

**ÁCIDOS FENÓLICOS EM SILAGENS DE  
QUATRO CULTIVARES DE MILHO**  
*(Zea mays L.)*

**PEDRO SILVA DE OLIVEIRA**

**2010**



**PEDRO SILVA DE OLIVEIRA**

**ÁCIDOS FENÓLICOS EM SILAGENS DE QUATRO CULTIVARES DE  
MILHO (*Zea mays* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração Produção Animal, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Antônio Ricardo Evangelista

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Oliveira, Pedro Silva de.

Ácidos fenólicos em silagens de quatro cultivares de milho (*Zea mays* L.) / Pedro Silva de Oliveira. – Lavras : UFLA, 2010.

56 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Antônio Ricardo Evangelista.

Bibliografia.

1. Silagem. 2. Valor nutritivo. 3. Qualidade. 4. Composição química. 5. Digestibilidade. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.08552

**PEDRO SILVA DE OLIVEIRA**

**ÁCIDOS FENÓLICOS EM SILAGENS DE QUATRO CULTIVARES DE  
MILHO (*Zea mays* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração Produção Animal, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 23 de fevereiro de 2010

Dr. Jackson Silva e Oliveira	Embrapa – Gado de Leite
Prof. PhD Juan Ramon Olalquiaga Perez	UFLA
Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Adelir Aparecida Saczk	UFLA
Dr. Adauto Ferreira Barcelos	EPAMIG - Lavras

Prof. Dr. Antônio Ricardo Evangelista  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

## DEDICO

À minha esposa Beatriz, meus filhos Lucas e Eduardo, eternamente, todo o meu amor.

Ao meu pai (*in memoriam*), minha mãe e aos meus irmãos por me iniciarem nas primeiras letras.

À Sr.<sup>a</sup> Miyoko Yoshikawa (*in memoriam*), exemplo de bondade e sabedoria.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, Pai nosso... Aos Santos, Anjos e Espíritos de Luz.

À Universidade Federal de Lavras e aos Coordenadores e Professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da Bolsa

Ao Prof. Antônio Ricardo Evangelista e o Dr. Jackson Silva e Oliveira, mais do que orientadores, são homens de Boa Vontade.

Ao Programa de pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá-PR, na pessoa do Prof. Clóves Cabreira Jobim, pelo apoio e oportunidade de cursar as primeiras disciplinas.

À Prof.<sup>a</sup> Adelir A. Saczk, pela amizade e pelo irrestrito apoio nos estudos e análises de ácidos fenólicos.

Ao Prof. Joel Augusto Muniz pela amizade e orientações nos estudos estatísticos.

Aos Professores Juan Ramon Olalquiaga Perez e Elias Tadeu Fialho e ao Pesquisador Adauto Ferreira Barcelos, pelo constante incentivo e efetivo apoio.

Ao Prof. Eduardo Alves, pelo apoio nos estudos de microscopia eletrônica.

Ao Prof. Evaristo, pelas orientações nos estudos de anatomia vegetal.

Ao Prof. Daniel Pimenta, da Universidade Federal de Juiz de Fora, pela elaboração das fotografias das lâminas

Aos queridos companheiros de Curso pelo convívio e mútuo aprendizado.

À acadêmica Meiryene Carvalho, pela dedicação nas determinações químicas.

À acadêmica Thaís Fernandes pelo empenho nas análises estatísticas.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia da UFLA, em especial ao Carlos e Borginho.

À Meirerose (meirinha) e a todos os funcionários da Embrapa-Gado de leite, pelo generoso apoio na preparação das amostras, nas análises bromatológicas e nos estudos de digestibilidade.

A todas as pessoas que contribuíram indiretamente.



## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1 INTRODUÇÃO .....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 Silagem de milho: aspectos relativos à cultura e ao processamento.....	03
2.2 Silagem de milho: tamanho de partícula .....	08
2.3 Silagem de milho: fatores relacionados ao processo fermentativo.....	09
2.4 Silagem de milho: características nutritivas .....	11
2.5 Silagem de milho: constituintes da parede celular.....	14
2.6 Silagem de milho: ácidos fenólicos.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Materiais utilizados, local e instalação dos experimento.....	21
3.2 Preparação das silagens e preparo das amostras.....	22
3.3 Determinações químico-bromatológicas.....	24
3.4 Extração dos compostos fenólicos.....	25
3.5 Análises estatísticas.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Valor nutritivo das silagens.....	29
4.2 Quantificação dos ácidos fenólicos.....	35
4.3 Estudo morfológico com inferência sobre a qualidade das silagens.....	42
5 CONCLUSÕES.....	45
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46



## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Cromatograma dos padrões dos ácidos fenólicos ( $5,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ ): 1- ácido caféico (tr : 7,2 min.); 2 – Vanilina (tr : 9,1 min.); 3 – ácido para-cumárico (tr : 10,6 min.); 4 – ácido ferúlico (tr : 11,0 min.); 5 – ácido meta-cumárico (tr : 12,1 min.); 6 – ácido orto-cumárico (tr : 13,3 min.).....35
- FIGURA 2 Cromatograma da amostra de silagem de milho da cultivar BM2202. Identificação dos picos: 1= vanilina; 2 = ácido p-cumárico; 3 = ácido ferúlico; 4 = ácido meta-cumárico; 5= ácido orto-cumárico.....36
- FIGURA 3 Cromatograma da amostra de silagem de milho da cultivar BRS3003. Identificação dos picos: 1= vanilina; 2 = ácido p-cumárico; 3 = ácido ferúlico; 4 = ácido meta-cumárico; 5= ácido orto-cumárico .....37
- FIGURA 4 Cromatograma da amostra de silagem de milho da cultivar EMG501. Identificação dos picos: 1= vanilina; 2 = ácido p-cumárico; 3 = ácido ferúlico; 4 = ácido meta-cumárico; 5= ácido orto-cumárico .....38
- FIGURA 5 Cromatograma da amostra de silagem de milho da cultivar 30F90 Identificação dos picos: 1= vanilina; 2 = ácido p-cumárico; 3 = ácido ferúlico; 4 = ácido meta-cumárico; 5= ácido orto-cumárico.....39
- FIGURA 6 Imagens de cortes histológicos das folhas de quatro cultivares de milho, obtidas por meio de em microscopia de transmissão, com aumento de 3000X.....42
- FIGURA 7 Imagens de cortes histológicos das folhas de quatro cultivares de milho, obtidas com câmara montada sobre microscópio, com aumento 40X e a barra de escala equivale a 0,05mm. Destacando-se (círculos) a epiderme superior e inferior.....44

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Composição do gradiente da fase móvel.....	27
TABELA 2	Valores de matéria seca, proteína bruta, de pH e nitrogênio amoniacal das silagens produzidas com as quatro cultivares de milho.....	29
TABELA 3	Percentual de partículas das silagens de milho retidas nas peneiras.....	32
TABELA 4	Composição química e valores de digestibilidade <i>in vitro</i> da fração fibrosa das silagens produzidas com as quatro cultivares de milho. Valores com base na matéria seca.....	33
TABELA 5	Concentrações em ( $\mu\text{g}/\text{mgMS}$ ) de ácidos fenólicos nas silagens produzidas com as quatro cultivares de milho.....	40
TABELA 6	Coefficientes de correlações da composição químico-bromatológica e digestibilidade de silagens produzidas com quatro cultivares de milho.....	42

## RESUMO

OLIVEIRA, Pedro Silva de. **Ácidos fenólicos em silagens de quatro cultivares de milho (*Zea mays* L.)**. 2010. 56 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.<sup>1</sup>

No Brasil, as cultivares de milho para silagem são adaptadas à alta produtividade de grãos existindo variações quanto às frações entre e dentro das mesmas. Na fração planta menos grãos, foi observado que a digestibilidade chegou a 74%, demonstrando a importância desta. O grau de lignificação da parede celular constitui fator limitante na digestibilidade e os ácidos hidroxifenólicos estão envolvidos na associação da lignina com as hemiceluloses da parede celular. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da concentração de ácidos fenólicos sobre o valor nutritivo e qualidade das silagens de quatro cultivares de milho. Foram determinadas a concentração de ácidos fenólicos, a composição química e a digestibilidade *in vitro*. Os resultados foram analisados adotando-se o delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições. Os teores de MS ficaram abaixo do considerado ideal, apesar do corte para ensilagem aos 100 dias após a germinação o valor médio de pH 3,5 foi indicativo de boa fermentação e conservação do material, mas, podendo ter refletido nos valores de N-NH<sub>3</sub> que variou entre 16,5 a 22,75 g/100g (P<0,05). O estudo do tamanho de partículas indicou correta picagem das plantas, tendo as cv's. BM2202 e BRS3003 melhor se enquadrado nas recomendações do método (P<0,05). A cv. BRS3003 apresentou o maior teor de amido (P<0,05) e menor de FDN e lignina, correspondendo aos maiores valores de DIVMS. Houve diferenças (P<0,05) nos conteúdos de ácidos fenólicos, tendo a BRS3003 apresentado as menores concentrações, comprovando os valores de lignina e DIVMS observados. Os níveis dos ácidos fenólicos ratificaram os teores de lignina encontrados e ajudaram a explicar as diferenças observadas na DIVMS. As suas concentrações podem ser mais um parâmetro para a escolha de cultivares para silagem.

Palavra chave: Silagem de Milho, Ácidos, Fenólicos, Digestibilidade

---

Orientador: Antônio Ricardo Evangelista – UFLA (Orientador), Jackson Silva e Oliveira - Embrapa – Gado de Leite.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Pedro Silva de. **Acids phenolic in silages of four corn cultivars (*Zea mays* L.)**. 2010. 56 p. Thesis (Doctorate in Animal Science) – Federal University of Lavras, Lavras.<sup>1</sup>

In Brazil, the corn cultivars for silage are adapted to the high grain yield, variations existing as to the fractions both between and within of the same ones. In the fraction plant less grains, it was found that digestibility reached 74%, demonstrating the importance of this. The degree of lignification of the wall cell constitutes a limiting factor in digestibility and hydroxiphenoloic acids are involved in the association of lignin with hemicelluloses of the cell wall. The objective of this study was evaluating the effects of the concentration of phenolic acids on the nutritive value and quality of the silages of four corn cultivars. The concentration of phenolic acids, the chemical composition and *in vitro* digestibility were determined. The results were investigated by adopting the completely randomized design with four replicates. The DM contents were bellow the one regarded as ideal, in spite of the ensiling cut at 100 days after germination, the average value of pH 3.5, was indicative of good fermentation and conservation of the material, but, it may have reflected on the values of N-NH<sub>3</sub> which ranged from 16.5 to 22,75 g/100g (P<0.05). The study of the particle size pointed out correct plant chopping, cultivars BM2202 and RS3003 having fitted best in the recommendations of the method (P<0.05). Cultivar BRS3003 presented the highest content of starch (P<0.05) and lowest of NDF and lignin, corresponding to the greatest values of IVDMD. There were differences (P<0.05) in the phenolic acid contents, cultivar BRS3003 having shown the lowest concentrations, giving support to the values of lignin and IVDMD found. The levels of phenolic acids ratified the lignin contents found and helped to explain the differences found in IVDMD. Their concentrations can be a further parameter for the choice of silage cultivars.

Key words: Silage of corn, Acids phenolic, Digestibility,

---

Committee: Antônio Ricardo Evangelista – UFLA (Adviser) and Jackson Silva e Oliveira - Embrapa – Gado de Leite.

## 1 INTRODUÇÃO

Países de clima tropical, como o Brasil, enfrentam sérios problemas de desempenho na exploração pecuária causados pelos períodos de escassez de alimentos para bovinos, principalmente no inverno, quando na maior parte do país, as pastagens apresentam-se com baixa capacidade vegetativa. A pecuária intensiva, com base na exploração do elevado potencial de produção das forrageiras de clima tropical, requer a conservação de forragem de alta qualidade, para uso estratégico, a fim de atender as exigências do animal durante todo o ano. Um dos pontos que podem ser considerados essenciais para aumentar a eficiência nos sistemas de produção animal é a produção de volumosos de alta qualidade. Nos sistemas intensivos de produção, a silagem de milho figura como uma importante fonte de volumoso, desde que atendidos os critérios qualitativos associados à produção de biomassa vegetal (Nussio et al., 2000).

A escolha da cultivar de milho a ser utilizada torna-se essencial, para se obter uma silagem de alta qualidade e economicamente viável. À medida que os sistemas de produção animal, tanto de leite quanto de carne, tornaram-se mais produtivos e competitivos, maior passou a ser a preocupação com a qualidade da silagem de milho. Tem sido observada a existência de variabilidade entre híbridos tanto para produtividade de matéria seca como para qualidade. O principal item para o animal melhorar o desempenho produtivo está relacionado com a qualidade da planta, isto é, híbridos que proporcionem melhor digestibilidade da parede celular e, conseqüentemente, maior ingestão de matéria seca.

O grau de lignificação constitui um fator limitante na digestibilidade das forrageiras, entretanto, outros fatores, além da lignina, influenciam (Baucher et al., 1998; Boudet, 2000). Os ácidos hidroxifenólicos estão diretamente

envolvidos na associação da lignina com as hemiceluloses da parede celular. A concentração desses precursores da lignina e, principalmente, a associação com os carboidratos constituintes da parede celular, demonstram um papel importante sob os aspectos de fermentativos da fibra pelos microorganismos do rúmen. (Jung & Deetz, 1993).

Considerando-se a importância da digestibilidade, desenvolveu-se esse trabalho, com o objetivo de determinar a concentração de ácidos fenólicos em silagens produzidas com quatro cultivares indicadas pela Embrapa Gado de Leite, avaliando o efeito sobre o valor nutritivo e qualidade dessas silagens.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Silagem de milho: Aspectos relativos à cultura e ao processamento

O milho, planta da família Gramineae e da espécie *Zea mays* L. é, intensivamente, utilizado como alimento humano e ração animal. É uma gramínea domesticada na América Central, plantada por índios americanos, usando um sistema complexo que variava a espécie plantada de acordo com o seu uso.

A conservação de forrageiras através da ensilagem é um processo muito antigo, conforme documentam pinturas encontradas no Egito, entre 1.000 e 1.500 AC. Entretanto, os primeiros ensaios foram realizados no século XIX, na França e Alemanha, quando foi possível armazenar com sucesso o milho em fossos cavados no solo. Apesar do conhecimento antigo da técnica de ensilar, a mesma se tornou popular apenas no fim do século XIX quando, em 1877, o fazendeiro, francês A. Goffart publicou o primeiro livro sobre o tema com base na experiência com ensilagem. A palavra “silagem” deriva do Grego, “siros”, que significa um fosso ou buraco cravado no solo para armazenar milho (McDonald et al., 1991).

Woolford (1984) definiu silagem como “o produto formado quando gramíneas ou outro material contendo alta umidade, sujeito a deterioração por microorganismos aeróbicos, é armazenado anaerobicamente”. A silagem é produzida pelo processo de *ensilagem*, que é a alocação do material dentro de um recipiente ou estrutura chamado silo. No processo, o material pode ser constituído da planta inteira ou partes da planta, tal como a porção grão. O objetivo do armazenamento dentro de uma estrutura é preservar e prevenir o apodrecimento, como ocorre em uma compostagem. No Brasil não se tem ideia exata da época da introdução da ensilagem, mas é provável que tenha sido iniciada já no fim do século XVIII. A popularização da técnica da ensilagem

teve grande impulso na década de 1960, graças aos esforços de órgãos de extensão rural, fundações, universidades e cooperativas, resultando no começo dos trabalhos experimentais sobre os processos fermentativos. Milho e sorgo destacaram-se como recomendados para ensilagem devido à facilidade de fermentação, a alta produção de volumoso e de grãos, e o alto consumo pelos animais.

De acordo com a evolução do mercado, a silagem de milho passou por quatro fases tecnológicas distintas; na primeira a ênfase foi na produção de volume de massa verde. Com o incremento do nível genético dos rebanhos, a segunda fase caracterizou-se pela busca de maior qualidade de silagem visando à economia no uso de concentrados e aumento da produtividade do animal, para isso o enfoque foi dado na maior participação dos grãos. A terceira fase baseou-se no reconhecimento de que híbridos de alta digestibilidade da fração verde, combinados com a alta produtividade de grãos, resultam em silagens de melhor qualidade. E a quarta fase, conforme trabalhos pioneiros realizados por pesquisadores na França e no Brasil consideram a importância da textura dos grãos na digestibilidade e aproveitamento do amido pelos animais. Híbridos de grãos duros com alta resistência ao acamamento podem apresentar altos níveis de lignina ou fibras, resultando em menor digestibilidade tanto da fração verde como do amido.

Segundo Nussio (1991), o material mais utilizado para ensilagem é a planta de milho, devido a sua composição bromatológica, no ponto ideal de corte, preencher os requisitos para confecção de uma boa silagem como: teor de matéria seca (MS) entre 30% a 35%, e no mínimo de 3% de carboidratos solúveis na matéria original, baixo poder tampão e proporcionar boa fermentação microbiana. Caetano (2001) menciona que o ponto de colheita das plantas de milho para confecção de silagem é um fator importante na tomada de decisão, pois afeta diretamente a produção de forragem por área, a qualidade e o

consumo de silagem obtida, determinando os níveis de produtividade a serem alcançados e conseqüentemente os resultados econômicos em determinado sistema de produção animal.

O grau de adaptação dos diferentes genótipos ao ambiente, também é determinante para o sucesso na produção de silagem de milho. As cultivares indicadas para silagem no Brasil são materiais adaptados, principalmente devido a sua alta produtividade de grãos, sendo o principal argumento o de que as cultivares de milho com maior produção de grãos são as que contribuem para a melhor qualidade da silagem.

Conforme Silva (1997), isso se justifica devido ao grande número de trabalhos desenvolvidos na década de setenta, que demonstraram que os grãos de milho são mais digestíveis do que as folhas e a haste da planta; assim, aumentando a sua proporção na silagem, aumentaria a qualidade da forragem. Por isso deu-se preferência, na seleção para cultivares que possuíam mais de 40% a 50% de grãos no material ensilado (Nussio, 1990; Daccord et al., 1996).

Entretanto, de acordo com Vattikonda & Hunter (1983), trabalhos de pesquisa relatam que nem sempre os híbridos mais produtivos em grãos irão produzir silagens de maior valor nutritivo.

Além das características como produtividade, digestibilidade e percentual de grãos nas cultivares de milhos utilizados para produção de silagem, a textura do grão, dentada ou dura, é outra variável usada na escolha de genótipos. O milho dentado possui endosperma duro nos lados e farináceo no centro do grão. Ao secar, o amido presente no centro do grão de textura dentada reduz seu volume mais do que o localizado nas laterais criando uma depressão na parte superior do grão e assim se origina a indentação. Nos milhos duros, a maioria do endosperma é formada por material duro ou vítreo, sendo a proporção farinácea muito reduzida (Corrêa, 2001). Por outro lado, de acordo

com mesmo autor, alguns trabalhos de pesquisa enfatizam que híbridos de grãos dentados são mais susceptíveis a doenças e à ocorrência de grãos ardidos. Doreau & Phillippeau (1998) observaram que, no mesmo ponto de maturação, as cultivares de grãos dentados apresentam maior degradabilidade e digestibilidade do que as cultivares de grão duro. Os autores também verificaram que, com a ensilagem, a degradabilidade do grão duro aumenta, mas ainda permanece significativamente menor à observada no grão dentado.

A cultura do milho é fonte importante de alimento forrageiro e a busca por maior eficiência e economia na alimentação animal tem contribuído para mais atenção aos aspectos qualitativos da forragem utilizada (Fancelli & Dourado Neto, 2000). De acordo com Nussio (1990), estima-se que, nos últimos 35 anos, 20% do aumento da produção de leite nos Estados Unidos da América foi obtido pelo uso de forragem de melhor qualidade. A produtividade e qualidade do milho destinado à produção de silagem não se devem exclusivamente a cultivar utilizada. Fatores ambientais, bem como algumas práticas de manejo, também podem influenciar no resultado final. Dentre algumas, pode-se citar a época de semeadura, ponto adequado de colheita, tamanho de partículas, rapidez e eficiência no enchimento, compactação e vedação do silo, bem como na adoção de melhor altura de corte das plantas e no uso de aditivos (Fancelli & Dourado Neto, 2000).

Conceitualmente, as épocas ideais de semeadura referem-se ao período em que a cultura tem maior probabilidade de encontrar as condições climatológicas favoráveis para maximizar o crescimento, o desenvolvimento e a produtividade (Shaw, 1977). A época de semeadura do milho, por exemplo, considerada como ideal em Minas Gerais, corresponde aos meses de outubro a novembro. Nesse período, as precipitações tendem a ser mais frequentes e as temperaturas diurnas e noturnas mais elevadas (Ramalho, 1999). Porém, produtores em Minas Gerais, normalmente, realizam a semeadura de outubro até

dezembro, podendo, em alguns casos, estender-se até janeiro. Ressalta-se que, nas semeaduras tardias, o principal problema é o risco de pouca precipitação durante as fases de florescimento e enchimento dos grãos uma vez que esses processos ocorrerão durante os meses de março, abril e maio, períodos de baixas precipitações (Avelar et al., 1996; Gonçalves et al., 1996).

Em relação à época de colheita, Gordon et al. (1968) e Daynard (1978) já citavam que o ponto ideal de corte das plantas de milho para silagem está relacionado com o momento em que a planta apresenta alto rendimento de matéria seca, alto teor de amido e baixo teor de fibra. A porcentagem de matéria seca deve estar entre 30 a 40%, o que ocorre no estágio em que os grãos apresentem a linha de leite entre 1/3 e 2/3, a partir do topo do grão em direção ao sabugo e a consistência dos grãos estaria variando entre o estágio pastoso e o farináceo-duro.

A colheita, quando efetuada com teores de matéria seca acima de 37%, não é recomendável, pois as folhas encontram-se mais secas, acarretando maiores perdas durante o corte, além do fato de dificultar a compactação e a eliminação do ar da massa ensilada (Nussio, 1990).

Villela (2001) estudou a influência da época de semeadura (novembro a dezembro) e de corte (meia linha de leite e grãos na maturidade fisiológica) sobre características agronômicas do milho e a qualidade de sua silagem e verificou que o atraso tanto nas datas de semeadura e de corte das plantas resultou em menor produtividade e valor nutritivo da silagem. A semeadura realizada em novembro para região Sul de Minas Gerais e o corte realizado quando a linha de leite apresentava-se na metade dos Grãos foram os ideais para a obtenção de silagens de boas características nutritivas.

Visando obter silagem mais nutritiva, uma prática já utilizada por alguns produtores é o aumento da altura de corte das plantas a serem ensiladas, em

razão do aumento da participação de grãos na matéria seca total colhida, aumentando, conseqüentemente, o conteúdo energético da silagem. Segundo Hutjens (2000), para cada 15 cm na elevação da altura de corte se espera uma redução de 1% no teor de FDA do material colhido, sendo a redução na produção de matéria seca obtida de aproximadamente 850 kg/ha. Entretanto, as vantagens relacionadas com a conservação e a melhoria da fertilidade do solo, obtidas quando da elevação da altura de corte na colheita da plantas de milho para a produção de silagem, devem ser consideradas (Shaver, 2000).

## **2.2 Silagem de milho: tamanho de partícula**

Do ponto de vista nutricional, a diminuição no tamanho de partícula pode interferir no aumento da taxa de passagem, promovendo alterações no consumo voluntário do animal, e por conseqüência, no seu desempenho (Evangelista et al., 2004). Conforme Aguiar et al. (2000), tamanhos de partículas mais reduzidos podem favorecer a fermentação, uma vez que facilita a compactação, aumenta a exposição dos carboidratos solúveis e aumenta a superfície de contato para a atuação dos microorganismos.

A mensuração do tamanho médio das partículas de forragem a ser ensilada pode ser feita com diferentes metodologias e apresenta grande variabilidade. Em 1996, um grupo de pesquisadores, chefiados pelo Dr. Jud Heinrichs, da Universidade do Estado da Pensilvânia (EUA), desenvolveu o sistema chamado de Penn State Particle Size Separator que se constitui em um sistema de três bandejas. Cada bandeja possui perfurações com um diferente diâmetro; após a movimentação do conjunto, a primeira bandeja retém partículas com diâmetro superior a 19 mm, a segunda retém partículas com diâmetro entre 7,8 e 19 mm e a última, com fundo fechado, retém aquelas com diâmetro inferior a 7,8 mm. Depois de separadas, as quantidades são anotadas em uma planilha e através de uma distribuição estatística logarítmica do tipo Weibull é

calculado o tamanho médio das partículas da silagem. O método foi desenvolvido para ser trabalhado principalmente com silagem de milho e sistemas de dietas completas (volumoso + concentrado) à base de silagem de milho.

Balsalobre et al. (2001) discutem que a redução do tamanho de partículas da forragem pode ser uma alternativa na minimização da fermentação butírica, por promover maior compactação e um maior contato do substrato com as bactérias fermentadoras, permitindo a maior produção de lactato e queda rápida de pH. Loures (2000) mencionou que, para produzir silagens de qualidade satisfatória, é necessário que se promova intensa compactação, pois essa está diretamente relacionada com a densidade da massa ensilada. No entanto, quanto maior a compactação da massa ensilada, maior a chance de haver aumento na produção de efluentes, estando esse efeito, dependente do teor de matéria seca da planta ensilada.

### **2.3 Silagem de milho - fatores relacionados ao processo fermentativo**

A fase fermentativa é a principal definidora da qualidade da silagem produzida, por refletir o processo de ensilagem e as características intrínsecas à planta. Consiste na conversão de carboidratos solúveis em ácidos orgânicos, por meio de microorganismos inerentes ao próprio ambiente (Reis et al., 2004). Por sua vez, a qualidade da fermentação depende do ponto de colheita; da quantidade de açúcares fermentáveis; do poder tampão da massa; da população de microorganismos lácticos; do tamanho das partículas; da taxa de vedação para a manutenção da anaerobiose; velocidade de enchimento do silo; taxa de compactação; uso de aditivos; tipo de silo e da drenagem dos efluentes (Fancelli & Dourado Neto, 2000).

Os processos bioquímicos e microbiológicos envolvidos na transformação, em meio anaeróbio, da forragem fresca em silagem e na sua utilização, podem ser divididos em várias etapas (Rotz & Muck, 1994). A primeira delas tem início quando a planta é colhida, nessa fase os microrganismos aeróbicos epífitos respiram convertendo carboidratos solúveis em dióxido de carbono, água e calor. As próprias enzimas das plantas também promovem hidrólise de amido e da hemicelulose a monossacarídeos. Desta forma, o oxigênio contido na massa ensilada é rapidamente consumido após o fechamento do silo. Sob condições ideais de umidade, tamanho de partículas e compactação a atividade aeróbica pode durar poucas horas (McDonald et al., 1991). A fase aeróbica resulta em perdas de matéria seca e de nutrientes, contudo, ajuda a criar um ambiente anaeróbico produzindo certas toxinas que podem servir para estender a estabilidade aeróbica da silagem durante a fase de utilização após a abertura do silo (Woolford, 1984).

Após todo o oxigênio ser consumido, durante a fase inicial aeróbica da ensilagem, inicia-se a segunda fase, a de fermentação. De acordo com Soest (1994), o tempo de fermentação depende, principalmente, do teor de carboidratos solúveis, da capacidade tamponante e do conteúdo de umidade da planta, durando, normalmente, entre 10 a 14 dias e os microrganismos anaeróbicos que se desenvolvem na silagem fermentam hexoses (glicose e frutoses) e pentoses (ribose e xilose), produzindo etanol, ácidos graxos voláteis, ácido lático e CO<sub>2</sub>.

Segundo Woolford (1984), as enterobactérias, por tolerarem o calor produzido na primeira etapa, iniciam o processo fermentativo, seguidas pelas bactérias heterofermentativas. Esses dois grupos de microrganismos criam um ambiente favorável para as bactérias homofermentativas, que são viáveis em pH abaixo de 5,0. A queda no pH sinaliza o final da fase anaeróbica inicial, que geralmente ocorre entre 24 a 72 horas após a ensilagem. A preservação da



forragem no silo, normalmente, depende da atividade das bactérias lácticas, as quais fermentam açúcares produzindo ácido láctico e outros produtos. Em condições adequadas, esse grupo de bactérias tende a crescer rapidamente e produz compostos que inibem as demais bactérias (Reis et al., 2004).

Ao atingir o pH próximo de 4,0, a população de bactérias é inibida, os processos de produção de ácidos se interrompem e tem início a fase de estabilidade, que se prolonga até que o silo seja aberto e a silagem volte a ter contato com o oxigênio (Oliveira, 1998).

#### **2.4 Silagem de Milho: Características nutritivas**

De acordo com Mechin (2000), se a silagem de milho é confeccionada corretamente, o fator palatabilidade não apresenta importância, da mesma forma os teores de nitrogênio apresentam pouco efeito nos critérios de avaliação devido ao milho apresentar como característica baixos teores em proteína. Vilela (1998) evidenciou que os parâmetros normalmente empregados como critérios de classificação da qualidade da silagem abrangem o pH, os ácidos orgânicos e nitrogênio amoniacal como porcentagem do nitrogênio total.

Os principais parâmetros empregados para avaliação da composição química-bromatológica são a porcentagem de fibra em detergente neutro (FDN), a porcentagem de fibra em detergente ácido (FDA), cinzas, extrato etéreo, proteína, e, por diferença, carboidratos não fibrosos (Nussio, 1990; Coors et al., 1994). A porcentagem de FDN e de FDA, por se referirem à fibra, servem também como indicativo do consumo e da digestibilidade, respectivamente, dos materiais (Nussio, 1990). A degradação da parede celular da forragem está diretamente relacionada com a sua estrutura, com o tipo e proporções dos constituintes químicos presentes. A lignina, por exemplo, é parcialmente solubilizada (solubilização dos complexos carboidratos-lignina, demetilação,

deidroxilação e redução da lignina) durante a degradação, além de limitar a utilização dos outros constituintes da parede (Baucher et al., 1998).

A digestibilidade é a fração do alimento degradada no trato digestivo, sendo a fração indigestível excretada principalmente sob a forma de fezes. Pode-se determinar a digestibilidade da dieta total (digestibilidade da matéria seca) e de frações da dieta ou nutrientes isolados (digestibilidade da matéria orgânica, da FDN, da FDA, de proteínas, minerais, aminoácidos, entre outros), havendo vários métodos; digestibilidade *in vivo*, digestibilidade *in situ* e digestibilidade *in vitro* (Mahanna, 1994).

Na determinação da digestibilidade pela forma *in vivo*, o animal padrão utilizado seria o ovino e, associado à digestibilidade poderia ser determinada a ingestão da MS, da matéria orgânica (MO) ou da FDN (Ferreira, 2003). Entretanto, a determinação da ingestão com o uso de ovinos para a simulação de consumo de bovinos apresenta pouco valor, já que existem grandes diferenças entre ambos, como exemplo, ao contrário dos bovinos, os ovinos apresentam como característica alta capacidade de seleção (Berchielli et al., 2006). O objetivo de experimentos de digestibilidade é obter de forma acurada, a quantidade de alimento fornecido e a quantidade excretada em determinado período de tempo (Merchen, 1988).

A digestibilidade *in situ*, método denominado como a técnica do saco de náilon, dracon, poliéster ou degradabilidade *in sacco* ou *in situ*, propicia uma estimativa rápida e simples da degradação dos nutrientes no rúmen, além de permitir o acompanhamento de degradação ao longo do tempo (Mehrez & Ørskov, 1977). Baseia-se no desaparecimento da amostra de alimento acondicionada em sacos de náilon ou outro material sintético e incubados no rúmen por diferentes períodos de tempo.

Os métodos *in vitro*, teoricamente, devem ser capazes de representar o processo de digestão que ocorre no rúmen, abomaso ou intestino para estimar

quantitativamente a taxa e o grau de digestão similar aos obtidos *in vivo*. Por serem realizados no próprio animal, os experimentos *in vivo* são considerados os mais confiáveis, apresentando, entretanto, certos inconvenientes, como requerimento de grande quantidade de alimentos, número alto de repetições e o elevado custo análises e mão de obra, fazendo com que aumente a procura por métodos *in vitro*, que propiciam a avaliação da digestibilidade a baixo custo e curto prazo (Berchielli et al., 2006).

Segundo Holden (1999), Mabjeesh et al. (2000) e Santos et al. (2000), a digestibilidade *in vitro* nos permite realizar a avaliação simultânea de um grande número de amostras. Permitindo, desta forma, redução nos gastos com animais, alimentos e mão-de-obra. Diferentes métodos podem ser utilizados para a determinação da digestibilidade *in vitro*, mas metodologia desenvolvida por Tilley & Terry (1963) que faz uso de líquido ruminal, é ainda a mais utilizada. Existe também a determinação da digestibilidade da parede celular (DINAGP – não amido, não açúcar solúvel e não proteínas) a partir do método NIRS (Argillier & Barrière, 1996).

Como a digestibilidade é uma das mais importantes características de qualidade de uma forragem, o percentual de matéria seca degradável no rúmen é uma informação muito útil e que pode ser utilizada para a escolha de uma cultivar de milho para silagem (Oliveira et al., 1999).

Hunt et al. (1989) e Mahanna (1994) observaram, em seus trabalhos a relação entre digestibilidade da silagem e o desempenho animal. Segundo Barrière & Emile (2000), o fator determinante para o animal apresentar resposta em nível de produção está relacionado com a qualidade da planta, ou seja, híbridos que proporcionem melhor digestibilidade da parede celular e, conseqüentemente, alta ingestão de MS.

## **2.5 Silagem de Milho: Constituintes da parede celular**

A parede celular é formada pela parede primária (PP), contém celulose, hemicelulose, lignina, substâncias pécnicas e proteínas; pela parede secundária (PS) formada por celulose, hemicelulose e lignina, o que lhe confere resistência e pela lamela média, constituída de substâncias pécnicas que cimentam células adjacentes. A parede é uma estrutura molecular complexa que recobre o protoplasma vivo, o que permite a adaptação das plantas a quase todos os microclimas do planeta (Cassab, 1998).

O principal componente da parede celular é a celulose, constituída por numerosos monômeros de glicose ligados pelas extremidades. A celulose é o polissacarídeo mais abundante da parede celular. Sua unidade base é a celobiose, um dissacarídeo formado por ligações 1 → 4 de dois resíduos β-glucopiranosídeo. Apresenta-se impregnada por outras substâncias poliméricas e não é digerida pelos animais que não possuem enzimas para quebrar as ligações β, à exceção dos animais herbívoros, que possuem bactérias e protozoários simbióticos que digerem a celulose em seus tratos digestórios (Wilson, 1993).

Os polissacarídeos não celulósicos mais abundantes encontrados na natureza são as hemiceluloses. Ocorrem nas paredes celulares das plantas, localizam-se dispostas entre celulose e lignina. São constituídos por polímeros lineares ou ramificados, contendo entre dois a seis diferentes açúcares ou seus derivados. Por meio de hidrólise, as hemiceluloses dão uma mistura de hexoses (glicose), de pentoses (xilose, arabinose) e de ácido urônico (ácido glucorônico). Desta forma, por apresentar heterogeneidade estrutural, existem diferenças entre a composição das hemiceluloses nas diferentes plantas (Moore-Landecker, 1996).

A pectina consiste essencialmente de ácido galactorônico, e em determinados pontos da sua cadeia, ocorre a substituição de arabinanos e galácticoptanos. Os grupos ácidos são combinados com íons de Ca e/ou éster

metil. Os polímeros de pectina estão presentes em quantidades bastante baixas nas plantas monocotiledôneas, particularmente nas gramíneas (por volta de 10 g/kg de parede celular), enquanto que nas dicotiledôneas é notadamente mais elevada (por volta de 200 a 300 g/kg de parede celular) (Hatfield, 1989).

A lignina é um limitante para a degradação da parede celular (Jung, 1989; Jung & Deetz, 1993). A deposição da lignina aumenta com a maturação fisiológica e diminui a digestibilidade dos polissacarídeos estruturais pelos ruminantes (Terry & Tilley, 1964; Nascimento Júnior, 1974; Hatfield, 1993; Burns et al., 1997; Deschamps, 1999; Reis et al., 2001). A lignificação inicia-se após a fase de alongamento celular e concentra-se inicialmente na lamela média e na parede primária (PP). Após essa fase de alongamento celular ela se difunde na parede secundária (PS). Devido à maior proporção de células digestíveis presentes na PP e lamela média, as concentrações de lignina são mais importantes nessas duas regiões do que nas PS. Porém, nesta última é que se encontra a maior parte das ligninas (Baucher et al., 1998).

Lignina é um polímero derivado de unidades fenilpropanóides denominadas  $C_6C_3$  ou, simplesmente, unidades  $C_9$ , repetidas de forma irregular, que têm sua origem na polimerização desidrogenativa do álcool coniferílico. Lapiere (1993) classificou a lignina em *core* e *não core*, com base em sua susceptibilidade relativa à hidrólise. Lignina *não core*: consiste de compostos fenólicos de baixo peso molecular, liberados da parede celular por hidrólise, que é representada por ácidos *p*-hidroxicinâmico ésteres-ligados. Lignina *core*: consiste de polímeros fenilpropanóides da parede celular, altamente condensados e muito resistentes à degradação. Eles são compostos de unidades *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S), em proporções diferentes, de acordo com sua origem. Sarkanem & Ludwig (1971), citados por Saliba et al. (1999), observaram que a quantidade relativa da fração molar de aldeídos

produzidos pela reação de oxidação com nitrobenzeno é um indicador da abundância relativa das unidades C<sub>9</sub> (H, G e S). Assim, numa classificação inicial de ligninas segundo a presença dessas unidades, tem-se que: ligninas de madeiras duras, ou angiospermas, são formadas principalmente de unidades G e S; ligninas de madeiras moles, ou gimnospermas, são formadas fundamentalmente de unidades G; ligninas de gramíneas compreendem G-S-H. Porém, existem ligninas de certas espécies de gimnospermas e de gramíneas que apresentam abundância de G e S (Chen, 1991).

Ligninas de plantas herbáceas são do tipo S-G, sendo mais parecidas com as ligninas de angiospermas que de gimnospermas (Sarkanen & Ludwig, 1971 citados por Saliba et al. (1999). Portanto, em uma conceituação mais precisa, as ligninas são classificadas nos seguintes grupos: Tipos G; G-S; e H-G-S (Chen, 1991; Piló-Veloso et al., 1993). Em estudos realizados por Saliba et al. em 1999, pode-se verificar que a lignina da folha do milho é do tipo H-G-S.

Em plantas herbáceas, a lignina não pode ser definida apenas como proveniente de derivados ácidos fenólicos. Deve-se trabalhar com as definições *core* e *não core* para descrever o material residual e os componentes ácidos hidrocínâmicos liberados durante a hidrólise. Assim, essas definições, segundo Ralph & Helm (1993), são convenientes para investigações dentro do aspecto nutricional das forragens, bem como para comparar a composição das plantas, pois esta terminologia discute aspectos moleculares da estrutura da lignina. Portanto, somente derivados do ácido hidrocínâmico, que estão covalentemente ligados aos polímeros da parede celular, são liberados durante a hidrólise, constituindo a chamada lignina *não core*. Consequentemente, derivados de ácidos hidrocínâmicos que compõem a lignina através de ligações inter-resistentes a hidrólise, pela definição, constituem as ligninas *core*.

As ligninas asseguram o bom funcionamento dos tecidos de sustentação e de condução da seiva, além de proteger a planta contra agentes patógenos, pois a mesma constitui-se uma barreira fisicoquímica efetiva (Baucher et al., 1998).

O grau de lignificação da parede celular constitui igualmente um fator limitante na digestibilidade das forragens (Baucher et al., 1998; Boudet, 2000). Como a lignina está ligada covalentemente à hemicelulose, e não à celulose, esperar-se-ia que os efeitos negativos afetassem a primeira e não a segunda, entretanto, a redução na digestibilidade da celulose pode acontecer como resultado da ação limitada das celulasas sobre a celulose, porque os feixes de celulose se apresentam dispersos em uma matriz de hemicelulose e lignina (Jung, 1989).

O espessamento da parede celular e o aumento da área ocupada pelo tecido vascular lignificado afetam negativamente a digestibilidade (Wilson, 1997; Brito et al., 1999). Parece que a concentração de lignina presente na parede celular das forrageiras não é suficiente para explicar determinadas variações na digestão de forragens ou em parte das mesmas (Morrison et al., 1998; Deschamps, 1999).

De acordo com Morrison et al. (1998), Deschamps (1999) e Barrière & Emile (2000), outros fatores além do teor em lignina influenciam na digestibilidade, ou seja, o arranjo da lignina e seus precursores com os demais componentes da parede celular, podem ser os responsáveis por boa parte das limitações observadas na digestão das forragens.

## **2.6 Silagem de Milho: Ácidos fenólicos**

Conforme Simões et al. (2007), os compostos fenólicos são metabólitos secundários provenientes da via metabólica do ácido chiquímico a partir de carboidratos, ou pela via do acetatopolimalato que se inicia com a acetil-cenzima

A e malonil-coezima A. Em razão da grande diversidade de processos metabólicos na formação de substâncias fenólicas, é difícil estimar o teor quantitativo nos tecidos das plantas de um modo absoluto (Evaristo & Leitão, 2001). De acordo com Santos et al. (2001), a cada espécie vegetal está associada uma determinada família de polifenóis como prevalecente, cujos teores aumentam com a idade e variam com o estágio de desenvolvimento das plantas. As substâncias fenólicas mais comumente encontradas em plantas são os ácidos fenólicos, flavonóides e taninos.

Os ácidos fenólicos têm como característica o fato de apresentarem um anel benzênico, um ou mais grupamentos carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e ou metoxila e outros substituintes na molécula (Soares, 2002).

A determinação de ácidos fenólicos em amostras de forragens pode oferecer informações importantes para a compreensão das limitações envolvidas na digestão ruminal da parede celular das espécies forrageiras, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) uma ferramenta adicional para a determinação dos principais ácidos fenólicos envolvidos na lignificação e na interligação da lignina com os carboidratos da parede celular vegetal (Deschamps & Ramos, 2002).

Lage (2009) cita que os ácidos fenólicos são divididos em três grupos, o primeiro é composto pelos ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C6-C1) e são os ácidos mais simples encontrados na natureza. O segundo grupo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C6-C3), sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal; os ácidos: cinâmico, o-cumárico, p-cumárico, m-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico. Como terceiro grupo tem-se as cumarinas que são uma classe de metabólitos secundários derivados do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido o-cumárico.



Os ácidos vanilínico, gálico e elágico, derivados do ácido benzóico são importantes na nutrição de ruminantes, possuindo estreita ligação com a composição da lignina (Simões et al., 2007). O ácido cinâmico apresenta entre seus ácidos derivados os ácidos p-cumárico, caféico e ferúlico. Esses ácidos estão diretamente envolvidos na associação da lignina com as hemiceluloses da parede celular. O ácido o-cumárico também derivado do ácido cinâmico tem distribuição restrita, mas é importante por originar facilmente, através da ciclização, a cumarina, que é um constituinte freqüentemente responsável pelo odor nos vegetais (Simões et al., 2007). Os ácidos fenólicos, principalmente os ácidos p-cumárico e ferúlico agem como unidades precursoras na formação da lignina nas plantas (Brito et al., 2003).

Os ácidos fenólicos, principalmente p-cumárico e ferúlico, estão diretamente envolvidos na associação da lignina com as hemiceluloses da parede celular. As principais formas de interação molecular estão bem estabelecidas e envolvem ligações éster e éter com os carboidratos e unidades condensadas da lignina (Jung & Deetz, 1993). Alguns estudos histológicos têm demonstrado que tecidos contendo lignina são pouco ou, praticamente, não degradados pelos microrganismos do rúmen (Akin, 1988). Entretanto, adicionalmente, alguns tecidos não lignificados também apresentam baixa digestão ruminal. Este fato pode ser justificado pela ligação destes tecidos com moléculas de baixo peso molecular.

No colmo do milho enquanto ocorre aumento do ácido p-cumárico com a maturidade, o nível de ácido ferúlico permanece constante (Chabbert et al., 1994). As ligações de ácido ferúlico podem ser estruturalmente importantes devido à intensificação das propriedades mecânicas das paredes celulares em gramíneas. O ácido ferúlico também está envolvido na extensibilidade, pois o mesmo causa um decréscimo na capacidade de extensão da parede celular.

Segundo Jung (1989), o ácido ferúlico está especificamente localizado entre as frações da hemicelulose da parede celular, seja por ligações éster como éter. Tem-se postulado que, nas plantas jovens, o complexo éster-ácido ferúlico está presente em locais iniciadores para a polimerização da lignina (Morrison et al., 1998). Com o envelhecimento dos tecidos, inicia-se maior deposição de ácido p-cumárico éterificado e esterificado. O ácido ferúlico é incorporado dentro da parede celular em taxas mais elevadas no início do estágio de lignificação (Jung & Allen, 1995).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais utilizados, local e instalação do experimento

Quatro cultivares de milho para silagem (BM2202, BRS3003, EMG501, 30F90), indicadas pelo Ensaio Nacional de Avaliação de Milho para Silagem (ACMS), foram cedidas pelas respectivas empresas Biomatrix; Embrapa Milho e Sorgo; Agenciarrural (Agência Goiana de Desenvolvimento Rural e Fundiário); Pioneer. As cultivares são de ciclo precoce e produzem grãos semi-duros, com exceção da cultivar EMG501, cujo tipo de grão é dentado ou mole. O experimento foi instalado em área de plantio no Setor de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), estando a cidade de Lavras situada na região Sul do Estado de Minas Gerais, a 21°14' de latitude sul e 45° 00' de longitude oeste, a uma altitude média de 918m acima do nível do mar. O clima do município se caracteriza como Cwb (classificação de Koppen), com temperatura média de 22,5°C no mês mais quente e 15,8° no mês mais frio, sendo a temperatura média anual de 19,4°C. A precipitação média anual é de 1530 mm, a evaporação total no ano é de 1034,3 m e a umidade relativa média anual é de 76,2% (Brasil, 2008).

O plantio, mecanizado, foi realizado no dia 10 de dezembro de 2007. Formou-se, para cada uma das cultivares, quatro linhas com tamanho médio de 100 m lineares cada linha, espaçadas de 0,80m, prevendo-se uma densidade de 55000 plantas por hectare. No momento da semeadura, foram aplicados nas linhas, 400 kg/ha da formulação 08-28-16 + 0,5% de Zn. Foram realizadas duas adubações de cobertura com 200 kg/ha da fórmula 30-00-20. A primeira em 14/01/2008, após as plantas terem atingido quatro a cinco folhas e a segunda em 24/02/2008, quando as plantas já estavam com oito a nove folhas. No dia seguinte ao plantio, foi realizada a aplicação de herbicida pós-plantio e no decorrer do ensaio, foram efetuados os controles de ervas - daninhas, de pragas e

doenças tão logo surgiam os primeiros indicativos da necessidade dessas práticas.

### **3.2 Produção das silagens e preparo das amostras**

Previamente ao corte foi realizada, no dia 10 de março de 2008, a avaliação da lavoura quanto ao desenvolvimento das plantas e, na semana seguinte, em 20/ 03/08, avaliou-se as espigas quanto ao enchimento e consistência dos grãos. O corte foi realizado de modo mecanizado, nos dias 24 e 25 do mês de março de 2008, seguindo-se o critério de acompanhamento visual da evolução da linha de leite nos grãos centrais das espigas com mais de 1/3 do grão (Oliveira et al., 1998; Cruz et al., 2005)

Para o estudo morfológico das camadas estruturais, foi retirada, em três plantas coletadas, aleatoriamente, nas linhas centrais de plantio de cada híbrido, a fração de 5 cm dos colmos, cortados a 20 cm abaixo do ponto de inserção da espiga principal, que foram colocados em sacos plásticos identificados, ficando armazenados em caixa de isopor com gelo. Nesta mesma operação, foram retirados, em cada folha localizada, imediatamente, abaixo do ponto de inserção da espiga principal, cinco centímetros de lamina foliar, cortada a 20 cm da bainha de inserção, que foram colocadas em microtubos identificados, contendo solução fixativa (paraformaldeído 2% mais glutaraldeído 25%) que ficaram também armazenados nas mesmas condições. As amostras de colmos e de folha foram encaminhadas ao laboratório de microscopia para serem preparadas para observação aos microscópios eletrônicos de Transmissão, conforme metodologia de Bossola & Russell (1998). Entretanto, as amostras de colmos foram perdidas devido a problemas na conservação sob refrigeração, tendo sido feitas, somente a preparação e a observação das amostras das folhas, no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural (LME) do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

Seguindo a metodologia dos autores citados, o limbo foliar, desprezando-se a nervura central, a 20cm da bainha, foi cortado, transversalmente, em pedaços de 1mm<sup>2</sup> e, para cada cultivar, dois pedaços de cada lado do limbo foliar foram armazenados em microtúbulos contendo solução fixativa (Karnovsky's modificado), pH 7,2 por um período de 24 h, lavados em tampão cacodilato (três vezes de 10 min), pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora, lavados duas vezes por 15 min em água destilada, transferidos para solução a 0,5 % de acetato de uranila durante 12h a 4°C e em seguida, lavados novamente em água destilada e desidratados em gradiente de acetona (25, 50, 75, 90 e 100 % por três vezes). Em seguida, o material foi incluído em gradiente crescente de Spurr/acetona 30 % (8h), 70 % 12 h e 100 % duas vezes por 24 h cada, sendo as amostras de cada cultivar montadas em moldes e colocadas para polimerizar em estufa a 70°C por 48 h (Bossola & Russell (1998).

Os blocos obtidos foram levados a um aparelho de "Trimming" para a retirada dos excessos. Em seguida, secções semifinas (0,85µm) foram cortadas usando-se um ultramicrotomo Reichert-jung (ultracut E), com o auxílio de navalha de diamante. Os cortes semifinos foram coletados com anel de ouro, colocados em lâminas de vidro, coloridos com azul de toluidina (1g azul de toluidina, 1 g borato de sódio e 100 mL água), filtrados em filtro Millipore (0,2µm) e montados permanentemente em meio Permalt. As secções foram pós-contrastadas em acetato de uranila, seguido por acetato de chumbo por 3 min cada e, em seguida, examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 a 80 kv. Finalizando o estudo, a captura das imagens foi através de uma câmara Canon PC1200 sobre um microscópio Olympus BX41, utilizando a aproximação de 40 X, no Laboratório de botânica da Universidade Federal de Juiz de Fora.

As demais plantas de cada cultivar foram picadas com ensiladeira da marca Nogueira, modelo JF90, acoplada ao trator, regulada para corte de 30 mm. Parte do material ficou armazenado em silos de laboratório construídos em tubos de polietileno com 40 cm de altura e 9,75 cm de diâmetro, outra parte foi ensilada em tambores plástico (bombonas) com válvula tipo Bunsen adaptadas na tampa para a eliminação de gases, com capacidade aproximada para 150 kg de forragem verde picada. As referidas bombonas foram mantidas em galpão no Departamento de Zootecnia da UFLA para posteriores estudos de consumo e desempenho, cujos resultados não compõem o presente trabalho.

Os silos de laboratório foram encaminhados ao Laboratório de digestibilidade do Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite em Coronel Pacheco – MG e, decorridos 71 dias da ensilagem, foram abertos no dia 05 de junho de 2008. A porção do terço superior foi descartada e o restante do material homogeneizado e retirado duas amostras de, aproximadamente, 500 g em cada silo. Parte da primeira amostra foi acondicionada em saco de papel, identificadas e colocadas em estufa de ventilação forçada a 60°C durante 72 horas. A outra foi levada à prensa hidráulica para a extração do extrato aquoso, medindo-se, imediatamente o pH e retirou-se uma alíquota de 10ml que foi colocada em frasco plástico, ficando devidamente armazenada a -10°C para posterior determinação de N-NH<sub>3</sub>. A segunda amostra foi usada no estudo do tamanho médio de partícula (TMP), com base na metodologia da estratificação em peneiras pelo método *New Penn State Forage Particle Size Separator*, descrito por Heinrichs & Kononoff (2002).

### **3.3 Análises químico-bromatológicas das silagens**

As amostras secas em estufa de ventilação forçada das respectivas silagens foram moídas contra peneira de malha de 1 mm em moinho do tipo Wiley, para determinação das seguintes variáveis; concentração de ácidos

fenólicos, segundo metodologia proposta por Deschamps & Ramos (2002); matéria seca em estufa a 105° C por 8 horas; fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) e fibra insolúvel em detergente ácido (FDA), conforme método proposto por Soest & Robertson (1985); proteína bruta, pelo método Kjeldahl (AOAC, 1990); digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca (DIVMS), da FDN (DIVFDN) e da matéria orgânica (DIVMO), determinado com base no método ANKOM<sup>®</sup> Fiber Analyser (ANKOM Technology Corporation), descrito por Holden (1999). Através de método indireto desenvolvido por Argillier et al. (1998), a digestibilidade da parede celular (DPC) onde se coloca em hipótese que a fração não FDN é completamente digerida e a equação ( $DIVPC = 100 \times (DIVMS - (100 - NDF)) / NDF$ ) é baseada nos teores de FDN e na DIVMS. Conforme os autores, determinação da DPC apresenta algumas falhas, como exemplo, o fato que nem toda proteína e amido são digeridos no rúmen e intestinos.

As amostras do extrato aquoso foram obtidas pela extração por meio de prensa hidráulica, conforme metodologia descrita por Kung Júnior et al. (1984). Os valores do pH das silagens foram medidos nos respectivos extratos de cada amostra, por meio de leitura em equipamento digital. Parte do extrato foi filtrado, centrifugado e pipetado e para determinação nitrogênio amoniacal (Chaney & Marbach, 1962).

### **3.4 Extração dos compostos fenólicos nas silagens**

As extrações dos compostos fenólicos das forragens foram feitas no Centro de Análise e Prospecção Química (CAPQ/UFLA). Amostras das silagens foram moídas contra peneira de malha de 1 mm em moinho do tipo Wiley e aproximadamente 2,0 gramas de cada silagem foram acondicionadas em saquinhos de nylon medindo 5 x 7 cm. Os saquinhos foram colocados para

agitação em um litro de solução de metanol 80% por duas horas. Após esse período, foram lavados com água destilada e deixados secar em estufa 60° C. Os padrões dos ácidos fenólicos utilizados foram: vanilina (Sigma), ácido caféico (Sigma), ácido ferúlico (Aldrich) e ácidos para-cumárico (Sigma), meta-cumárico e orto-cumárico (Fluka). Como fase móvel para separação dos ácidos fenólicos foi utilizado o solvente metanol (Merck) grau HPLC e a solução a 2% de ácido acético (Merck). A água ultrapura utilizada no preparo da fase móvel foi obtida a partir da purificação no sistema Milli-Q (Millipore).

A solubilização dos ácidos fenólicos nas amostras das silagens das quatro cultivares foi realizada com base na literatura (Deschamps & Ramos, 2002): 50,0 mg de amostra foram submetidas à extração em um tubo de ensaio, com 5,0 mL de NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup> por 24 horas. Em seguida, o material foi filtrado em cadinho poroso contendo filtro de lã de vidro (fibra média) e lavado com água ultrapura, sendo o filtrado acidificado para pH 2,5 utilizando solução de HCl:H<sub>2</sub>O (1:1 V/V). O volume final foi ajustado para 10,0 mL com água ultrapura, sendo retirados 2,0 mL para posterior análise. Após uma noite em geladeira, o material foi centrifugado e filtrado em membrana de polietileno (Millipore) com 0,45 µm de poro sendo que 20 µL desta solução foi injetada no sistema de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UFLC).

O material foi centrifugado em centrífuga marca Sigma modelo 3k30 com 1.000 rotações por minuto com tempo total de 5 minutos. As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema UFLC Shimadzu equipado com uma bomba binária (Shimadzu modelo 9012), um injetor automático (Shimadzu modelo 9012) e um detector DAD (Shimadzu modelo 9012) com comprimentos de onda fixados em 225 e 330 nm sendo que a melhor resposta foi obtida no comprimento de onda de 330nm.

As amostras foram injetadas em uma coluna LC Shim-pack CLC-ODS (150 x 4,6 mm, 5 µm) marca SHIMADZU conectada a uma pré-coluna analítica



LC Shim-pack CLC-ODS (1,0 cm x 4,0 mm, 5  $\mu$ m – SHIMADZU). A fase móvel utilizada foi composta pelos solventes: metanol 100% grau HPLC (solvente A) e solução de ácido acético 2% (solvente B). As análises foram feitas com tempo total de 20 minutos em um sistema do tipo gradiente e a composição da fase móvel otimizada está representada na Tabela 1. O fluxo utilizado em todas as análises foi de 1,1 mL min<sup>-1</sup> e a injeção 20  $\mu$ L.

TABELA 1 Composição do gradiente da fase móvel

Tempo (minutos)	Solvente A (%V/V)	Solvente B ( % V/V)
0:01	33	67
05:00	33	67
10:00	55	45
15:00	33	67
20:00	33	67

Solvente A: metanol 100% grau HPLC; Solvente B: ácido acético 2%.

Os ácidos fenólicos foram identificados através da comparação dos tempos de retenção obtidos com soluções padrão analisadas nas mesmas condições. A adição de padrões às amostras também foi usada como parâmetro de identificação. Foram determinados neste estudo a concentração, em  $\mu$ g/mg de MS, dos ácidos fenólicos relacionando-se as áreas dos picos de cada ácido, obtidas por meio de análises cromatográficas de cada amostra, com o perfil cromatográfico e as curvas analíticas dos ácidos.

### 3.5 Análises Estatísticas

Para os dados obtidos nas análises bromatológicas e na determinação da concentração de ácidos fenólicos foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, de acordo com o modelo estatístico:  $Y_{ij} = \mu + I_i + e_{ij}$  em que:

$Y_{ij}$  = observação referente ao híbrido “i” na repetição “j”;

$\mu$  = média geral;

$I_i$  = efeito do híbrido “i”, com  $i = 1, 2, 3, 4$

$e_{ij}$  = erro experimental independente associado a todos os valores observados, com distribuição normal de média zero e variância  $\sigma^2$ , com  $j = 1, 2, 3, 4$ .

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo Teste Tuckey no nível de 5%.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Valor nutritivo das silagens

Para teor de matéria seca, proteína bruta, pH, e N-NH<sub>3</sub> nas silagens, observou-se efeito de tratamentos ( $P < 0,05$ ), os teores médios de MS das silagens (Tabela 2) foram estatisticamente diferentes, abaixo do considerado ideal e variaram de 25,06 para a cultivar 30F90 a 29,30% para a cultivar BRS 3003. O corte das plantas de milho para ensilagem foi realizado aos 100 dias após emergência, tendo como base a avaliação visual das espigas em relação à linha de leite e consistência dos grãos. Sabendo que o grão endurece de cima para baixo e o limite entre a parte mais endurecida e aquela mais pastosa é bem nítido (Oliveira, 1998), e, baseado na avaliação de campo, inferiu-se que as cultivares estariam com teor de matéria seca ideal para ensilagem, entre 30 a 35%, o que não foi confirmado na análise bromatológica.

TABELA 2 Valores de matéria seca, proteína bruta, de pH e nitrogênio amoniacal das silagens produzidas com as quatro cultivares de milho.

Variáveis	Cultivar				EPM	P
	BM2202	BRS3003	EMG501	30F90		
MS (%)	28,40 b a	29,30 a	26,90 b	25,10c	0,44	0,01
PB (%)	6,70 b	6,90 b	6,95 b a	7,40 a	0,11	0,04
pH (%)	3,56 b a	3,53 b	3,57 b a	3,58 a	0,01	0,03
N-NH <sub>3</sub> (g/100g)	16,40c	22,70 a	18,20 b	21,90 a	0,33	0,01

Médias seguidas de letras iguais nas linhas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tuckey ( $P > 0,05$ ).

O maior teor de PB (Tabela 2) foi de 7,4% ( $P < 0,05$ ), observado na silagem da cultivar 30F90 dentro da média relatada na literatura. Normalmente, na silagem de milho, planta inteira, varia de 6 a 9%, com média ao redor de 7 a 7,5% (Pionner, 1993).

Segundo Barrière et al. (2003), as plantas de milhos são caracterizadas pelos seus altos teores em energia (principalmente amido) e baixos teores em PB, os quais podem ser influenciados por fatores agronômicos tais como fertilizações insuficientes e/ou mal utilizadas, e também por fatores genéticos, onde os híbridos mais modernos são caracterizados por apresentar baixos teores de PB. Porém, é fundamental salientar que, conforme Nussio (1996), plantas de milhos com teores de PB acima de 8% são caracterizadas como de ótima qualidade. Embora as variedades de milho sejam caracterizadas por baixos teores em PB, é importante conhecer o nível protéico da planta de milho ou da silagem.

O valor médio de pH (Tabela 2) observado nas silagens das cultivares foi de 3,5 ( $P < 0,05$ ), com a cultivar BRS 3003 apresentando menor que as demais ( $P < 0,05$ ). Apesar do teor de matéria seca, pouco abaixo do considerado ideal, são níveis de acidez indicativos de boa fermentação e de produção dos ácidos conservantes do material ensilado. O pH é um dos parâmetros que permite fazer inferências sobre a extensão do processo de fermentação (Reis & Jobim, 2001).

Referindo-se ao processo de fermentação, os mesmos autores comentaram que as bactérias lácticas crescem ativamente por 1 a 4 semanas, baixando os valores de pH, normalmente, para valores entre 3,8 e 5,0, dependendo do conteúdo de umidade da cultura, capacidade tampão e conteúdo de açúcar. Uma vez que os valores de pH baixam a níveis suficientes para inibir o crescimento de microrganismos, ou o substrato tenham se exaurido, as bactérias lácticas tornam-se inativas e sua população diminui lentamente (Rotz & Muck, 1994). Borges (1995) comentou que após um dia de fermentação, as bactérias lácticas já estão ativas e grande parte do ácido láctico é formado, reduzindo, conseqüentemente, o pH do meio; entre 7 e 14 dias a estabilidade da silagem é atingida e as alterações que ocorrem a partir daí são insignificantes.

Com relação à proporção de N-NH<sub>3</sub> determinada nas silagens (Tabela 2), obteve-se uma variação entre 14,5 a 22,75 g/100g, tendo sido maiores (P>0,05) nas silagens das cultivares BRS 3003 (22,75 g/100g) e 30F90 (21,87 g/100g), indicativo de maior proteólise durante o processo fermentativo. Vilela (1998) evidenciou que os parâmetros normalmente empregados como critério de classificação da qualidade da silagem abrangem o pH, os ácidos orgânicos e o N-NH<sub>3</sub> como porcentagem do nitrogênio total.

Os valores de N-NH<sub>3</sub> encontrados nas silagens das cultivares estudadas neste trabalho foram superiores aos, considerados por Silveira (1975) como indicativos de silagens qualitativamente adequadas, níveis entre 11 a 12,0g/100g. No entanto, a produção de NH<sub>3</sub> como medida de proteólise, apesar de utilizada por autores, é considerada um critério errado por McDonald et al. (1991), já que o N-NH<sub>3</sub> livre pode ser utilizado para a formação de amidas e grande proteólise pode ocorrer sem um significativo aumento no conteúdo de N-NH<sub>3</sub>, sendo seu nível somente um indicador da posterior quebra de aminoácidos.

O tamanho das partículas (Tabela 3) obtidas no corte da cultivar BM202 apresentou menor (P<0,05) percentual de retenção na Peneira 1 (11,56%), enquadrando-se na faixa de 10 a 15%, entretanto não diferiu significativamente das cultivares BRS 3003 e EMG501. A cultivar 30F90 apresentou o maior valor (23,82%) de retenção na Peneira 1 (P>0,05).

O estudo do tamanho de partículas indicou correta picagem das plantas durante a ensilagem, considerando-se as faixas definidas no método para as três peneiras, as cultivares BM2202 e BRS3003 foram as que melhor se enquadraram. Os demais híbridos tiveram maiores percentuais de retenção na peneira superior, porém, deve-se considerar que os valores sugeridos no estudo foram desenvolvidos com silagens de milho produzidas com híbridos norte-americanos. Os híbridos normalmente empregados para silagem no Brasil,

incluindo os utilizados no trabalho, foram desenvolvidos para a produção de grãos (Oliveira et al., 2003; Cruz et al., 2005), tendo mais fibra para evitar o tombamento e talvez esse excesso de fibra ou fibra mais resistente, quando comparado com os híbridos americanos, tenha resultado numa maior percentagem de partículas grandes se acumulando na peneira superior.

Nas Peneiras 2 e 3, os tamanhos de partículas das quatro cultivares mostraram-se dentro das faixas de retenção estabelecidas. Sendo observado, na peneira 2, o menor ( $P < 0,05$ ) valor de retenção na silagem da cultivar 30F90 (34,41%), correspondendo partículas entre 7,9 a 19,0 mm e, na Peneira 3, a cultivar EMG501, apresentou valores menores que 7,9 mm (37,79%).

TABELA 3 Percentual de partículas das silagens de milho retidas nas peneiras.

Cultivar	BM2202	BRS3003	EMG501	30F90	EPM	P
*Peneira 1 (10 a 15 %)	11,56 a	16,75 b a	20,40 b a	23,82 b	2,31	0,01
Peneira 2 (40 a 50%)	47,49c	36,83cb	40,99 b	34,41 a	1,29	0,01
Peneira 3 (40 a 50%)	40,32ba	45,20 b	37,79 a	41,14b a	1,72	0,06

\*Peneira 1: partículas maiores que 19 mm; Peneira 2: partículas entre 7,9 a 19 mm; Peneira 3: partículas menores que 7,9 mm. Médias seguidas de letras iguais nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tuckey ( $P > 0,05$ ).

Tamanhos de partículas mais reduzidos podem favorecer a fermentação, facilitando a compactação, promovendo maior superfície de contato entre substrato com as bactérias fermentadoras, levando a maior produção de lactato e queda rápida de pH (Aguiar et al., 2000; Balsalobre et al., 2001). McDonald et al. (1991) apontaram que quando o tamanho de partícula é inferior a 20 – 30 mm pode haver efeitos positivos sobre a disponibilidade de carboidratos solúveis e, conseqüentemente, estímulo ao crescimento de bactérias lácticas.

As cultivares BRS3003, 30F90 e BM2202 (Tabela 4) foram as que apresentaram maiores teores de amido (22,8; 20,3 e 19,0% respectivamente) diferindo ( $P<0,05$ ) da cultivar EMG501 com menor teor (14,0%). Considerando o momento em que as plantas de milho foram colhidas para a ensilagem, tendo como base a textura dos grãos, o maior teor de amido observado na silagem BRS3003 pode ser associado com os menores valores de FDN (58,2 %) e de lignina (4,3%), o que pode ser atribuído à alta produção de grãos da cultivar. Ferreira (2001) comenta que, dependendo da participação de grãos na planta, os teores de FDN e de FDA podem decrescer à medida que a planta evolui do estágio de grão leitoso para o estágio de maturação fisiológica. Portanto, o aumento da participação de grãos tem efeito diluidor do teor de fibra, mesmo sendo este crescente na parte vegetativa da planta.

TABELA 4 Composição química e valores de digestibilidade *in vitro* da fração fibrosa das silagens produzidas com as quatro cultivares de milho. Valores com base na matéria seca.

Variáveis	Cultivar				EPM	P
	BM2202	BRS3003	EMG501	30F90		
Amido (%)	19,0 b a	22,8 a	14,0 b	20,3 b a	1,79	0,03
FDN (%)	60,4 b a	58,2 b	65,5 a	60,6 b a	1,63	0,05
FDA (%)	32,6 a	30,0 a	32,8 a	32,8 a	1,04	0,20
Lignina (%)	5,7 a	4,3 b	5,1 b a	5,7 a	0,29	0,02
DIVMS (%)	56,9 b a	61,2 a	56,4 b	59,0 b a	1,09	0,04
DIVMO (%)	55,9 b a	60,3 a	55,2 b	57,5 b a	1,15	0,04
DIVFDN (%)	45,3 a	48,9 a	48,7 a	48,6 a	1,12	0,11
*DIVPC (%)	28,7 a	33,1 a	33,5 a	32,3 a	1,52	0,16

\* Estimado conforme Argillier et al. (1998). Médias seguidas de letras iguais nas linhas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tuckey ( $P>0,05$ ).

O menor valor de FDN (58,2 %) e de lignina (4,3%) da cultivar BRS3003 ( $P<0,05$ ), apresentados na Tabela 4, correspondeu ao maior valor de

DIVMS (61,2%) e de DIVMO (60,3 %). Porém, não foram observadas diferenças ( $P>0,05$ ) nos valores de digestibilidade entre as cultivares, apesar dos níveis de lignina terem apresentados diferenças estatísticas. Segundo Soest (1994), teores de FDN superiores a 55% da MS são negativamente correlacionados com o seu consumo e digestibilidade. Em silagens, a digestibilidade é influenciada pelas características da forragem no momento do armazenamento e por mudanças que ocorrem durante a fermentação (McDonald, et al., 1991).

Segundo Barrière et al. (1998), a digestibilidade da parede celular depende, em parte, das suas características intrínsecas, principalmente do teor de lignina, as quais definem a sua susceptibilidade à degradação microbiana. Entretanto, os valores de FDN (65,4) e de DIVMS (56,4%) na cultivar EMG501 foram, respectivamente, os limites máximos e mínimos observados entre as silagens ( $P<0,05$ ), sem que o teor de lignina diferísse estatisticamente ( $P>0,05$ ) do observado na cultivar BRS3003 (Tabela 4).

No presente trabalho não foram observadas diferenças ( $P>0,05$ ) na DIVFDN, assim como nos valores estimados de DIVPC entre as silagens, sugerindo que outros fatores além dos conteúdos de parede celular estão intimamente envolvidos com os teores de digestibilidade, isto é, os teores de ligninas e suas possíveis ligações com moléculas de baixo peso. Mechin et al. (2000), trabalhando com diferentes linhagens de milho, não observaram diferenças entre os teores de lignina para as linhagens W117, F2 e F251, mas observaram diferenças entre estas linhagens para os teores de digestibilidade da parede celular de 10 a 12 unidades percentuais. Os autores sustentaram a teoria de que diferenças na digestibilidade podem ser mais bem explicadas pelos tipos de ligações existentes entre as ligninas e hemiceluloses.



#### 4.2 Quantificação dos ácidos fenólicos nas silagens

A quantificação foi realizada pelo método da curva analítica obtida por regressão linear sendo cada ponto (concentração) a média de três repetições. Observou-se a perfeita separação de todos os compostos, em especial das formas isoméricas do ácido cumárico (orto, meta e para). A Figura 1 ilustra o perfil cromatográfico da solução padrão dos ácidos fenólicos ( $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ): ácido caféico, vanilina, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido m-cumárico e o-cumárico com detecção espectrofotométrica obtidos após a injeção de 20  $\mu\text{L}$ .

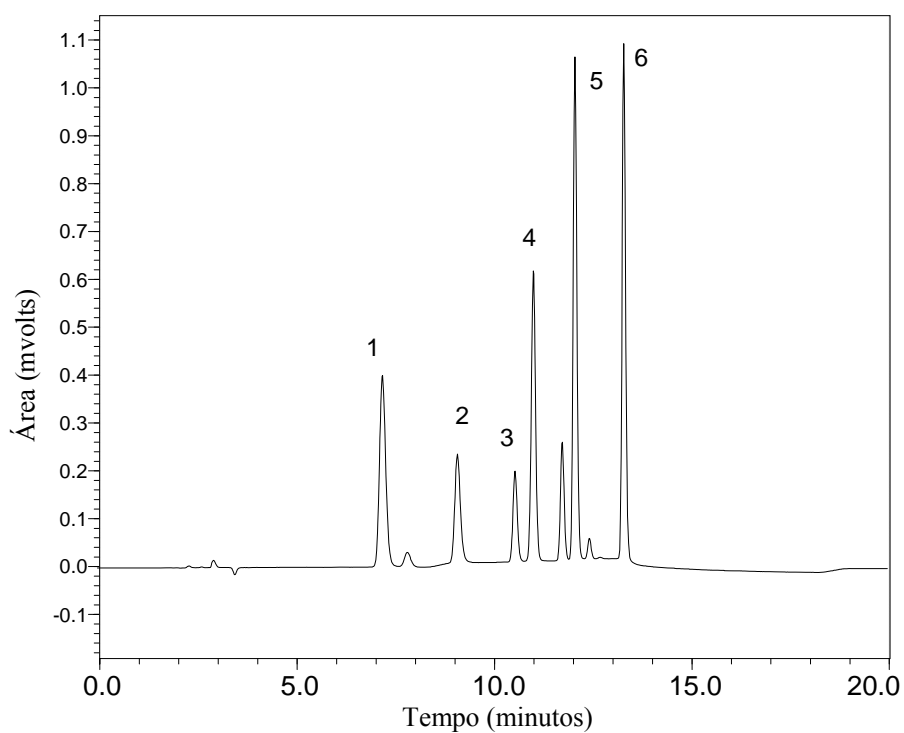


FIGURA 1 Cromatograma dos padrões dos ácidos fenólicos ( $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ): 1- ácido caféico (tr : 7,2 min.); 2 – Vanilina (tr : 9,1 min.); 3 – ácido para-cumárico (tr : 10,6 min.); 4 – ácido ferúlico (tr : 11,0 min.); 5 – ácido meta-cumárico (tr : 12,1 min.); 6 – ácido orto-cumárico (tr : 13,3 min.).

Os perfis cromatográficos dos ácidos estudados nas silagens das quatro cultivares podem ser observados nos respectivos cromatogramas (Figuras 2; 3; 4 e 5).

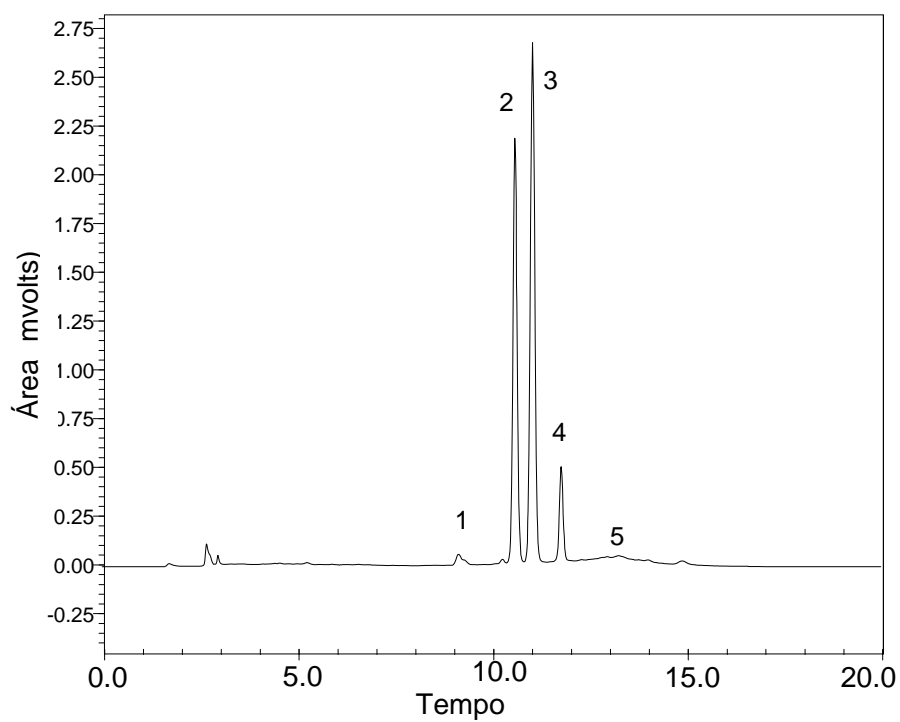


FIGURA 2 Cromatograma da amostra de silagem de milho da cultivar BM2202. Identificação dos picos: 1= vanilina; 2 = ácido p-cumárico; 3 = ácido ferúlico; 4 = ácido meta-cumárico; 5= ácido orto-cumárico.

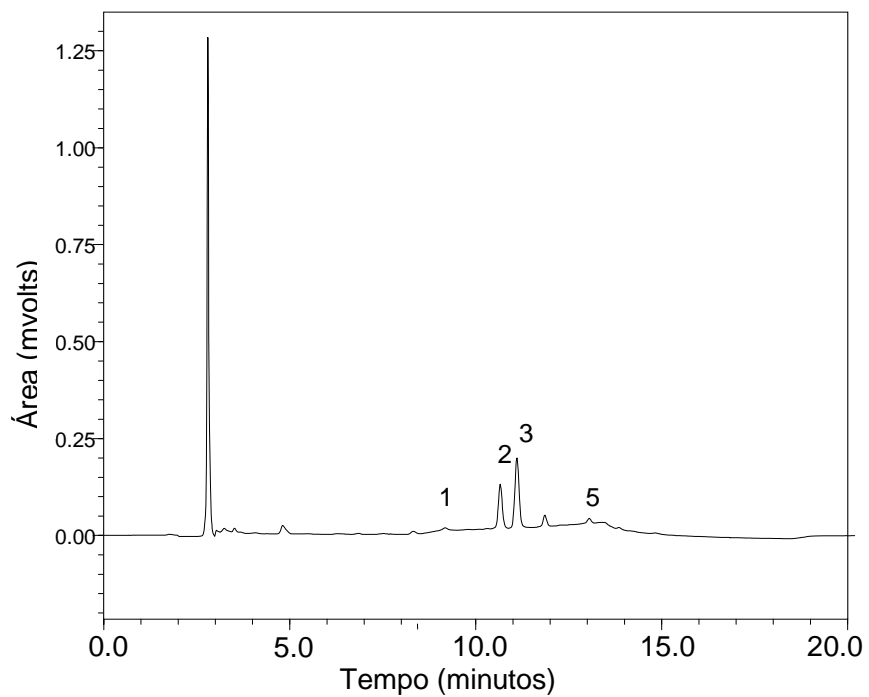


FIGURA 3 Cromatograma da amostra de silagem de milho da cultivar BRS3003. Identificação dos picos: 1= vanilina; 2 = ácido p-cumárico; 3 = ácido ferúlico; 4 = ácido meta-cumárico; 5= ácido orto-cumárico.

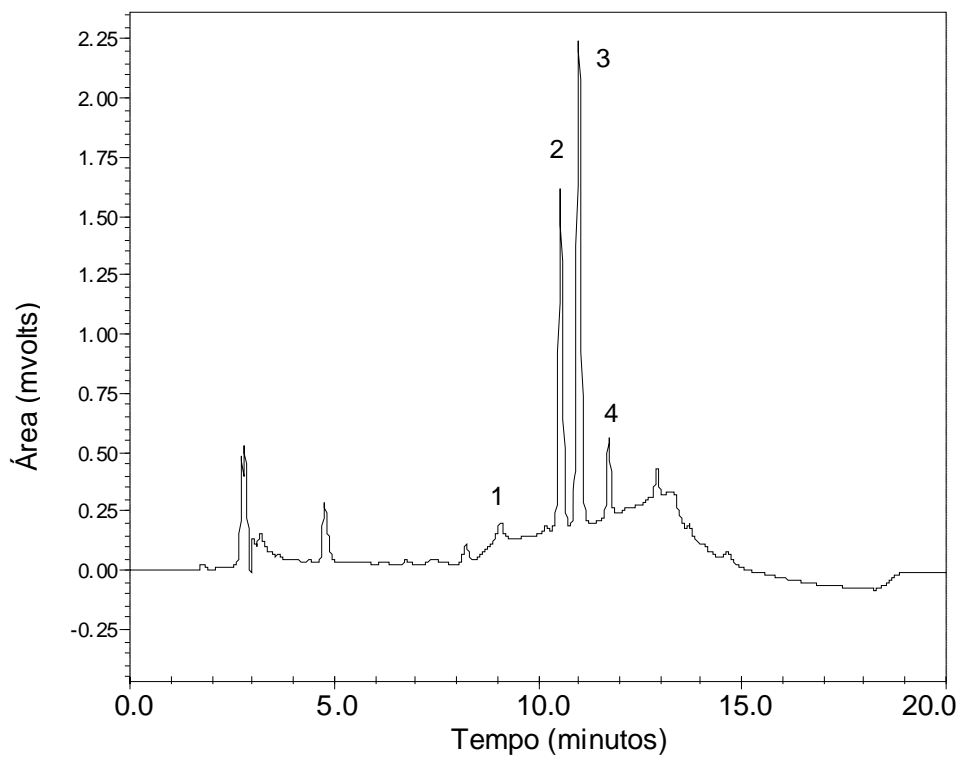


FIGURA 4 Cromatograma da amostra de silagem de milho da cultivar EMG501. Identificação dos picos: 1= vanilina; 2 = ácido p-cumárico; 3 = ácido ferúlico; 4 = ácido meta-cumárico; 5= ácido orto-cumárico.

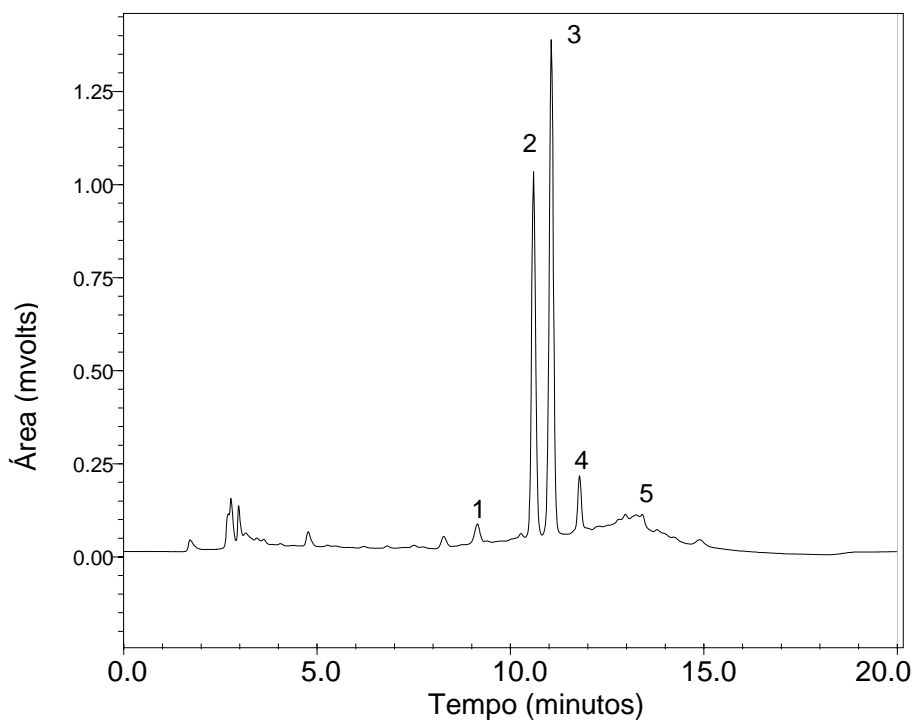


FIGURA 5 Cromatograma da amostra de silagem de milho da cultivar 30F90  
 Identificação dos picos: 1= vanilina; 2 = ácido p-cumárico; 3 =  
 ácido ferúlico; 4 = ácido meta-cumárico; 5= ácido orto-cumárico.

Os picos referentes aos ácidos ferúlico, o-cumárico, p-cumárico e vanílico, representados nos gráficos, foram detectados de forma regular em todas as amostras analisadas, sendo por isso, os discutidos neste estudo.

Houve diferenças ( $P < 0,05$ ) entre as silagens das quatro cultivares para o conteúdo dos ácidos ferúlico, o-cumárico, p-cumárico, vanílico bem como no total dos ácidos estudados. Na Tabela 5, observa-se os maiores níveis ( $P < 0,05$ ) nas silagens das cultivares BM2202 e 30F90 e os menores ( $P < 0,05$ ) na cultivares EMG501 e BRS3003, o que pode ser associado ao observado entre os teores de

lignina. Santos et al. (2001) comentaram que, normalmente, a cada espécie vegetal está associada uma determinada família de pólfenóis como os mais importantes, cujos teores variam como desenvolvimento vegetativo das plantas.

TABELA 5 Concentrações em ( $\mu\text{g}/\text{mgMS}$ ) de ácidos fenólicos nas silagens produzidas com as quatro cultivares de milho.

Variáveis	Cultivar				EPM	P
	BM2202	BRS3003	EMG501	30F90		
Ác. Ferúlico	23,32 a	7,05 b	7,33 b	20,95 a	1,01	0,01
Ác. o-Cumárico	2,69 a	0,18 b	0,23 b	1,91 a	0,19	0,01
Ác. p-cumárico	17,83 a	2,88 b	4,05 b	7,81 a	3,11	0,05
Ác. Vanílico	2,57 a	0,44 b	0,46 b	2,22 a	0,12	0,01
Total	46,41 a	10,55 b	12,07 b	42,89 a	3,54	0,01

Médias seguidas de letras iguais nas linhas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tuckey ( $P>0,05$ ).

Neste trabalho, os valores extremos máximos e mínimos observados nos conteúdos dos ácidos fenólicos podem ser explicados, possivelmente, por aspectos de precocidade relacionados ao ciclo de desenvolvimento das plantas as quais, excetuando a cultivar EMG501, são todas de ciclo precoce. Apesar de todas as plantas terem sido cortadas aos 100 dias após germinação e tendo como referência a avaliação visual dos grãos nas espigas em relação à linha de leite, e a textura dos grãos, as cultivares BM2202 e 30F90, considerando-se seus maiores valores de ácido ferúlico, mostraram ter desenvolvimento ainda mais precoces.

Dos ácidos fenólicos, principalmente os ácidos p-cumárico e ferúlico agem como as unidades precursoras na formação da lignina na plantas (Brito et al., 2003). Tem-se postulado que, nas plantas jovens, o complexo éster/ácido ferúlico se constitui em sítios iniciadores para a polimerização da lignina (Morrison et al., 1998). Com o envelhecimento dos tecidos, inicia-se maior deposição de ácido p-cumárico éterificado e esterificado (Jung & Allen, 1995).

O ácido cinâmico apresenta entre seus derivados os ácidos p-cumárico, cafeíco e ferúlico, que estão diretamente envolvidos na associação da lignina com as hemiceluloses da parede celular (Lage, 2009). Simões et al. (2007) citam que o ácido vanílico é obtido após hidrólise ácida de folhas de gimnospermas e angiospermas, possuindo estreita ligação com a lignina.

A silagem da cultivar BRS3003 apresentou as menores concentrações ( $P > 0,05$ ) de ácido ferúlico (7,05  $\mu\text{g}/\text{mgMS}$ ) e de ácido p-cumárico (2,88  $\mu\text{g}/\text{mgMS}$ ) o que pode comprovar os resultados referentes aos teores de lignina (4,33%) e, conseqüentemente, ratificar a maior DIVMS (61,20%), sem, contudo, terem sido observadas diferenças ( $P > 0,05$ ) na DIVPC. Os valores observados na concentração de ácido ferúlico e na DIVMS da cultivar BRS 3003 confirmam a correlação positiva (Tabela 6) encontrada entre o ácido ferúlico com a DIVMS ( $r = 0,51$ ), corroborando com o que foi postulado por Morrison et al. (1998) sobre o ácido ferúlico como iniciador da polimerização de lignina em plantas jovens. Entretanto, a silagem da cultivar EMG501 apresentou um conteúdo de ácido ferúlico (7,33  $\mu\text{g}/\text{mgMS}$ ) estatisticamente semelhante ao da cultivar BRS3003, porém com DIVMS (56,44%) menor ( $P < 0,05$ ) que o da cultivar BRS3003 e semelhante ( $P > 0,05$ ) às demais cultivares. Destaca-se também que as concentrações de ácido ferúlico das cultivares BM2202 (23,32  $\mu\text{g}/\text{mgMS}$ ) e 30F90 (20,95  $\mu\text{g}/\text{mgMS}$ ) foram os maiores ( $P < 0,05$ ) e os valores de DIVMS não diferiram ( $P > 0,05$ ) do observado na cultivar EMG501.

Buxton & Russel (1988), citaram que as concentrações de lignina, ácidos fenólicos e de ácido p-cumárico têm sido demonstradas como constituintes da parede celular que apresentam correlação negativa com a digestibilidade da fibra. Ferreira (2003), avaliando a composição química-bromatológica e digestibilidade de híbridos de milho, verificou, em seu estudo, que o ácido p-cumárico foi negativamente associado com os valores da DIVMS ( $r = 0,93$ ).

TABELA 6 Coeficientes de correlações da composição química-bromatológica e digestibilidade de silagens produzidas com quatro cultivares de milho.

	Ác. <i>p</i> -C <sup>6</sup>	Ác. Fe <sup>7</sup>	Ác. <i>O</i> -C <sup>8</sup>	Ác. Van <sup>9</sup>	T Ác.F <sup>10</sup>
MS <sup>1</sup>	-0,3996	- 0,3822	- 0,0399	0,1462	- 0,4583
LIG <sup>2</sup>	-0,0056	- 0,0997	0,1761	0,0058	-0,0238
FDN <sup>3</sup>	0,0867	- 0,2784	0,3633	- 0,0138	0,0155
DIVMS <sup>4</sup>	0,0480	0,5073***	- 0,3254	0,2091	0,1773
DIVPC <sup>5</sup>	0,1461	0,2645	0,0524	0,2317	0,2150

Matéria Seca; <sup>2</sup> Lignina; <sup>3</sup> Fibra em detergente neutro; <sup>4</sup> Digestibilidade *in vitro* da matéria seca; <sup>5</sup> Digestibilidade *in vitro* da parede celular; <sup>6</sup> Ácido *p*-cumárcio; <sup>7</sup> Ácido ferúlico; <sup>8</sup> Ácido *o*-cumárcio; <sup>9</sup> Ácido Vanílico; <sup>10</sup> Total dos ácidos fenólicos; \*\*\* P < 5%

Estes resultados fortalecem a afirmativa de vários autores (Jung, 1989; Marvin et al., 1995; Morrison et al., 1998; Deschamps, 1999; Barrière & Emile, 2000; Ferreira, 2003) de que as variações na digestibilidade podem ser melhores explicadas pelas variações nos teores de lignina e de ácidos fenólicos totais, ou seja, suas proporções entre as ligações éster e éter.

#### 4.3 Estudo morfológico com inferência sobre a qualidade das silagens

As imagens obtidas através da microscopia eletrônica (Figura 6) permitiram visualizar a presença de compostos fenólicos no interior das células da epiderme das folhas de milho em todas as quatro cultivares, ratificando as determinações realizadas pela cromatografia líquida.



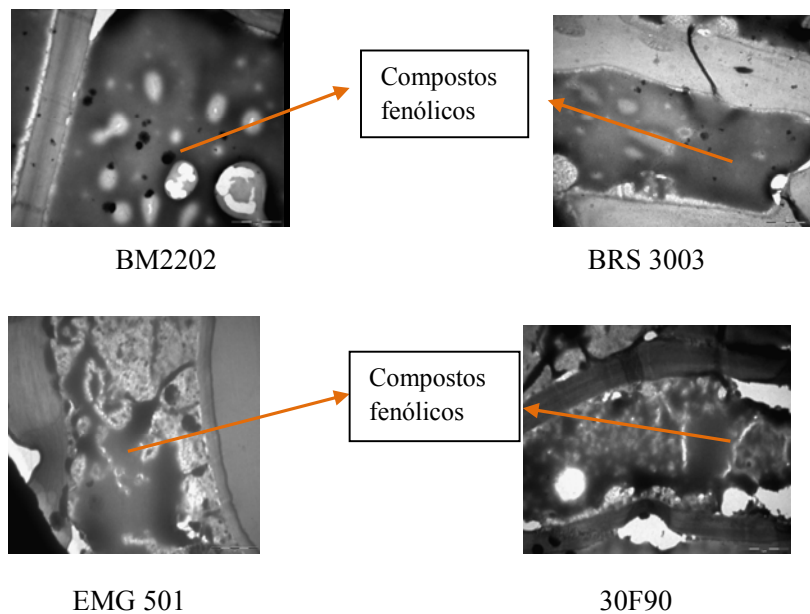
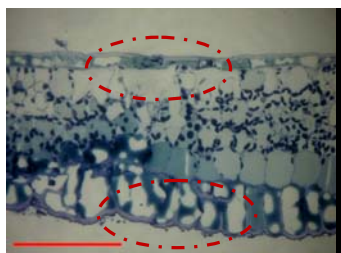


FIGURA 6 Imagens de cortes histológicos das folhas de quatro cultivares de milho, obtidas por meio de em microscopia de transmissão, com aumento de 3000X.

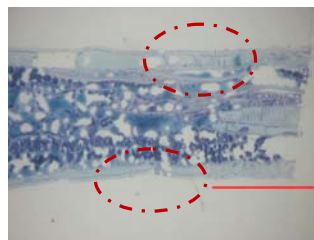
A avaliação visual das imagens, nas regiões de coloração cinza, destacadas com as setas, sugere que as maiores concentrações de compostos fenólicos foram apresentadas pelas cultivares BM2202 e 30F90 e as menores na BRS 3003 e EMG 501, conforme as concentrações detectadas por meio da cromatografia.

Por meio de análise das fotografias das lâminas (Figura 7), pode-se inferir que as cultivares apresentaram estruturas de limbo foliar distintas entre si, especialmente na região das epidermes adaxial e abaxial (circuladas), cujas espessuras mais delgadas podem ser observadas nas cultivares BRS3003 e 30F90 e as mais espessas nas cultivares BM2202 e EMG 501, o que é coerente

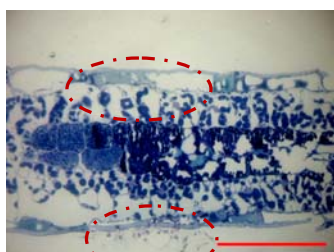
com os respectivos valores de lignina, FDN e DIVMS, obtido nas determinações químicas e de digestibilidade.



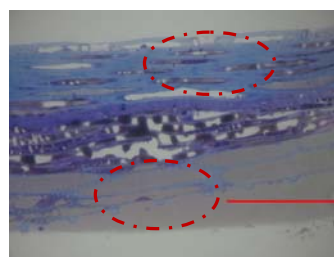
BM2202



BRS 3003



EMG 501



30F90

FIGURA 7 Imagens de cortes histológicos das folhas de quatro cultivares de milho, obtidas com câmara montada sobre microscópio, com aumento 40X e a barra de escala equivale a 0,05mm. Destacando-se (círculos) a epiderme superior e inferior.

## 5 CONCLUSÕES

Com base nas condições de realização deste estudo, concluiu-se que:

A silagem da cultivar BRS3003 apresentou os melhores resultados referente às características de composição química e de digestibilidade da fração fibrosa.

Os níveis dos ácidos fenólicos (Ferúlico, o-Cumárico, p-cumárico e Vanílico) confirmaram os teores de lignina encontrados nas silagens e ajudaram a explicar as diferenças observadas na DIVMS entre as quatro cultivares.

A concentração em ácidos fenólicos pode ser adotada como mais um parâmetro para a escolha das cultivares de milho para silagens avaliadas neste estudo.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL. **Energy and protein requirements of ruminants**. Wallingford: CAB International, 2000. 159 p.

AGUIAR, R. N.; CRESTANA, R. F.; BALSALOBRE, M. A. A.; NUSSIO, L. G.; SANTOS, P. M.; CORSI, M. Avaliação das perdas de matéria seca em silagens de capim Tanzânia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37., 2000, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: SBZ, 2000. p. 32.

AKIN, D.E. Biological structure of lignocellulose and its degradation in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 21, n. 2/4, p. 295-310, Oct. 1988.

ALLEN, M. S.; OBA, M.; CHOI, B. R. Silagem: feed cost and performance affected by type of hybrid. **Feedstuffs**, Minnetonka, v. 69, n. 28, p. 11-31, 1997.

ALMEIDA FILHO, S. L. **Avaliação de cultivares de milho (Zea mays L.) para silagem**. Viçosa, MG: UFV, 1996. 53 p.

ALVES DE BRITO, C. J. F.; RODELLA, R. A.; DECHAMPS, F. C. Anatomia quantitativa e degradação *in vivo* de tecidos em cultivares de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 28, n. 2, p. 223-229, 1999.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15. ed. Washington, 1990. 1. v. 1141p.

ARGILLIER, O.; BARRIERE, Y; LILA, M.; JEANNETEAU, F.; GELINET, K.; MENANTEAU, V. Genotypic variation in phenolic components of cell-walls in relation to the digestibility of maize stalks. **Agronomie**, Paris, v. 16, n. 2, p. 123-130, 1996.

AVELAR, F. M.; CARVALHO, S. P.; RIBEIRO, P. H. E.; RAMALHO, M. A. P. Interação cultivares de milho x épocas de semeadura para a produção de grãos e silagem. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 19, n. 3, p. 218, set. 1996.

BALSALOBRE, M. A. A.; NUSSIO, L. G.; MARTHA JÚNIOR, G. B. Controle de perdas na produção de silagens de gramíneas tropicais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: SBZ, 2001. p. 890-911.

BARRIÈRE, Y.; ARGILLIER, O. In vivo silage feeding value of early maize hybrids registered on France between 1958 and 1994. **Euphytica**, Wageningen v. 99, n. 3, p. 175-182, 1998.

BARRIÈRE, Y., EMILE, J. C. Le maïs fourrage: (III) evaluation et perspectives de progrès génétique sur les caractères de valeur alimentaire. **Fourrages**, Paris, n. 163, p. 221-238, 2000.

BARRIÈRE, Y.; EMILE, J.C.; SURAUULT, F. Variabilité génétique de la teneur en matières azotées du maïs fourrage. In: ACTES DES JOURNÉES AFPF 2003 – FOURRAGES, PROTÉINES ET ENVIRONNEMENT. 2003, Paris. **Resumos...** Paris: INRA, 2003. p. 128-129.

BAUCHER, M.; MONTIES, B.; MONTAGU, M. V.; BOERJAN, W. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 17, n. 2, p. 125-197, Mar. 1998.

BERCHIELLI, T. T.; GRACIA, A. de V.; OLIVEIRA, S. G. de. Principais técnicas de avaliação aplicadas em estudo de nutrição. In: BERCHIELLI, T. T.; VAZ PIRES, A.; OLIVEIRA, S. G. de (Ed.). **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. p. 397-421.

BORGES, A. L. C. **Qualidade de silagens de híbridos de sorgo de porte alto, com diferentes teores de tanino e de umidade no colmo, e seus padrões e fermentação**. 1995. 104p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BOSSOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy**. 2. ed. Boston: J. and Bartlett, 1998. 670 p.

BOUDET, A. M. Lignins and lignification: selected issues. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 38, n. 1/2, p. 81-96, Jan. 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Normais climatológicas (1961–2007)**. Brasília, 2008.

BRITO, C. J. F. A. de; RODELLA, R. A.; DESCHAMPS, F. C. Perfil químico da parede celular e suas implicações na digestibilidade de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria humidicola*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n.6, p. 1835-1844, nov./dez. 2003.

BURNS, J. C.; POND, K. R.; FISHER, D. S. Changes in forages quality, ingestive mastication and digesta kinetics resulting from switchgrass maturity. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75, n. 5, p. 1368-1379, May 1997.

BUXTON, D. R.; RUSSELL, J. R. Lignin constituents and cell wall digestibility of grass and legume stems. **Crop Science**, Madison, v. 28, n. 3, p. 553-558, May/June 1988.

CAETANO, H. **Avaliação de onze cultivares de milho colhidos em duas alturas de corte para produção de silagem**. 2001. 178 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CASSAB, G. I. Plant cell wall proteins. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 281-309, June 1998.

CHABBERT, B.; TOLLIER, M. T.; MONTIES, B. B.; BARRIERE, Y.; ARGILLIER, O. Biological variability in lignification of maize: expression of the brown midrib bm3 mutation in three maize cultivars. **Journal of the Science of food and Agriculture**, London, v. 64, n. 3, p. 349-355, Apr. 1994.

CHANEY, A. L.; MARBACH, E. P. Modified reagent for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 8, n. 2, p. 130-137, Apr. 1962.

CHEN, C. L. Lignins: occurrence in wood tissues isolation reactions, and structure. In: LEWIS, M.; GOLDSTEIN, I. S. (Ed.). **Wood structure and composition**. New York: M. Dekker, 1991. p. 183-261.

COORS, J. G.; CARTER, P. R.; HUNTER, R. B. Silage corn. In: HALLAUER, A. R. (Ed.) **Specialty corns**. Boca Raton: CRC, 1994. p. 305-340.

CORRÊA, 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**, Champaign, v. 85, n. 11, p. 3008-3012, Nov. 2002.

CRUZ, J. C.; PEREIRA, F. T. F.; PEREIRA FILHO, I. A.; FERREIRA, J. J. **Produção e composição bromatológica de cultivares de milho para silagem.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2005. (Comunicado Técnico, 117).

DACCORD, R.; ARRIGO, Y.; VOGEL, R. Nutritive value of maize silage. **Revue Suisse d'Agriculture**, Lausanne, v. 28, n. 1, p. 17-21, 1996.

DAYNARD, T. B. Practices affecting quality and preservation of whole-plant corn silage. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 58, n. 3, p. 651-659, July 1978.

DESCHAMPS, F. C. Implicações do período de crescimento na composição química e digestão dos tecidos de cultivares de capim-elefante. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 28, n. 6, p. 1358-1369, 1999.

DESCHAMPS, F. C.; RAMOS, L. P. Método para a determinação de ácidos fenólicos na parede celular de forragens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 31, n. 4, p. 1634-1639, 2002.

DOREAU, B. M.; PHILIPPEAU, C. Influence of genotype and ensiling of corn grain on in situ degradation of starch in the rumen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 8, p. 2178-2184, Aug. 1998.

EVANGELISTA, A. R.; ABREU, J. G. de; PEREIRA, R. C. Perdas na conservação de forragens. IN: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 1., 2004, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM/CCA/DZO, 2004. p. 75-111.

EVARISTO, I. M.; LEITÃO, M. C. Identificação de quantificação por DAD-HPLC, da fração fenólica de *Quercus súber* L. **Silva Lusitana**, Oeiras, v. 9, n. 2, p. 135-141, dez. 2001.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho.** Guaíba: Agropecuária, 2000. 360 p.

FENNER, H. Method determining total volatile bases in rumen fluid by steam distillation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 48, n. 2, p. 441-444, Feb. 1965.

FERREIRA, G. D. G. **Características morfo-anatômicas do colmo e valor nutritivo de genótipos de milho (*Zea mays* L.)**. 2003. 100 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

GONÇALVES, G. A.; RAMALHO, M. A. P.; RIBEIRO, P. H. E.; MARQUES JÚNIOR, O. G. Seleção de famílias de meios irmãos de milho em três épocas de semeadura visando à produção de silagem. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 19, n. 3, p. 218, set. 1996.

GORDON, C. H.; DERBYSHIRE, J. C.; SOEST, P. J. van. Normal and late harvesting of corn for silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 51, n. 8, p.1258-1263, Aug. 1968.

HATFIELD, R. D. Cell wall polysaccharides interaction and degradability. In: JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D. (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1993. p. 285-313.

HATFIELD, R. D. Structural polysaccharides in forages and their degradability. **Agronomy Journal**, Madison, v. 81, n. 1, p. 39-46, Jan. 1989.

HEINRICHS, J.; KONONOFF, P. Evaluating particle size of forages and TMRs using the new penn sate forage particle separator. **Dairy & Animal Science**, Pennsylvania, v. 2, n. 42, p. 14, 2002. .

HOLDEN, L. A. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for tem feeds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 8, p. 1791-1794, Aug. 1999.

HUNT, C. W.; KEZAR, W.; VINANDE, R. Yield, chemical composition, and ruminal fermentability of corn whole plant, ear, and stover as affected by maturity. **Journal of Production Agriculture**, Madison, v. 2, p. 357-361, 1989.

HUNTJENS, M. **Selecting corn silage varieties**. 2000. Disponível em: <<http://dairynet.outrreach.uiuc.edu>>. Acesso em: 5 nov. 2009.

JUNG, H. G. Forage ligning and their effects on fibre digestibility. **Agronomy Journal**, Madison, v. 81, n. 1, p. 33-38, Jan. 1989.

JUNG, H. G.; ALLEN P. R. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 9, p. 2774-2790, Sept. 1995.



JUNG, H. G.; DEETZ, D. A. Cell wall lignification and degradability. In: JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D. (Ed.) **Frage wall structure and digestibility**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1993. p. 313-346.

KUNG JÚNIOR, L.; GRIEVE, D. B.; THOMAS, J. W.; HUBER, J. T. Added ammonia or microbial inocula for fermentation and nitrogenous of alfafa ensiled at various percents of dry matter. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 67, n. 2, p. 299-306, Feb. 1984.

LAGE, F. F. **Caracterização química e quantificação de compostos fenólicos em forrageira**. 2009. 134 p. Dissertação (Mestrado em Química ambiental) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LAPIERRE, C. Application of new methods for the investigation of lignin structure. In: JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.; HATFIELD, R.D.; RALPH, J. (Ed.) **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: American Society of Agronomy, 1993. p. 133-166.

LOURES, D. R. S. **Características do efluente e composição químico-bromatológica da silagem sob níveis de compactação e de umidade do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. Cv. Cameroon)**. 2000. 67 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MABJEESH, S. J.; COHEN, M.; ARIELL, A. In vitro for measuring the dry matter digestibility of ruminant feedstuffs: comparison of methods and inoculum source. **Journal of Dairy Science**, Champaing, v. 83, n. 10, p. 2289-2294, Oct. 2000.

MAHANNA, W. C. Genetic selection for forage nutritional quality. In: **QUALITY forage and ruminants**. Ontário: Ministry of Agriculture and Food/Guelph & Borckville, 1994.

MARVIN, H. J. P.; KRECHTING, C. F.; LOO, E. N. van; SNIJDERS, H. A.; DOLSTRA, O. Relationship between stalk cell wall digestibility and fibre composition in maize. **Journal of the Science of food and Agriculture**, London, v. 69, n. 2, p. 215-221, May 1995.

MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. Edinburgh: J. Wiley, 1991. 226 p.

MECHIN, V. **Etude de facteurs biochimiques et génétiques explicatifs de la variabilité pour la valeur alimentaire du maïs fourrage**. 2000. 192 p. Tese (Doctored in Agronomy) – Institut National Agronomique, Lusignan.

MEHREZ A. Z.; ORSKOV, E. R. A study of the artificial fiber bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. **Journal of Agriculture Science**, Cambridge, v. 88, n. 1, p. 6450-6550, Feb.1977.

MELO, W. M. C.; PINHO, R. G. V.; CARVALHO, M. L. M. de; PINHO, E. V. de R. V. Avaliação de cultivares de milho para a produção de silagem na região de Lavras-MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 1, p. 31-39, jan./mar 1999.

MERCHEN, N. R. Digestion, absorption and excretion in ruminants. In: CHURCH, D. C. (Ed.) **The ruminant animal digestive physiology and nutrition**. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1988. p. 172-201.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the Fungi**. 4. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996. 574 p.

MORRISON, T. A.; JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D. Cell wall composition of maize internode of varying maturity. **Crop Science**, Madison, v. 38, n. 2, p. 455-460, Mar./Apr. 1998.

NASCIMENTO JUNIOR, D. Comentários sobre métodos químicos para a avaliação de forragens. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 3, n. 1, p. 233-244, jun. 1974.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of beef cattle**. Washington: National Academy, 1996. 242 p.

NUSSIO, L. G. A cultura do milho e sorgo para a produção de silagem. In: FANCELLI, A. L. (Coord.) **Milho**. Piracicaba: FEALQ/ ESALQ/USP, 1990. p. 58-88.

NUSSIO, L. G. Cultura do milho para silagem de alto valor nutritivo. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 7., 1991, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ/USP, 1991. p. 59-168.

NUSSIO, L. G.; CAMPOS, F. P.; DIAS, F. N. Importância da qualidade da porção vegetativa no valor alimentício da silagem de milho. IN: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 2001, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM, 2001, p. 127-145.

NUSSIO, L. G.; SIMAS, J. M. C. de; LIMA, L. M. Determinação do ponto de maturidade ideal para colheita do milho para silagem. In: WORKSHOP SOBRE MILHO PARA SILAGEM, 2., 2000, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2000. p. 11-26.

OLIVEIRA, J. S. **Produção e utilização de silagem de milho e sorgo.** Juiz de Fora: Embrapa/CNPGL, 1998. 34 p. (Circular Técnica, 47).

OLIVEIRA, J. S.; SOUZA SOBRINHO, F. de; PEREIRA, R. C.; MIRANDA, J. M. de; BANYAS, V. L.; RUGGIERI, A. C.; PEREIRA, A. V.; LEDO, F. da S.; BOTREL, M. de A.; AUAD, M. V. Potencial de utilização de híbridos comerciais de milho para silagem na Região Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 2, n. 1, p. 62-71, jan./mar. 2003.

ORSKOV, E. R.; MCDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agriculture Science**, Cambridge, v. 92, n. 2, p. 499-503, Apr. 1979.

PILÓ-VELOSO, D.; NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L. Isolamento e análise estrutural de ligninas. **Química Nova**, São Paulo, v. 16, n. 5, p. 435-448, set./out. 1993.

PLAYNE, M. J., MCDONALD, P. The buffering constituents of herbage and silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 17, n. 6, p. 262-268, June 1966.

RALPH, J.; HELM, R. F. Lignin/Hydroxycinnamic acid/Polysaccharide complexes: synthetic models for regiochemical. In: JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D. **Forage cell wall structure and digestibility.** Madison: American Society of Agronomy, 1993. p. 201-241.

RAMALHO, A. R. **Comportamento de famílias de meios irmãos em diferentes épocas de semeadura visando à produção de forragem de milho.** 1999. 78 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

REIS, A. R.; JOBIM, C. C. Perfil da fração de carboidratos da planta e adequação de aditivos no processo de ensilagem. In: WORKSHOP SOBRE MILHO PARA SILAGEM, 2., 2000, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba. ESALQ, 2000. p. 27.

REIS, R. A.; BERNARDES, T. F.; SIQUEIRA, G. R. Tecnologia de produção e valor alimentício de silagens de capins tropicais. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 2., 2004, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM, 2004. p. 35-74.

REIS, S. T. dos; TEIXEIRA, J. T.; EVANGELISTA, A. R. Composição química do Coast cross (*Cynodon dactylon* x *Cynodon nlenfuensis*) e Tifton 85 (*Cynodon spp*). In: REUNIÃO DA ASSOCIAÇÃO LATINO AMERICANA DE PRODUÇÃO ANIMAL, 17., 2001, Ciudad de La Habana. **Anais...** Ciudad de la Habana: Associação Latino Americana de Produção Animal, 2001. CD-ROM.

ROTZ, C. A.; MUCK, R. E. Changes in forages quality during harvest and storage. In: FAHEY JUNIOR, J. C.; COLLINS, M.; MERTENS, D. R.; MOSER, L. E. **Forage, quality, evaluation and utilization.** Madison: ASA, 1994. p. 828-868.

SALIBA, E. de O. S.; RODRIGUEZ, N. M.; LEMOS DE MORAIS, S. A.; PILÓ-VELOSO, D. Ligninas: métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 917-928, set./out. 2001.

SANTOS, G. T.; ASSIS, M. A.; GONÇALVES, G. D.; MODESTO, E. C.; CECATO, U.; JOBIM, C. C.; DAMASCENO, J. C. Determinação da digestibilidade in vitro da matéria seca e da matéria orgânica de gramíneas do gênero *Cynodon*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 22, n. 3, p. 761-764, jul./set. 2000.

SANTOS, M. A. T.; NEPOMUCENO, I. A. S.; ABREU, C. M. P. de; CARVALHO, V. D. de. Teores de polifenóis de caule e folha de quatro cultivares de abacaxizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 23, n. 2, p. 274-276, maio/ago 2001.

SHAVER, R. D. **Harvest and storage of high-quality corn silage for dairy cows**. 2000. Disponível em: <<http://www.wisc.edu/dysci>>. Acesso em: 5 nov. 2009.

SHAW, R. H. Climatic requirement. IN: SPRAGUE, G. F. **Corn and corn improvement**. Madison: American Society of Agronomy, 1977. p. 591-623.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos**: métodos químicos e biológicos. 3. ed. Viçosa, MG: UFV. 2002. 235 p.

SILVA, P. H. F.; PEREIRA, D. B. C.; OLIVEIRA, L. L. COSTA JUNIOR, L. C. G. **Físico-química do leite e derivados**: métodos analíticos. Juiz de Fora: EPAMIG, 1997. 190 p.

SILVEIRA, A. C. Técnicas para produção de silagens. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGENS, 2., 1975, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1975. p. 156-180.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; EDSMANN, E.; MELL, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROCICK, P. R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007. 1104 p.

SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; SOEST, P. J. van. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 11, p. 3562-3577, Nov. 1992.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, mar. 2002.

SOEST, P. J. van. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca: Comstock, 1994. 476 p.

SOEST, P. J. van; 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**, Champaign, v. 74, n. 12, p. 3583-3597, Dec. 1991.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 104-111, June 1963.

VATTIKONDA, M. R.; HUNTER, R. B. Comparison of grain yield and whole-plant silage production of recommended corn hybrids. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 63, n. 3, p. 601-609, July 1983.

VILELA, D. Aditivos para silagem de plantas de clima tropical. In: SIMPÓSIO SOBRE O USO DE ADITIVOS NA PRODUÇÃO DE RUMINANTES E NÃO RUMINANTES, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998. p. 73-108.

VILLELA, T. E. A. **Época de semeadura e de corte de plantas de milho para silagem**. 2001. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

WILSON, J. R. Organization of forage plant tissues. In: JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D. (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: American Society of America, 1993. p. 1-27.

WILSON, J. R. Structural and anatomical traits of forages influencing their nutritive value for ruminants. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL EM PASTEJO, 1997, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 1997. p. 173-208.

WOOLFORD, M. K. **The silage fermentation**. New York: M. Dekker, 1984. 280 p.