 230 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

ZUBER, M.S.; DARRAH, L.L. Breeding, genetics and seed corn production. In: WATSON, S.A.; RAMSTAD, P.E. (Ed.). **Corn: chemistry and technology.** Minnesota: American Association of Cereal Chemists, 1994. v. 2, p. 31-51.