

MICROSCOPIA DO AMIDO E DIGESTIBILIDADE DE GRÃOS EM HÍBRIDOS DE MILHO SILAGEIROS COM DIFERENTES VITREOSIDADES

EVANDREI SANTOS ROSSI¹, MARCOS VENTURA FARIA², MARCELO CRUZ MENDES²,
OMAR POSSATTO JUNIOR¹, CACILDA MARCIA DUARTE RIOS FARIA²,
CARLOS AUGUSTO DA SILVA³, VICTOR LUIZ VASKOSKI⁴,
JONATAN MARCOS ANDRADE⁵ e EMANUEL GAVA⁵

¹Doutorando em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900, Av. Colombo, 5790 - Bloco J45, Sala 101 Maringá, PR. E-mail: rossi.es@hotmail.com, omar.pj@hotmail.com;

²Professor, Departamento de Agronomia, Universidade Estadual do Centro Oeste (UNICENTRO), Campus CEDETEG, 85040-080, Guarapuava, PR. E-mail: ventura_faria@yahoo.com.br; mcmendes@unicentro.br, criosfaria@hotmail.com;

³Mestrando em Agronomia/Produção Vegetal, UNICENTRO, Campus CEDETEG, 85040-080, Guarapuava, PR. E-mail: caugustorsilva@gmail.com;

⁴Eng. Agrônomo, Lagoa Bonita Sementes, 18440-000, Itaberá, SP. E-mail: victorvascoski@hotmail.com;

⁵Graduando em Agronomia, UNICENTRO, Campus CEDETEG, 85040-080, Guarapuava, PR. E-mail: jonatan_m27@hotmail.com, emanuel_gava2@hotmail.com.

Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.15, n.3, p. 607-618, 2016

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi estudar em nível microscópico a estruturação dos grânulos de amido nas porções vítrea e farinácea dos grãos e a influência na digestibilidade de grãos de milho com diferentes vitreosidades, colhidos no ponto de ensilagem. Foram avaliados 12 híbridos comerciais de milho, divididos em dois grupos (seis com grãos duros e seis com grãos dentados). Os experimentos foram conduzidos em dois locais no Centro-Sul do Paraná nos municípios de Guarapuava e Laranjeiras do Sul, sendo as plantas colhidas para análise dos grãos no estágio de $\frac{3}{4}$ da linha do leite, correspondente ao ponto de silagem. Foram avaliadas distribuição e número de grânulos de amido por área de $5200 \mu\text{m}^2$ na região vítrea e farinácea do endosperma, por meio de microscopia eletrônica de varredura e digestibilidade *in situ* dos grãos. Há maior número de grânulos de amido no endosperma farináceo dos grãos de milho quando comparado ao endosperma vítreo, aumentando assim a superfície específica dos grânulos, nos híbridos de milho avaliados no ponto de ensilagem. A digestibilidade dos grãos de milho colhidos no ponto de silagem foi superior no grupo de híbridos dentados quando comparado ao grupo de híbridos de endosperma duro.

Palavras chaves: Grânulo de amido, matriz proteica, grãos duros e dentados, *Zea mays* L.

MICROSCOPY OF STARCH AND DIGESTIBILITY OF GRAINS OF MAIZE HYBRIDS FOR SILAGE WITH DIFFERENT VITREOUSNESS

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate by microscopy the starch granules structure in vitreous and floury portions of the grains and the effect on the digestibility of maize hybrid grains with different vitreousness, harvested at the silage point. Twelve commercial corn hybrids were evaluated, divided into two groups (six with hard grains and six with dent grains). The experiments were conducted in two places in Center-South of Paraná State, at the cities of Guarapuava and Laranjeiras do Sul, and the plants were harvested in the stage $\frac{3}{4}$ of milk line, corresponding to the silage point. Distribution and number of starch granules per area of $5200 \mu\text{m}^2$ in the vitreous and farinaceous region were evaluated by scanning electron microscopy and *in situ* digestibility of the grains. A greater number of starch granules was observed in the floury endosperm of the corn grains compared to the vitreous endosperm, increasing the specific surface area of the granules in the evaluated hybrids at the silage point. The digestibility of corn grain harvested at the silage point was higher in the group of dent hybrids when compared to the group of hard endosperm hybrids.

Keywords: Starch granule, protein matrix, hard grain and dent grain, *Zea mays* L.

O amido consiste na principal forma de armazenamento de energia em plantas superiores e é descrito como um polissacarídeo de elevada massa molecular (Buléon et al., 1998). Neste contexto, a planta de milho assume grande importância por ser uma das mais utilizadas para alimentação animal, pois possui grande quantidade de amido nos grãos (80%) (Schaefer & Bernardo, 2013). O interesse maior pelas características do amido é por tratar-se de um carboidrato não fibroso de rápida digestibilidade ruminal e ótimo conteúdo energético (Ribas et al., 2007).

Quando a planta de milho é utilizada para alimentação animal na forma de silagem, há uma demanda de informações referente à presença de matriz proteica nos grãos no ponto de ensilagem, momento este que esta matriz se forma, e a digestibilidade do amido pode variar em decorrência das diferentes texturas (Corona et al., 2006; García et al., 2013; Oliveira et al., 2013).

De modo geral, em genótipos comerciais de milho, o grânulo de amido é constituído em menor proporção por amilose (30%) e maior proporção por amilopectina (70%), sendo mais solúvel em água (Kuakpetoon & Wang, 2007). Estudos apontam que a disponibilização do amido está muito relacionada à presença de uma matriz proteica nos grãos, representada pelas proteínas denominadas zeínas (Cantarelli et al., 2007). Momany et al. (2006) constataram que, quando presentes nos grãos de milho, estas proteínas formam uma barreira hidrofóbica, encapsulando grânulos de amido em uma matriz, prejudicando o ataque enzimático ao amido. No Brasil, a maior parte dos híbridos de milho disponíveis no mercado possuem endosperma duro, ou seja, com maior proporção de endosperma vítreo, caracterizados então por apresentarem matriz proteica envolvendo os grânulos de amido, enquanto apenas cerca de 6% dos genótipos comerciais possuem grãos dentados, com menor

proporção de endosperma vítreo (Cruz et al., 2015). Este fato pode ser um indicativo de que boa parte do amido produzido pela planta de milho não é bem aproveitado quando destinado à alimentação animal.

Para otimizar o aproveitamento deste carboidrato, é evidente a necessidade do conhecimento da microestrutura do amido para identificar fatores que possam limitar a sua digestão em nível microscópico. Em milho, há evidências de que um fator físico pode limitar a digestibilidade do grão, esta relacionada à dureza do endosperma, que por sua vez é reflexo da agregação entre amido e proteínas (Cantarelli et al., 2007).

A digestibilidade dos grãos de milho destinados a ensilagem vem sendo tratada com atenção por muitos pesquisadores, pois quando há redução em digestibilidade do grão tem se constatado redução na energia disponível no alimento final (Ribas et al., 2007).

Neste contexto, o emprego da microscopia eletrônica de varredura constitui uma ferramenta importante, permitindo a obtenção de bons resultados (Li et al., 2007; García et al., 2013). Estudos por meio de microscopia eletrônica de varredura demonstram evidências de que há diferenças na microestrutura de grânulos de amido quando se comparam as regiões vítrea e farinácea em grãos de milho. Na porção vítrea do grão, os grânulos de amido possuem formato poligonal e estão imersos em uma matriz proteica de forma que ficam empacotados com ausência de espaços entre eles (Dombrink & Bietz, 1993; García et al., 2013), o que dificulta o acesso de enzimas e a digestão do amido (Denardin & Silva, 2009). Já a porção farinácea do grão possui grânulos mais arredondados, com matriz proteica praticamente ausente e há presença de espaços entre os grânulos de amido, que provavelmente eram ocupados pela água antes do processo de secagem.

A partir das informações de que grânulos de amido presentes no endosperma vítreo podem estar asso-

ciados a uma matriz proteica lipofílica em grãos de milho, fica evidente que, para se conseguir melhor aproveitamento deste carboidrato, não basta cultivar uma planta de milho e fornecer como alimento. É preciso melhorar o entendimento em nível microscópico deste carboidrato para melhorar a disponibilização (Svihus et al., 2005; Corona et al., 2006; Ribas et al., 2007).

Assim, os objetivos deste trabalho foram estudar em nível microscópico a estruturação dos grânulos de amido nas porções vítrea e farinácea dos grãos e a influência na digestibilidade de grãos de híbridos de milho com diferentes vitreosidades, colhidos no ponto de ensilagem.

Material e Métodos

Foram conduzidos dois experimentos na região Centro-Sul do Paraná, sendo o primeiro em Guarapuava, no campo experimental do Departamento de Agronomia, *Campus Cedeteg*, da Universidade Estadual do Centro-Oeste, Unicentro (1.100 m de altitude,

latitude 25°21'S e longitude 51°30'W), com temperatura média dos meses de outubro a março de 19 °C (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2014). O segundo experimento foi instalado em Laranjeiras do Sul, na Fazenda Rio Almoço (700 m de altitude, latitude 25°33'S e longitude 52°24'W), com temperatura média dos meses de outubro a março de 21 °C (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2014).

Foram avaliados 12 híbridos comerciais de milho, sendo seis caracterizados por possuírem grãos duros e seis com grãos dentados (Tabela 1) de acordo com a classificação dos obtentores. Estes híbridos foram selecionados por comporem grande parte da área cultivada com milho na região Centro-Sul do Paraná, além de serem recomendados para produção de silagem de planta inteira. Os híbridos relacionados possuem base genética distinta, além de diferenças relacionadas a ciclos de maturidade, afetando o ponto de corte para ensilagem e a velocidade de acúmulo de amido nos grãos.

Os experimentos foram instalados nos dias 12/10/2012 em Guarapuava e 20/10/2012 em Laran-

Tabela 1. Características dos híbridos milho utilizados para avaliar a digestibilidade dos grãos e a microestrutura dos grânulos de amido no Centro-Sul do Paraná.

Híbrido	Tipo	Grão	Empresa	Cor Grão	Ciclo
2B688Hx	HT	Duro	Dow Agrosience	AM/AL	P
AG 8025PRO	HS	Duro	Agrocere/Monsanto	AM/AL	P
DKB 245PRO	HS	Duro	Dekalb/Monsanto	AL	P
32R48H	HS	Duro	Pioneer/Dupont	AL	SP
30R50H	HS	Duro	Pioneer/Dupont	AL	P
SW3949 TL	HS	Duro	Syngenta	AL-	HP
DKB 240PRO	HS	Dentado	Dekalb/Monsanto	AM	P
AG 8041PRO	HS	Dentado	Agrocere/Monsanto	AM/AL	SP
P1630H	HS	Dentado	Pioneer/Dupont	AM/AL	HP
AS 1572PRO	HS	Dentado	Agroeste/Monsanto	AM	P
32R22H	HS	Dentado	Pioneer/Dupont	AM	SP
2B587Hx	HS	Dentado	Dow Agrosience	AM/AL	P

HS = híbrido simples; HT = híbrido triplo; P = precoce; SP = superprecoce; HP = hiperprecoce; AM = amarelado; AL = alaranjado.

jeiras do Sul. Ambas as áreas foram conduzidas em sistema de plantio direto estabilizado. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com três repetições, com tratamentos arranjados em parcelas subdivididas, em que o híbrido correspondeu à parcela e o endosperma (vítreo e ou farináceo) à subparcela. As parcelas foram constituídas de quatro linhas de 5 m (as duas linhas centrais foram utilizadas como área útil), espaçadas de 0,8 m e com densidade final de 65.000 plantas ha⁻¹.

Na adubação de base, utilizaram-se 360 kg ha⁻¹ do formulado NPK 08-28-16. A primeira adubação nitrogenada de cobertura foi realizada quando as plantas atingiram o estágio de três a quatro folhas (V3-V4), com aplicação de 200 kg ha⁻¹ de ureia (46% N). A segunda adubação de cobertura foi realizada quando as plantas atingiram o estágio de seis a sete folhas (V6-V7), com aplicação de 130 kg ha⁻¹ de ureia.

Para obtenção das imagens de microscopia eletrônica dos grânulos de amido, foram selecionados grãos de padrão normal de cada parcela experimental e, em seguida, fraturados longitudinalmente com bisturi e fixados em fita de carbono sobre um suporte de alumínio (*stubs*) de acordo com a metodologia adaptada de García et al. (2013) (pois não foi necessário realizar a metalização das amostras). As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas nas dependências do Departamento de Química da Universidade Estadual do Centro-Oeste, no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura. O ponto determinado para a captação das imagens foi padronizado para todos os grãos, sendo 3 mm a partir da extremidade superior do grão tanto da região farinácea quanto da vítrea. Foi utilizado microscópio eletrônico de varredura na potência de 20 Kv (ZEISS, DSM 940 A).

Foram obtidas imagens no aumento de 2.000 e 500 vezes nas regiões vítrea e farinácea dos grãos.

Para contagem do número de grânulos de amido, foi utilizada a imagem de 2.000 vezes de aumento numa área de 5.200 μm², que correspondeu à área da imagem nesta resolução. Para análise da estrutura dos grânulos de amido, utilizaram-se as imagens com 500 vezes de aumento.

Para determinação da digestibilidade ruminal *in situ* dos grãos e do número e da distribuição de grânulos de amido nos endospermas vítreo e farináceo, foram cortadas oito plantas ao acaso de uma das fileiras centrais quando os grãos apresentavam-se no estágio de $\frac{3}{4}$ da linha do leite, correspondente ao ponto de ensilagem. Em seguida, foram retirados os grãos das plantas e foi retirada uma amostra homogênea de 0,3 kg, que foi seca em estufa de ventilação forçada a 55 °C até peso constante.

A digestibilidade *in situ* dos grãos colhidos no ponto de ensilagem foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Pereira et al. (2004). Foi utilizada uma amostra composta pela junção das repetições do campo de cada tratamento, com duplicata em cada animal. Para incubação ruminal, foram utilizados saquinhos de tecido *nylon* 'poliéster' de dimensões 10 x 15 cm. Cada saquinho recebeu 6 g de grãos secos a 55 °C. Os grãos foram seccionados em quatro partes visando a simular o processo de ensilagem conforme descrito por Pereira et al. (2004).

Na avaliação da digestibilidade *in situ*, o delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com duas repetições representadas por duas vacas em lactação da raça Holandesa fistuladas no rumem. Cada animal recebeu 48 pacotes, referentes a 12 híbridos, para os dois locais experimentais, somados à duplicata de cada amostra por animal. Os animais foram adaptados durante duas semanas antes da realização das análises com uma dieta padrão de 20% de concentrado e 80% de silagem de milho.

As amostras foram incubadas pelo período de 24h para estimar a digestibilidade da massa seca de grãos. Decorridas 24h de incubação, todos os saquinhos foram retirados ao mesmo tempo e mergulhados em água gelada. Em seguida, foram lavados em água corrente até a mesma escoar límpida. Os saquinhos foram levados para estufa de ventilação forçada a 55 °C até atingir peso constante e, posteriormente, procedeu-se à pesagem de cada saquinho. Então, foi determinada a digestibilidade ruminal da massa seca de grãos no tempo de 24h de incubação e os resultados foram expressos em porcentagem referente à massa seca inicial.

Foi verificada a homogeneidade das variâncias pelo teste de Hartley (Ramalho et al., 2000). Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância individual para cada local. As variâncias residuais de cada experimento foram submetidas ao teste de Hartley a 5% (Ramalho et al., 2000) e, após constatada homogeneidade, foi realizada a análise conjunta envolvendo os dois ambientes, segundo delineamento de blocos ao acaso, com tratamentos em arranjo de parcelas subdivididas para o número de grânulos de amido. As médias para número de grânulos de amido foram agrupadas pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade. Foi realizado contraste para digestibilidade dos grãos entre as médias do grupo de híbridos de grãos duros e o grupo de híbridos de grãos dentados (Tabela 1). Estas análises foram realizadas com auxílio do software estatístico Sisvar (Ferreira, 2011).

Resultados e Discussão

O padrão geral das imagens de microscopia eletrônica de varredura no endosperma vítreo dos 12 híbridos avaliados está representado pela Figura 1A. Verificou-se que os grânulos de amido são de formato poligonal arranjados com grande proximidade e uni-

formidade de tamanho, além da presença de uma matriz proteica compacta envolvendo-os, não deixando espaços entre os mesmos. Com relação ao endosperma farináceo (Figura 1B), verificou-se que os grânulos de amido são mais arredondados com uma grande amplitude de tamanho, mais numerosos, com ausência de matriz proteica envolvendo-os, associado a grandes espaços entre eles. Vale lembrar que os grãos de milho encontravam-se no estágio de $\frac{3}{4}$ da linha do leite, no ponto de ensilagem da planta inteira, e que existem poucos resultados de pesquisa com estudo de imagens de grânulos de amido publicados.

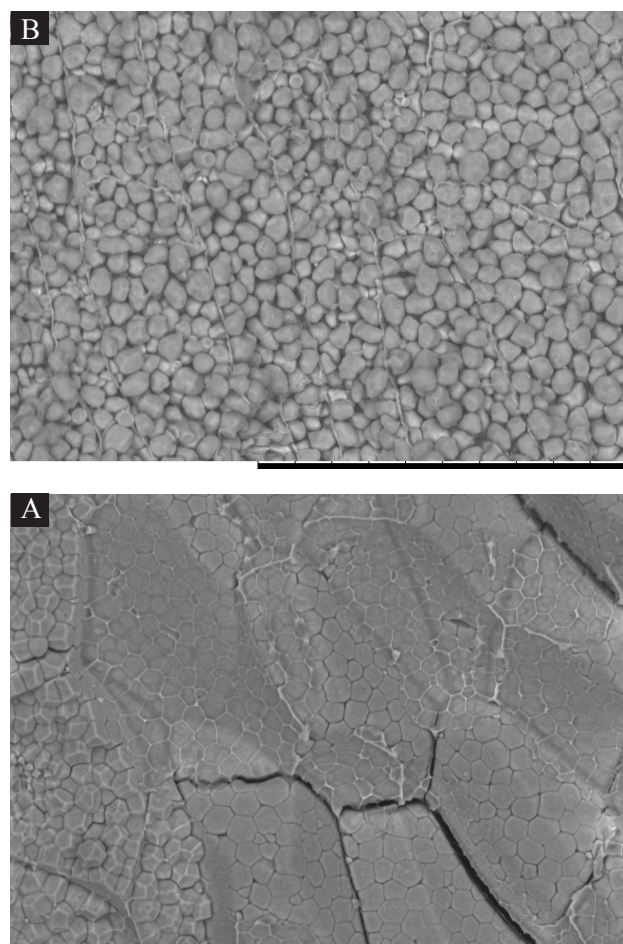


Figura 1. Micrografia eletrônica de varredura dos grânulos de amido dos endospermas vítreo (A) e farináceo (B), aumento 500X.

Para melhor entendimento do arranjo dos grânulos de amido no endosperma dos grãos e entendimento de fatores que possam influenciar na digestibilidade, é importante a realização de estudos da microestrutura do grânulo; nesse contexto, a microscopia eletrônica é uma ferramenta que permite verificar diferenças na estrutura do amido nas regiões vítrea e farinácea do grão de milho (Svihus et al., 2005).

Dombrink e Bietz (1993) e García et al. (2013) realizaram pesquisas com imagens de microscopia eletrônica das regiões vítrea e farinácea de grãos de diferentes tipos de milho e também constataram que os grânulos de amido do endosperma farináceo são menos compactos que do endosperma vítreo, arredondados, de tamanhos variados e que a matriz proteica praticamente inexistente ao redor dos grânulos de amido, confirmando os resultados encontrados na presente pesquisa. Vale destacar que, nestas duas pesquisas, os grãos de milho analisados estavam secos e com 20 e 50 dias após a polinização, respectivamente, demonstrando concordância com os resultados obtidos nesta pesquisa com grãos em $\frac{3}{4}$ da linha do leite.

Embora existam consideráveis diferenças em vitreosidade e em presença de matriz proteica entre híbridos com diferentes texturas no endosperma, Szasz et al. (2007) e García et al. (2013) constataram que não houve diferença significativa no teor de amido em grãos de milho com diferentes vitreosidades. Com isso, pode-se inferir que diferenças na textura do grão não influenciam a quantidade de amido nos grãos; contudo, podem afetar a disponibilização deste carboidrato.

Wu et al. (2010) utilizaram também microscopia eletrônica de varredura para observar a agregação de corpos proteicos com grânulos de amido em genótipos mutantes de milho Opaco 2 e em genótipos de alta qualidade proteica (QPM), com o objetivo de

entender as diferenças presentes no endosperma de plantas diferenciadas para o caráter em questão. Estes autores verificaram que, durante o desenvolvimento do endosperma, os grânulos de amido e de proteínas formam uma matriz cristalina em genótipos QPM que é determinante para dureza do grão; já nos mutantes Opaco 2, esta matriz cristalina mostrou-se ausente. Com isso, é possível inferir que existe uma grande variabilidade para o caráter, sendo uma possibilidade a ser trabalhada pelos melhoristas de plantas.

Importante destacar que as imagens de microscopia foram realizadas em grãos no ponto de silagem, ou seja, no estádio de $\frac{3}{4}$ da linha do leite e foi constatada nítida presença de matriz proteica na porção vítrea dos grãos de todos os genótipos estudados. Desta forma, fica evidente que, já neste estádio de desenvolvimento do grão, a melhor disponibilidade do amido dependerá da presença ou da ausência da matriz proteica, sendo assim fundamental uma seleção rigorosa de híbridos de milho, pois o amido desempenha importante papel como conteúdo energético no alimento.

O germoplasma de milho comercial, seja de grãos dentados ou duros é composto por genótipos que contêm endosperma vítreo e farináceo, porém em diferentes proporções, sendo endosperma vítreo em maior quantidade nos genótipos de grãos duros e menor nos de grãos dentados respectivamente (Correa et al., 2002; Piovesan et al., 2011). Assim é justamente este ponto que carece ser melhor abordado em pesquisas visando melhorar a performance do alimento que será utilizado na forma de silagem.

A matriz proteica que envolve os grânulos de amido é tida como o grande responsável por limitar a digestão do amido quando o grão é fornecido aos animais e este impedimento é resultado da característica lipofílica destas proteínas (Correa et al., 2002; Svihus et al., 2005; Momany et al., 2006; Piovesan

et al., 2011). Correa et al. (2002), avaliando híbridos de milho no ponto de silagem, e Corona et al. (2006), avaliando grãos secos, verificaram incremento na digestibilidade dos grãos de milho à medida que se reduziu a vitreosidade.

Partindo da afirmação de que o endosperma vítreo possui matriz proteica e limita a liberação do amido, que é um carboidrato não fibroso de alta energia, sugere-se o uso de híbridos com menor percentual de endosperma vítreo para alimentação animal para obtenção de melhores resultados, quando não se pretende dispor de mecanismos para quebrar a matriz proteica.

Lopez et al. (2002) empregaram microscopia eletrônica de varredura para estudar grânulos de amido em grãos de milho para silagem e constataram que é importante o rompimento da matriz proteica dos grãos e que o processo de ensilagem promove pequenas alterações nessa matriz. Entretanto, estes autores consideram que estas alterações não equivalem ao *annealing* (temperaturas próximas a 50 °C) ou ao tratamento calor-umidade (100 °C / 16 h / 27% umidade), processos estes que podem romper a matriz proteica e a superfície do grânulo de amido, contudo podem demandar uma etapa a mais no processo de produção. Assim, fica evidente que a escolha do híbrido que possuir maior proporção de endosperma farináceo reduz a necessidade do emprego de outras práticas para eliminar a matriz proteica do grão. Diante disso, pode-se inferir que é fundamental o entendimento dos fatores que possam estar associados à digestibilidade do endosperma dos grãos de milho para que as pesquisas sejam direcionadas para economia de recursos e obtenção de bons resultados na produção de silagem de qualidade.

Embora as imagens de micrografia eletrônica permitam uma avaliação qualitativa, Li et al. (2007) e García et al. (2013) obtiveram bons resultados com es-

tudos da microestrutura do amido em grãos de milho, permitindo melhor compreender a disponibilização deste carboidrato quando destinado à nutrição animal.

Para estudar diferenças quantitativas entre as regiões vítrea e farinácea dos grãos nos diferentes híbridos avaliados, foram contabilizados o número de grânulos de amido por área. Na Tabela 2, encontra-se o resumo da análise de variância conjunta para o número de grânulos de amido por área de 5.200 μm^2 nos endospermas vítreo e farináceo.

Somente houve significância dos quadrados médios para as fontes de variação local e endosperma (Tabela 2). Estes resultados demonstram que o ambiente exerceu considerável influência sobre o número de grânulos de amido e que os endospermas vítreo e farináceo possuem relevantes diferenças quanto ao número de grânulos de amido por área.

Para número médio de grânulos de amido, houve efeito significativo do local de cultivo (Tabela 3), com maior número de grânulos de amido por área do grão (5.200 μm^2) dos genótipos cultivados em Laranjeiras do Sul (57,98) frente a Guarapuava (51,58). Embora a magnitude de diferença não tenha sido grande, este caráter foi afetado pelo ambiente a que as plantas foram submetidas. Guarapuava está a 1.200 m de altitude, possui dias quentes e noites com temperaturas amenas (grande amplitude térmica) (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2014); já Laranjeiras do Sul está a 700 m de altitude e possui temperaturas diurnas elevadas, contudo a temperatura noturna é também elevada, com menor amplitude térmica. De acordo com Durães (2007), estas condições causam grande influência nas respostas das plantas de milho, seja pela modificação no ciclo, pela alteração da relação fonte-dreno e pela produção. Estes podem ser fatores que afetam o número de grânulos de amido no endosperma.

Tabela 2. Resumo da análise de variância conjunta para número de grânulos de amido nos endospermas vítreo e farináceo em 5.200 μm^2 com 2.000X de aumento referente a 12 híbridos comerciais de milho avaliados no Centro-Sul do Paraná.

FV	GL	Número de Grânulos de Amido
		Quadrado Médio
Local (L)	1	1475,84**
Híbrido (H)	11	139,62
H x L	11	71,21
Bloco/Local	4	667,54
Erro a	22	83,41
Endosperma (E)	1	6413,34**
L x E	11	162,56
H x E	1	41,20
L x H x E	11	47,39
Erro b	70	64,3
Média Geral		54,78
CV1%		16,67
CV2%		14,64

* e ** significativo, a 1% e a 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

Tabela 3. Valores médios do número de grânulos de amido nos endospermas vítreo e farináceo em 5.200 μm^2 com 2.000X de aumento referentes a 12 híbridos de milho avaliados em dois locais no Centro-Sul do Paraná.

Endosperma	Guarapuava	Laranjeiras do Sul	Média
Vítreo	45,97	50,25	48,11 a
Farináceo	57,19	65,72	61,45 b
Média	51,58 B	57,98 A	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de F ($P < 0,05$).

Quando analisado cada tipo de endosperma separadamente, constatou-se diferença significativa no número de grânulos de amido entre os endospermas vítreo e farináceo (Tabela 3). Houve maior número de grânulos de amido no endosperma farináceo frente ao endosperma vítreo na média dos dois locais, com 22% de diferença (Tabela 3). Estas diferenças podem

ser consideradas expressivas e confirmam o que foi observado nas micrografias eletrônicas (Figuras 1A e 1B), em que visualiza-se densa matriz proteica no endosperma vítreo, com menor número de grânulos de amido frente ao endosperma farináceo.

Com maior número de grânulos de amido no endosperma farináceo, pode-se inferir que haverá

maior superfície específica nesta região e, dessa forma, maior superfície exposta para o ataque enzimático para degradação do amido no rumem. A maior superfície específica dos grânulos de amido na porção farinácea do grão pode ser também um fator a favorecer a digestão do amido desta porção do grão, podendo a melhor digestibilidade não estar ligada somente à presença da matriz proteica. Assim, com o emprego da técnica de microscopia eletrônica de varredura, consegue-se avançar no entendimento dos fatores que controlam a digestibilidade do amido em grãos de milho.

Vale ressaltar também que o maior número de grânulos de amido no endosperma farináceo não indica que todos os grânulos de amido são de menor tamanho, pois ficou evidente que, neste endosperma, houve grande variabilidade no tamanho, com grânulos grandes e bem pequenos que estão entre os menores espaços (Figura 1B), característica esta ausente na região vítrea do grão. A partir dos resultados da Tabela 3, fica evidente que há relevantes diferenças entre as regiões vítrea e farinácea do grão e que, provavelmente, o arranjo dos grânulos de amido com proteínas e a possivelmente menor superfície específica na porção vítrea desfavorecem a digestão ruminal do amido. Assim, grãos com maior proporção de endosperma farináceo poderão ter melhor facilidade na disponibilização do amido, sem a necessidade de algum processamento para eliminar a matriz proteica que certamente envolverá uma etapa a mais no pro-

cesso de produção de silagem, com possíveis gastos econômicos.

O contraste entre as médias de digestibilidade dos grãos foi significativo e o grupo de híbridos dentados foi superior frente ao grupo de híbridos duros (Tabela 4). O grupo de híbridos dentados foi 7,2% mais digestível que o grupo de híbridos duros e esta diferença pode ser considerada expressiva, pois atualmente os ganhos significativos em todos os sistemas de produção são cada vez mais difíceis de se obter. Desta forma, com a escolha do genótipo a ser cultivado, conseguiu-se verificar ganhos no aproveitamento do alimento produzido, sem aumentar em nada o custo de produção. Isto torna-se mais importante para produção de silagem, por ser o grão o componente da planta com maior participação na massa seca (40%) (Oliveira et al., 2013) e que possui elevados teores de amido, conferindo valor energético a este alimento (Ribas et al., 2007).

A superioridade em digestibilidade dos grãos de híbridos dentados (Tabela 4) sugere que estes genótipos possuem melhor aptidão para confecção de silagem de alta qualidade e dá suporte aos resultados obtidos com as imagens de microscopia (Figuras 1A e 1B). Com os resultados das imagens de microscopia eletrônica dos grânulos de amido desta pesquisa associados à digestibilidade ruminal dos grãos, é possível compreender e justificar porque os grãos de milho de endosperma duro manifestam menor digestibilidade. Isto fica mais evidente na Figura 1A, na qual observa-

Tabela 4. Média da digestibilidade dos grãos dos grupos de híbridos de grãos duros e dentados e estimativa do contraste referentes a 12 híbridos de milho avaliados em dois locais no Centro-Sul do Paraná.

Digestibilidade %		Estimativa do contraste %	
Grãos Duros	Grãos Dentados	Duro vs. Dentado	P contraste
51,6	55,6	-4,0	0,001

P: significância do efeito do contraste para o teste de F.

se na porção vítrea do grão um agrupamento compacto dos grânulos de amido com a matriz proteica e que certamente poderá servir de impedimento à passagem rápida de água, além de um menor número de grânulos, resultando em menor superfície para colonização por microrganismos do rumem.

Estudos apontam que a menor digestibilidade de grãos duros quando comparados aos dentados pode ser atribuída ao menor ataque enzimático aos grânulos de amido que podem estar envoltos por uma densa matriz de proteína no endosperma vítreo, estando estes resultados de pesquisa em conformidade com os obtidos nesta pesquisa (Pereira et al., 2004; Ribas et al., 2007).

O grão de milho é um componente que compõe aproximadamente 40% da massa seca da silagem (Oliveira et al., 2013) e certamente variações na digestibilidade desta porção influenciarão a digestibilidade do produto final, devendo ser então um fator a se relevar para obtenção de bons resultados na produção de silagem de qualidade.

Taylor e Allen (2005) compararam híbridos duros (maior proporção de endosperma vítreo) e dentados (menor proporção de endosperma vítreo) compondo ração na dieta de bovinos quanto à taxa de passagem ruminal e à digestibilidade do amido e verificaram que a taxa de passagem do amido de grãos dentados é mais lenta associada à melhor digestibilidade em vacas lactantes.

Ribas et al. (2007) observaram que, em híbridos de grãos dentados, o tempo de colonização da silagem por bactérias do rumem é menor, atribuindo este resultado à maior disponibilidade do amido, que é um carboidrato rapidamente fermentável quando livre da matriz proteica. Estes resultados auxiliam no entendimento dos resultados obtidos por Taylor e Allen (2005) e na presente pesquisa, cuja maior diges-

tibilidade dos grãos foi manifestada por genótipos de milho de grãos dentados.

Conclusões

Há maior número de grânulos de amido no endosperma farináceo dos grãos de milho quando comparado ao endosperma vítreo, aumentando assim a superfície específica dos grânulos, nos híbridos de milho avaliados no ponto de ensilagem.

A digestibilidade dos grãos de milho colhidos no ponto de silagem foi superior no grupo de híbridos dentados quando comparado ao grupo de híbridos de endosperma duro.

Agradecimentos

À Capes, pelo apoio financeiro, e à Cooperativa Cooprossel, pela parceria, fornecendo área experimental.

Referências

- BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 23, n. 2, p. 85-112, 1998. [DOI: 10.1016/S0141-8130\(98\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(98)00040-3).
- CANTARELLI, V. S.; FIALHO, E. T.; SOUSA, R. V.; FREITAS, R. T. F.; LIMA, J. A. F. Composição química, vitreosidade e digestibilidade de diferentes híbridos de milho para suínos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 860-864, 2007. [DOI: 10.1590/S1413-70542007000300036](https://doi.org/10.1590/S1413-70542007000300036).
- CORONA, L.; OWENS, F. N.; ZINN, R. A. Impact of corn vitreousness and processing on site and extent of digestion by feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 11, p. 3020-3031, 2006. [DOI: 10.2527/jas.2005-603](https://doi.org/10.2527/jas.2005-603).

- CORREA, C. E. S.; SHAVER, R. D.; PEREIRA, M. N.; LAUER, J. G.; KOHN, K. Relationship between corn vitreousness and ruminal *in situ* starch degradability. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 11, p. 3008-3012, 2002.
[DOI: 10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74386-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74386-5).
- CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; QUEIROZ, L. R. **Cultivares para safra 2013/2014**. Disponível em: <<http://www.cnps.embrapa.br/milho/cultivares/index.php>>. Acesso em: 15 jan. 2015.
- DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 945-954, 2009.
[DOI: 10.1590/S0103-84782009005000003](https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000003).
- DOMBRINK, M. A.; BIETZ, J. A. Zein composition in hard and soft endosperm of maize. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 70, n. 1, p. 105-108, 1993.
- DURÃES, F. O. M. **Limitações fisiológicas do milho nas condições de plantio nas regiões tropicais baixas**. 2007. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/limitemilho/index.htm>. Acesso em: 22 jul. 2014.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 35, n. 6. p. 1039-1042, 2011.
[DOI: 10.1590/S1413-70542011000600001](https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001).
- GARCÍA, E. J.; ACEVEDO, E. A.; MONTIEL, N. O. G.; ROBLES, V. P.; PÉREZ, L. A. B. Proteomic analysis of the enzymes involved in the starch biosynthesis of maize with different endosperm type and characterization of the starch. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 93, n. 11, p. 2660-2668, 2013.
[DOI: 10.1002/jsfa.6054](https://doi.org/10.1002/jsfa.6054).
- INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. Séries temporais para análise de mudanças de uso e cobertura da terra. Disponível em: <<https://www.dsr.inpe.br/laf/series/index.php>>. Acesso em: 18 jan. 2015.
- KUAKPETOON, D.; WANG, Y. J. Internal structure and physicochemical properties of corn starches as revealed by chemical surface gelatinization. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 342, n. 15, p. 2253-2263, 2007.
[DOI: 10.1016/j.carres.2007.06.010](https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.06.010).
- LI, L.; BLANCO, M.; JANE, J. Physicochemical properties of endosperm and pericarp starches during maize development. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 67, n. 4, p. 630-639, 2007. [DOI: 10.1016/j.carbpol.2006.08.013](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.08.013).
- LOPEZ, A. B. R. C.; LEONEL, M.; CEREDA, M. P.; BERTO, D. A. The effect of the ensilage process of moist corn grains on the microscopic characteristics of the starch. **Brazilian Journal of Food and Technology**, Botucatu, v. 5, n. 33, p. 177-181, 2002.
- MOMANY, F. A.; SESSA, D. J.; LAWTON, J. W.; SELLING, G. W.; HAMAKER, S. A. H.; WILLET, J. L. Structural characterization of alpha-zein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 2, p. 543-547, 2006. [DOI: 10.1021/jf058135h](https://doi.org/10.1021/jf058135h).
- OLIVEIRA, M. R.; NEUMANN, M.; JOBIM, C. C.; UENO, R. K.; MARAFON, F.; NERI, J. Composição morfológica e nutricional de plantas e silagens de milho em diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 12, n. 2, p. 183-192, 2013. [DOI: 10.18512/1980-6477/rbms.v12n2p183-192](https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v12n2p183-192).
- PEREIRA, M. N.; VON PINHO, R. G.; BRUNO, R. G. S.; CALESTINE, G. A. Ruminal degradability of hard or soft texture corn grain at three maturity stages. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 4, p. 358-363, 2004.
[DOI: 10.1590/S0103-90162004000400002](https://doi.org/10.1590/S0103-90162004000400002).
- PIOVESAN, V.; OLIVEIRA, V.; GEWEHR, C. E. Milhos com diferentes texturas de endosperma e adição de alfa-amilase na dieta de leitões. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 11, p. 2014-2019, 2011.
[DOI: 10.1590/S0103-84782011005000134](https://doi.org/10.1590/S0103-84782011005000134).
- RAMALHO, M. A. P.; FERREIRA, D. F.; OLIVEIRA, A. C. **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. Lavras: UFLA, 2000. 326 p.

- RIBAS, M. N.; GONÇALVES, L. C.; MAURÍCIO, R. M. Degradabilidade e cinética de fermentação ruminal de silagens de quatro híbridos de milho, avaliadas pela técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 6, n. 2, p. 223-233, 2007. DOI: [10.18512/1980-6477/rbms.v6n2p223-233](https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v6n2p223-233).
- SCHAEFER, C. M.; BERNARDO, R. Pollen control and spatial and temporal adjustment in evaluation of kernel composition of maize inbreds. **Maydica**, Bergamo, v. 58, n. 2, p. 135-140, 2013.
- SVIHUS, B.; UHLEN, A. K.; HASTAD, O. M. Effect of starch granule structure, associated components and processing on nutritive value of cereal starch: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 122, n. 3/4, p. 303-320, 2005. DOI: [10.1016/j.anifeedsci.2005.02.025](https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.02.025).
- SZASZ, J. I.; HUNT, C. W.; SZASZ, P. A.; WEBER, R. A.; OWENS, F. N.; KEZAR, W.; TURGEON, O. A. Influence of endosperm vitreousness and kernel moisture at harvest on site and extent of digestion of high-moisture corn by feedlot steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 9, p. 2214-2221, 2007. DOI: [10.2527/jas.2006-288](https://doi.org/10.2527/jas.2006-288).
- TAYLOR, C. C.; ALLEN, M. S. Corn grain endosperm type and brown midrib 3 corn silage: site of digestion and ruminal digestion kinetics in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 4, p. 1413-1424, 2005. DOI: [10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72809-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72809-5).
- WU, Y.; HOLDING, D. R.; MESSING, J. γ -Zeins are essential for endosperm modification in quality protein maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 29, p. 12810-12815, 2010. DOI: [10.1073/pnas.1004721107](https://doi.org/10.1073/pnas.1004721107).