

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

**Associação de aditivos microbianos na ensilagem e o desempenho de vacas em lactação recebendo silagem de cana-de-açúcar comparada a volumosos tradicionais**

**Oscar César Müller Queiroz**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens**

**Piracicaba**

**2006**

**Oscar César Müller Queiroz  
Engenheiro Agrônomo**

**Associação de aditivos microbianos na ensilagem e o desempenho de vacas em lactação recebendo silagem de cana-de-açúcar comparada a volumosos tradicionais**

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

**Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens**

**Piracicaba**

**2006**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Queiroz, Oscar Cézar Müller

Associação de aditivos microbianos na ensilagem e o desempenho de vacas em lactação recebendo silagem de cana-de-açúcar comparada a volumosos tradicionais / Oscar Cézar Muller Queiroz. - - Piracicaba, 2006.  
99 p.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. Alimentos volumosos 2. Cana-de-açúcar 3. Ensilagem 4. Fermentação alcoólica anaeróbia 5. Lactação animal 6. Lactobacillus 7. Leite – Produção 8. Ração 9. Silagem 10. Uréia I. Título

CDD 636.08552

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

**“É preferível ter a alma dolorida de tanto buscar do que tê-la em paz  
por haver renunciado a busca”**

**Oscar Wilde**

**A**

**meus pais, Marivaldo A. Queiroz e Ana M. Müller;**

**minhas irmãs Helena e Elisa;**

**meu cunhado Cris;**

**Dedico**

**À pessoa mais doce que conheci na minha vida,  
minha avó.**

**Ofereço**

## AGRADECIMENTOS

À **USP/ESALQ**, por meio do **Departamento de Zootecnia**, pela oportunidade da realização do mestrado.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – Fapesp** pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. **Luiz Gustavo Nussio** pela orientação na realização desse trabalho, que auxiliou no meu desenvolvimento profissional.

À empresa: **Lallemand**, pelo apoio financeiro.

Aos seniores **Lucas José Mari, Patrick Schmidt, José Leonardo Ribeiro, Maity Zoppolato, Solidete de Fátima e Daniele** pelo exemplo de profissionalismo e dedicação.

Aos amigos **Mateus Castilho Santos e Sérgio Gil de Toledo Filho** pelo companheirismo e amizade.

A querida amiga **Vanessa Pillon** pelo apoio e conselhos.

Aos estagiários **Lucas Vieira, Mateus Trivelin, Liege, Mattheus e Alexandre Carvalho** e alunos do **CPZ** pelo apoio e dedicação.

Ao professor **kung Junior** e ao amigo **Renato Schmidt** por todo apoio e ensinamentos.

Aos amigos de longa data engenheiros agrônomos **José Vitor Salvi, André Beltrame, Marcos Antônio Matos**, pelo convívio e conselhos.

À **Talita Sélios** pelo carinho e compreensão.

Aos amigos da república **K-labouço**, minha primeira escola da vida. Que a corrente jamais seja quebrada!

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia: **Carlos César e Tânia** pelo apoio nas atividades realizadas durante a pós-graduação.

A todos, que direta ou indiretamente, auxiliaram na realização desse trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT .....	10
1 INTRODUÇÃO .....	11
2 ASSOCIAÇÃO DE ADITIVOS QUÍMICOS E MICROBIANOS NA DINÂMICA FERMENTATIVA E ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGENS DE CANA-DE-AÇÚCAR ( <i>Saccharum officinarum</i> L.) .....	13
Resumo .....	13
Abstract .....	14
2.1 Introdução .....	15
2.2 Desenvolvimento .....	16
2.2.1 Revisão bibliográfica .....	16
2.2.1.1 Cana-de-açúcar.....	16
2.2.1.2 Silagem de cana-de-açúcar.....	17
2.2.1.3 Fermentação alcoólica e a qualidade da silagem.....	19
2.2.1.4 Valor energético do etanol.....	20
2.2.1.5 Bioquímica da fermentação.....	20
2.2.1.6 Aditivos.....	22
2.2.1.6.1 Uréia.....	22
2.2.1.6.2 <i>Lactobacillus buchneri</i> .....	23
2.2.1.6.3 <i>Lactobacillus diolivorans</i> .....	25
2.2.1.6.4 Associações de microrganismos .....	26
2.2.1.6.5 1,2-propanodiol .....	27
2.2.1.7 Ação antifúngica dos ácidos.....	28
2.2.2 Material e métodos .....	29
2.2.2.1 Local do experimento .....	29
2.2.2.2 Silos laboratoriais e confecção da silagem.....	29
2.2.2.3 Tratamentos .....	30
2.2.2.4 Aplicação dos aditivos .....	30
2.2.2.5 Enchimento dos silos.....	31
2.2.2.6 Avaliação de perdas .....	32

2.2.2.7 Equações para estimar perdas.....	32
2.2.2.8 Ensaio de estabilidade aeróbia .....	33
2.2.2.9 Avaliação químico-bromatológica.....	34
2.2.2.10 Análise estatística.....	36
2.2.3 Resultados e discussão.....	36
2.2.3.1 Avaliação da composição bromatológica .....	36
2.2.3.2 Avaliação de perdas nos processos fermentativos .....	47
2.2.3.2.1 Perda por gases .....	47
2.2.3.3 Análise da pós-abertura: estabilidade aeróbia .....	52
2.3 CONCLUSÃO.....	56
Referências .....	57
3 SILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR ( <i>Saccharum officinarum</i> L.) COMPARADA A FONTES TRADICIONAIS DE VOLUMOSOS SUPLEMENTARES NO DESEMPENHO DE VACAS DE ALTA PRODUÇÃO.....	64
Resumo .....	64
Abstract .....	65
3.1 Introdução .....	66
3.2 Desenvolvimento.....	67
3.2.1 Revisão Bibliográfica.....	67
3.2.1.1 Desempenho animal com dietas a base de silagem de cana-de-açúcar .....	67
3.2.1.2 Desempenho animal com dietas a base de cana-de-açúcar <i>in natura</i> ou silagem de milho.....	69
3.2.2 Material e métodos.....	71
3.2.2.1 Local do experimento .....	71
3.2.2.2 Confecção das silagens e manejo da cana-de-açúcar <i>in natura</i> .....	71
3.2.2.3 Tratamentos .....	72
3.2.2.4 Animais e instalações.....	72
3.2.2.5 Rotina experimental.....	73
3.2.2.6 Delineamento experimental.....	74
3.2.2.7 Avaliação químico-bromatológica.....	74
3.2.2.8 Ensaio de estabilidade aeróbia .....	76

3.2.2.9 Avaliação do comportamento ingestivo das vacas.....	76
3.2.2.10 Desempenho dos animais .....	77
3.2.2.11 Composição do leite .....	78
3.2.3 Resultados e discussão.....	78
3.2.3.1 Avaliação da estabilidade aeróbia dos volumosos e das dietas.....	78
3.2.3.2 Avaliação da composição bromatológica .....	84
3.2.3.4 Avaliação do comportamento ingestivo dos animais .....	91
3.3 Conclusão .....	93
REFERÊNCIAS.....	94



## RESUMO

### **Associação de aditivos microbianos na ensilagem e o desempenho de vacas em lactação recebendo silagem de cana de açúcar comparada a volumosos tradicionais**

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de aditivos químicos, microbianos e a associação destes sobre a dinâmica fermentativa e a estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar, além de avaliar o desempenho de vacas leiteiras de alto potencial produtivo recebendo rações com diferentes fontes de volumosos. No primeiro experimento silagens de cana-de-açúcar foram confeccionadas em silos laboratoriais de 20L, contendo válvula para escape de gases e coleta de efluente. O experimento seguiu o delineamento inteiramente ao acaso, em esquema fatorial sendo constituído por dois períodos de abertura (80 e 140 dias) com 8 tratamentos e 4 repetições. Os tratamentos avaliados foram: uréia 1%MV, 1,2-propanodiol 1%MS (1,2 p), *L. buchneri*  $5 \times 10^4$  ufc/g (Lb), *L. diolivorans* em duas concentrações  $1 \times 10^5$  ufc/g (Ld  $10^5$ ) e  $1 \times 10^6$  ufc/g (Ld  $10^6$ ), *L. diolivorans*  $1 \times 10^6$  ufc/g + *L. buchneri*  $5 \times 10^4$  ufc/g (Ld+Lb) e 1,2-propanodiol 1%MS + *L. diolivorans*  $1 \times 10^6$  ufc/g (1,2 p+Ld  $10^6$ ). Após abertos os silos foram realizadas avaliações de estabilidade aeróbia em sala com ambiente controlado. Os tratamentos contendo *L. diolivorans* mais 1,2-propanodiol ou *L. diolivorans* mais *L. buchneri* apresentaram os menores valores de perda total de matéria seca 20,42% e 23,73%, respectivamente. Ambos tratamentos também resultaram nos menores teores de etanol, 2,1% e 3,93% da MS, e de perdas gasosas, 20,36% e 20,62%. Tanto para FDN quanto FDA, foram observados valores menores para os tratamentos contendo uréia, 1,2-p + Ld  $10^6$ , Ld + Lb e Ld  $10^5$ . Quanto à estabilidade aeróbia houve diferenças entre os períodos de abertura, sendo de 48,03h aos 140 dias e de 31,35h aos 80 dias. O microrganismo *L. diolivorans* se constituiu em uma alternativa capaz de trazer benefícios quanto às perdas fermentativas e composição bromatológica em silagens de cana-de-açúcar. O segundo experimento avaliou o desempenho de vacas recebendo rações contendo diferentes fontes de volumosos: cana-de-açúcar *in natura*, silagem de cana-de-açúcar inoculada com *L. buchneri*, silagem de milho e proporções equivalentes de silagem de milho e cana-de-açúcar *in natura* (50:50). O experimento contou com 48 vacas Holandesas em estágio intermediário de lactação, distribuídas em múltiplos quadrados latinos 4x4 com períodos de 21 dias, sendo 14 dias de adaptação e 7 dias de coleta de amostras. Além da avaliação de desempenho, foram realizadas análises de composição bromatológica dos alimentos e do leite, e avaliações do comportamento ingestivo dos animais e da estabilidade aeróbia dos volumosos e das rações. Os dados de desempenho mostraram diferenças na ingestão de MS, com maiores valores observados para o tratamento silagem de cana-de-açúcar (23,5 kg/dia) e a mistura cana-de-açúcar mais silagem de milho (23,5 kg/dia). Todas as rações resultaram em produções elevadas de leite (22,65 kg/dia) as quais não diferiram entre si. A composição do leite variou somente para o teor de gordura, sendo maior para a silagem de milho (3,61%) e a mistura com cana (3,48%). A silagem de cana-de-açúcar mostrou-se como alternativa

interessante frente à cana-de-açúcar *in natura*, e que ambas podem proporcionar elevadas produções desde que as rações sejam corretamente balanceadas.

Palavras-chave: 1,2-propanodiol, uréia; *L. buchneri*; *L. diolivorans*; silagem de milho; produção de leite

## ABSTRACT

### **Microbial additives on ensiling and the performance of lactating cows fed with sugarcane silage compared to traditional roughage sources**

The current study aimed to evaluate the effect of chemical and microbial additives and the combination over the fermentative dynamics and the aerobic stability in the sugarcane silage as well to study the performance of high producing dairy cows fed with different roughage sources. In the first trial, sugarcane silage was prepared in lab silos of 20L, with a gas relief valve and a device for collecting effluent. The experiment was randomly arranged, in a factorial design, with two openings 80 and 140 days, across 8 treatments and 4 replications. The treatments evaluated were: urea 1%, 1,2-propanediol 1%DM (1.2 p) *L. buchneri*  $5 \times 10^4$  cfu/g (Lb), *L. diolivorans* in two concentrations  $1 \times 10^5$  cfu/g (Ld  $10^5$ ) and  $1 \times 10^6$  cfu/g (Ld  $10^6$ ), *L. diolivorans*  $1 \times 10^6$  cfu/g plus *L. buchneri*  $5 \times 10^4$  cfu/g (Ld+Lb) and 1,2- propanediol 1%DM plus *L. diolivorans*  $1 \times 10^6$  cfu/g (1,2 p+Ld  $10^6$ ). After opening the silos, the aerobic stability assay was performed in an environmental controlled room. The treatments containing Ld +1.2 p, or Ld  $10^6$  + Lb showed the lowest values of total DM loss, 20.42% and 23.73% respectively. Both treatments also showed the lowest levels of ethanol 2.1% and 3.93% of DM, and gases losses 20.36% and 20.62%. For both NDF and ADF, lower values were detected for the following treatments: urea, 1.2 p + Ld  $10^6$ , Ld + Lb and Ld $10^5$ . As for the aerobic stability, there were differences between the openings dates, 48.03h (140 days) and 31.35h (80 days). The microorganism *L. diolivorans* turn out to be promising alternative able to show positive results on the fermentative losses and nutritive value in sugarcane silage. The second experiment evaluated the performance of cows fed rations with different sources of roughage: fresh sugarcane, sugarcane silage, corn silage and mixture of corn silage and fresh sugarcane (50:50). Forty eight mid lactation Holstein cows were assigned to multiple latin square design 4x4, with 21-d period (14-d adaptation and 7-d the sample collection). As well the animal performance fed and milk compositions were evaluated and also ingestivo behavior of cows and the aerobic stability of forage and rations were analyzed. The performance data has shown differences in the dry matter intake (DMI), with the highest values observed for the sugarcane silage (23.5 kg/day) and the mixture (23.5 kg/day). All rations resulted in high milk production (22.65 kg/day) which did not differ among treatments. The milk composition varied only for the fat percentage, which was higher for the corn silage treatment (3.61%) and the mix (3.48%). Sugarcane silage was exhibited as an interesting forage alternative when compared to fresh sugarcane. Both options may support high milk yields by the adequacy of rations balancing.

Keywords: 1,2-propanediol, urea, corn silage, milk production, *L. buchneri*; *L. diolivorans*

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar é umas das mais importantes para o agronegócio brasileiro. O Brasil se destaca como maior produtor mundial de cana-de-açúcar, contando com a produção de 423 milhões de toneladas na última safra. Contudo, a importância da planta não se restringe somente na área da indústria do açúcar e do álcool, relatos de 1913 já mencionavam o uso da cana-de-açúcar como fonte de volumoso suplementar aos animais.

Tradicionalmente a cana-de-açúcar é colhida diariamente sendo então picada e fornecida aos animais. Entretanto, o uso da planta em sistemas de produção intensivo e de grande escala tem aumentado, com isso também tem havido o aumento da demanda por novas tecnologias.

Um dos principais fatores que norteiam a tomada de decisão pelo uso da cana-de-açúcar é o problema logístico decorrente da colheita diária da forragem, tais problemas são intensificados em propriedades com grandes rebanhos.

A possibilidade do uso da cana-de-açúcar na forma de silagem tem sido uma alternativa para se resolver os problemas advindos do corte diário, além é claro da praticidade que o uso de silagens proporciona a todo o sistema de produção.

Por apresentar grande quantidade de carboidratos solúveis a cana-de-açúcar é altamente susceptível ao ataque de leveduras. Dentro do ambiente anaeróbico do silo, as leveduras são capazes de gerar perdas significativas em função da fermentação alcoólica.

O acúmulo de etanol pode não somente representar perdas do material ensilado, mas também perdas decorrentes da recusa dos animais.

Tendo em vista o cenário que envolve o uso da cana-de-açúcar ensilada, o meio acadêmico vem pesquisando inúmeros aditivos capazes de controlar a população de leveduras diminuindo assim as perdas decorrentes dos processos fermentativos.

Em alguns ensaios foi observada melhora na dinâmica fermentativa de silagens de cana-de-açúcar inoculadas com *L. buchneri*, o que resultou em menores teores de etanol e menores perdas totais.

Ao avaliar animais recebendo silagens de cana-de-açúcar com aditivos químicos e bacterianos também se constatou que o tratamento de uréia 1% proporcionou resultados satisfatórios e promissores.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de aditivos químicos, bacterianos e a associação de aditivos na dinâmica fermentativa e na estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar, além de avaliar o desempenho de animais de alta produção recebendo rações a base de cana-de-açúcar, in natura ou ensilada, como fonte de volumoso suplementar alternativo.

## 2 ASSOCIAÇÃO DE ADITIVOS QUÍMICOS E MICROBIANOS NA DINÂMICA FERMENTATIVA E ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGENS DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)

### Resumo

O experimento foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de aditivos químicos, microbianos e suas associações sobre a dinâmica fermentativa, composição bromatológica e estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar. No ensaio conduzido durante 140 dias foram utilizados silos experimentais contendo sistema de drenagem e válvulas para escape de gás permitindo assim a mensuração de perdas de efluente e gases, além da perda total de matéria seca. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com 8 tratamentos, 4 repetições por tratamento, com duas épocas de abertura (80 e 140 dias). Os tratamentos impostos à forragem neste ensaio foram: uréia 1%MV e 1,2-propanodiol 1%MS (1,2 p), *L. buchneri*  $5 \times 10^4$  ufc/g de MV (Lb), *L. diolivorans* em duas concentrações  $1 \times 10^5$  ufc/g de MV (Ld  $10^5$ ) e  $1 \times 10^6$  ufc/g de MV (Ld  $10^6$ ), *L. diolivorans*  $1 \times 10^6$  ufc/g e *L. buchneri*  $5 \times 10^4$  ufc/g (Ld+Lb). A associação entre tratamentos químicos e microbianos foi constituída pela adição de 1,2-propanodiol 1%MS ao *L. diolivorans*  $1 \times 10^6$  ufc/g (1,2 p+Ld  $10^6$ ). Os parâmetros avaliados foram: composição bromatológica das silagens, estabilidade aeróbia e perdas fermentativas. Os tratamentos contendo 1,2p + Ld  $10^6$ , ou Ld + Lb apresentaram os menores valores de perdas totais de MS (PMS) 20,42% e 23,73%, respectivamente. Ambos os tratamentos também resultaram nos menores teores de etanol 2,1% e 3,93% da MS e de perdas gasosas 20,36% e 20,62%. Houve efeito de tratamento sobre o teor de MS das silagens, sendo que os tratamentos que apresentaram menores perdas de MS (1,2 p + Ld  $10^6$  e Ld + Lb) foram também os que apresentaram maiores teores de matéria seca (24,51% e 26,30 %). Os teores de FDN e FDA foram inferiores para os tratamentos contendo uréia, 1,2 p + Ld  $10^6$ , Ld + Lb e Ld  $10^5$ . Os dados relacionados à estabilidade aeróbia, mostraram haver diferenças entre as épocas de aberturas, alcançando 48,03h para a segunda data de abertura (140 dias) e somente 31,35h para a abertura ocorrida aos 80 dias. O acúmulo térmico ocorrido aos cinco ou dez dias de avaliação, da diferença diária entre a temperatura das silagens expostas ao ar e a temperatura ambiente, mostrou haver maior variação de temperatura para os silos abertos aos 140 dias que aos 80 dias, tanto no ADITE-5 (30,43°C contra 14,91°C) quanto no ADITE-10 (61,86°C contra 35,66°C). Os dados em conjunto sugerem que o microrganismo *L. diolivorans* se constitui em uma alternativa interessante capaz de trazer benefícios quantos as perdas fermentativas e composição bromatológica em silagens de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: 1,2-propanodiol, uréia, *L. buchneri*, *L. diolivorans*

**COMBINATION OF CHEMICAL AND MICROBIAL ADDITIVES ON THE  
FERMENTATIVE DYNAMICS AND AEROBIC STABILITY OF SUGARCANE  
(*Saccharum officinarum* L.) SILAGES**

**Abstract**

The experiment aimed to evaluate the effect of chemical and microbial additives and their combinations over the fermentative dynamics, nutritive value and aerobic stability of sugarcane silages. In a 140-d trial experimental silos fitted with a drainage system and gases relief valves were used allowing then, the measurement of effluent gases losses, and the total loss of dry matter. The experiment was randomly arranged, in a factorial design, with two openings (at 80 to 140 days) across 8 treatments and 4 replications. The treatments evaluated were: urea 1% (WB) and 1,2-propanediol 1% DM (1,2 p), *L. buchneri*  $5 \times 10^4$  cfu/g (Lb), *L. diolivorans* in two concentrations  $1 \times 10^5$  cfu/g (Ld  $10^5$ ) and  $1 \times 10^6$  cfu/g (Ld  $10^6$ ), *L. diolivorans* and *L. buchneri*  $5 \times 10^4$  cfu/g (Ld+Lb), 1,2-propanediol 1%DM and *L. diolivorans*  $1 \times 10^6$  cfu/g (1,2 p+Ld  $10^6$ ). The parameters studied were: nutritive value of silages, aerobic stability and fermentation losses. As for the fermentative dynamics, the treatments containing 1,2 p + Ld  $10^6$ , or Ld +Lb showed the lowest values for total DM loss 20.42% and 23.73% respectively. Both treatments also presented the lowest levels of ethanol 2.1% and 3.93%, and gases losses 20.36% and 20.62%. There was treatment effect over the DM content of silages, and those which revealed the lowest DM losses (1,2 p + Ld  $10^6$  and Ld +Lb) were also the ones that resulted in higher DM content (24.51% and 26.30 %). For both NDF and ADF, lower values were detected for the following treatments: urea, 1,2 p+ Ld  $10^6$ , Ld +Lb and Ld  $10^5$ . As for the aerobic stability there were differences between the opening dates, 48.03h (140 days) and 31.35h (80 days). The accumulated temperature during five or ten days, based on the daily difference between the temperature of silages exposed to air and environmental temperature pattern showed increased variation for the silos opened lately (140-d) than those opened earlier (80-d) with ADITE-5 (30.43°C vs 14.91°C) as well as in ADITE-10 (61.86°C vs 35.66°C), respectively. The experimented data suggests *L. diolivorans* as an promising alternative able to show positive results on the fermentation losses and nutritive value in sugarcane silages.

Keywords: 1,2-propanediol, urea, *L.buchneri*; *L.diolivorans*

## 2.1 Introdução

A cultura de cana-de-açúcar é tradicionalmente utilizada na alimentação de ruminantes na forma *in natura*, sendo picada diariamente e fornecida aos animais como forragem suplementar.

A escolha pela cana-de-açúcar se dá principalmente por esta apresentar grande produtividade, baixo custo por tonelada de matéria seca, elevada produção de NDT e ponto de maturação na época de maior demanda, ou seja, quando há escassez de forragem.

A dificuldade de fornecimento diário de cana-de-açúcar fresca e picada, associado ao fato dos inconvenientes dos tratamentos culturais escalonados nas áreas cultivadas, estimulou o interesse de produtores e da pesquisa em se utilizar a ensilagem de cana-de-açúcar como estratégia de fornecimento de volumoso na época do inverno.

A cana-de-açúcar apresenta como desvantagem a alta susceptibilidade à fermentação alcoólica, sendo que teores de etanol de 17,5% MS já foram reportados na literatura. O aumento do teor de etanol leva ao aumento de perdas de matéria seca devido à produção de CO<sub>2</sub>.

Pesquisas recentes estudam os efeitos de aditivos químicos e bacterianos sobre a população de leveduras, visando dessa forma promover a diminuição da fermentação, e conseqüentemente diminuir o teor de etanol e a perda de matéria seca na silagem de cana-de-açúcar.

O efeito inibidor da amônia sobre a população de leveduras vem estimulando a realização de trabalhos com o uso de uréia como aditivo químico. Em contato com a forragem a uréia é transformada em amônia, que tem promovido aumento na recuperação de carboidratos e de matéria seca das silagens tratadas.

O *Lactobacillus buchneri* é uma bactéria heterolática responsável pela síntese de ácido acético, um agente antifúngico eficiente que promove diminuição na população de leveduras e aumento significativo na estabilidade aeróbia da silagem quando exposta ao ar. Pesquisas em vários países vêm demonstrando a eficácia deste aditivo.

Recentemente o microrganismo *Lactobacillus diolivorans* foi classificado como uma bactéria capaz de sintetizar ácido propiônico e 1-propanol a partir do 1,2-propanodiol



produzido pelo *Lactobacillus buchneri*. O ácido propiônico, assim como ácido acético é forte agente antifúngico eficaz e foi muito utilizado na forma sintética, embora, seu preço ainda seja proibitivo, daí o interesse por uma alternativa de síntese biológica.

O presente trabalho tem como objetivo estudar os efeitos de aditivos químicos, microbianos e suas associações, sobre a dinâmica fermentativa, a composição bromatológica e a estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar.

## **2.2 Desenvolvimento**

### **2.2.1 Revisão bibliográfica**

#### **2.2.1.1 Cana-de-açúcar**

A tradição no cultivo da cana-de-açúcar é uma das características que a tornam elegível para adoção nos sistemas de produção animal. Na década de 40 cerca de 37% das propriedades rurais produtoras de leite utilizavam a cana-de-açúcar como fonte de volumoso (JARDIM, 1949 apud MATTOS, 2003). Atualmente a cultura da cana-de-açúcar está presente em uma área de 5,495 milhões de hectares, o que representa uma produção de 423 milhões de toneladas.

Dentre os aspectos a serem considerados para o uso da planta, deve ser destacada a alta produção por hectare. Schmidt et al. (2004) determinaram índices de produção da variedade IAC 87-3184 em 183,5 t MV/ha, ou 59,3 t MS/ha.

Nussio e Schmidt (2005) ressaltam o baixo custo por tonelada de matéria seca como ponto atrativo no uso da cana-de-açúcar na produção animal. Atualmente o custo por tonelada de matéria seca é de aproximadamente R\$ 200,00, considerando a planta colhida com teor de 30% MS.

Segundo Silva (1993), a manutenção do valor nutritivo por grande período de tempo e a época de maturação coincidindo com a época de escassez de forragem são aspectos vantajosos à utilização da cana-de-açúcar.

Ainda que apresente inúmeras vantagens, a cana-de-açúcar tem limitações do ponto de vista nutricional (SHIMIDT; NUSSIO, 2005) e quanto à operacionalização da colheita diária (JUNQUEIRA, 2006).

A deficiência de proteína encontrada na cana-de-açúcar foi primeiramente relatada por Nicolau Athanassof (1917 apud MATTOS, 2003) quando este observou que o fornecimento exclusivo da planta ao animal como única fonte de alimento poderia acarretar na morte do mesmo, por falta de substâncias azotadas. Boin e Tedeschi (1993) reportaram que além da deficiência de proteína, baixos teores de minerais, principalmente enxofre e fósforo, podem culminar em baixa utilização da energia digerida.

Junqueira (2006) relata a importância da disciplina e os problemas advindos do corte diário da plantação. A necessidade diária de máquinas e pessoal para atender as demandas de confinamentos industriais e grandes rebanhos tornam a prática do corte diário algo complexo e pouco prático. Além dos problemas operacionais envolvendo a colheita diária, esta gera a necessidade de um plantio escalonado, caso contrário, seria impossível utilizar todos os talhões quando a cana-de-açúcar apresentasse seu maior acúmulo de nutrientes. Quando utilizada fora do período de safra, a cana-de-açúcar não apresenta seu maior valor nutritivo, pois ainda contém um baixo teor de sacarose (MATSUOCA; HOFFMANN, 1993). O plantio escalonado também leva a diferentes épocas de tratamentos culturais nos talhões, e disso deriva uma série de novas demandas e cuidados.

Tendo em vista os problemas relacionados ao corte escalonado e à colheita fora de época, associado às possibilidades de queimas de canavial ou excedentes de produção, a ensilagem de cana-de-açúcar e a demanda por informações tornam-se cada vez mais freqüentes.

#### **2.2.1.2 Silagem de cana-de-açúcar**

A cana-de-açúcar vem sendo adotada nos sistemas de produção como uma estratégia de alimentação no período de escassez de pasto. O interesse pela planta é resultado de inúmeras vantagens associadas ao alto potencial de produção de matéria

seca, maior produção de NDT por hectare quando comparado às forragens tradicionais como milho e sorgo, e baixo custo por tonelada de matéria seca.

A escolha pelo uso da planta ensilada e não *in natura*, como tradicionalmente é feito, decorre das inúmeras vantagens operacionais e do aumento da flexibilidade do sistema de produção. O uso da planta na forma ensilada permite o corte em curto espaço de tempo, o aproveitamento da forragem quando esta atinge seu máximo valor nutritivo, o manejo facilitado do canavial, além de permitir o uso da cana em caso de incêndios acidentais ou excedentes de produção (PEDROSO, 2003).

Os elevados teores de etanol presentes em silagens de cana-de-açúcar sem aditivos e as perdas decorrentes do processo de fermentação alcoólica são o foco de inúmeras pesquisas (CASALI et al., 2004; FREITAS et al., 2004; SIQUEIRA et al 2004; SCHMIDT et al., 2005; KUNG JR; STANLEY.,1982).

Pedroso et al. (2005) estudando a dinâmica da fermentação e da microflora epifítica em silagem de cana-de-açúcar, caracterizaram esta silagem por apresentar intensa atividade de leveduras, alto teor de álcool e grandes perdas de matéria seca. Os autores constataram o desaparecimento de aproximadamente 71% dos carboidratos solúveis, em contrapartida o teor de etanol atingiu valores de 6,4% na matéria seca. Após 45 dias de ensilagem as perdas gasosas e de matéria seca estabilizaram em 16% e 29% da matéria seca, respectivamente.

Alli e Baker (1982) estudando a fermentação em silagem de cana-de-açúcar em silos experimentais verificaram a diminuição em 10% dos carboidratos solúveis, o aumento do teor de etanol atingindo 9% na matéria seca e aumento em mais de 44% de FDA.

Schmidt et al. (2004) trabalhando com ensilagem de cana-de-açúcar em silos laboratoriais de 20 L, providos de válvula para escape de gases, quantificaram perdas de matéria seca em silagens não aditivadas da ordem de 36,5% da matéria seca.

Junqueira (2006) estudando o efeito de aditivos químicos e bacteriano sobre as perdas na conservação da silagem de cana-de-açúcar verificou o aumento de perdas gasosas em silagens não aditivadas em comparação com silagens com 2% de uréia MV e *L. buchneri* (22,19% MS vs 14,50% MS e 14,97% MS). A recuperação de matéria seca da silagem controle foi de 77,26% enquanto os tratamentos com 2% de uréia e *L.*

*buchneri* apresentaram recuperação de 84,87% e 82,47%, respectivamente. Ambos os tratamentos foram capazes de diminuir o teor de etanol na silagem em relação ao tratamento controle (2,59% MS e 2,96% MS vs 5,75% MS).

A susceptibilidade da cana-de-açúcar à ação de leveduras e a conseqüente fermentação alcoólica foram reportadas por Alli e Baker (1982). Os autores avaliaram o aumento do teor de etanol em função dos dias de ensilagem do material e verificaram que após 21 dias de ensilado a silagem controle apresentava teor de etanol de 11,6% MS enquanto o material tratado com amônia apresentou teor de apenas 2,56%.

### **2.2.1.3 Fermentação alcoólica e a qualidade da silagem**

Os açúcares de reserva, principalmente sacarose, e a fração fibrosa são os principais carboidratos constituintes da cana-de-açúcar, sendo que os primeiros têm alta digestibilidade e necessitam de uma fonte protéica de alta solubilidade para que sejam aproveitados no rúmen. A fração fibrosa tem baixa digestibilidade (< 40%) e é o principal agente limitante de consumo. O uso da cana-de-açúcar na forma de silagem permite a colheita do material quando este atinge a maturidade fisiológica, ou seja, quando existe maior concentração de conteúdo intracelular altamente digestível e redução relativa da porção fibrosa menos digestível.

Alli et al. (1983) comprovaram o grande acúmulo de carboidratos solúveis existentes na cana-de-açúcar, apresentando teores próximos de 34% no momento da colheita. Os autores observaram que a mesma forragem, ao ser ensilada, apresentava teores residuais de carboidratos solúveis de 1,27% da MS e teores de etanol da ordem de 8,7% da MS. A redução dos teores de carboidrato foi acompanhada pelo aumento da fração fibrosa, representada por um aumento em 24% no teor de FDA da silagem após 55 dias de fermentação.

Avaliando o comportamento de animais recebendo silagem de cana-de-açúcar Schmidt et al. (2004) concluíram haver rejeição do alimento, principalmente logo após o fornecimento da forragem no cocho, justificando então o efeito negativo do etanol sobre o consumo.

#### **2.2.1.4 Valor energético do etanol**

A fermentação alcoólica é um processo indesejável, tanto pelo aumento nas perdas de matéria seca, quanto pela posterior rejeição do animal, contudo deve-se levar em consideração que o etanol contido na silagem faz parte de seus constituintes energéticos (NUSSIO; SCHMIDT, 2005).

Durix et al. (1991) avaliaram o efeito da infusão de etanol marcado com C<sup>14</sup> em um simulador ruminal. Os autores observaram um aumento de 40% na produção de ácidos graxos voláteis, contudo pequena parte realmente vinda do etanol. Avaliações na fase gasosa mostraram que o CO<sub>2</sub> e o CH<sub>4</sub> não continham carbono marcado, isso confirma que a maior parte do etanol é absorvida na parede ruminal.

#### **2.2.1.5 Bioquímica da fermentação**

Fermentação é um termo genérico para degradação anaeróbica de glicose ou nutrientes orgânicos para obtenção de energia.

Leveduras e outros microrganismos fermentam preferencialmente glicose a CO<sub>2</sub> e etanol, ao invés de fermentar outras substâncias como lactato. A capacidade de transformar piruvato vindo da glicólise em etanol e CO<sub>2</sub> ocorre em duas reações principais: o piruvato é transformado em acetaldeído por uma descarboxilação simples catalisada pela piruvato descarboxilase. Na segunda reação o acetaldeído é reduzido a etanol pela ação da álcool desidrogenase na presença de NADH+H<sup>+</sup>.

Algumas leveduras são conhecidas por utilizar pentoses (D-xylose, D-ribose), polissacarídeos (amido) e ácidos orgânicos (lático, acético, cítrico). Leveduras capazes de utilizar outras fontes que não somente glicose parecem estar mais aptas a sobreviver em pH mais baixos, isso porque essas fontes constituem um aporte adicional de energia (McDONALD, 1991).

Sob condições de aerobiose as leveduras podem apresentar a capacidade de utilizar ácidos orgânicos como lactato, succinato, citrato dentre outros. Moon (1983) avaliando a inibição do crescimento de bactérias ácido tolerantes pela ação do acetato, lactato, propionato e suas combinações constatou que algumas linhagens de

*Saccharomyces sp*, *Geotrichum sp*, *Endomycopsis sp* e *Hansenula sp* podem utilizar acetato e lactato para o seu desenvolvimento em condições aeróbicas.

A habilidade de degradar ácidos orgânicos, em aerobiose, reduz o agente antifúngico no meio e promove um ambiente favorável a ação de bactérias e fungos (MCDONALD, 1991). O consumo e deterioração do substrato remanescente pelos microrganismos oportunistas durante a pós-abertura do silo é um processo conhecido como quebra da estabilidade aeróbia. A estabilidade é mensurada pelo tempo necessário para haver uma significativa variação da temperatura da massa em relação a temperatura do ambiente.

Ranjit e Kung Jr (2000) trabalhando com silagem de milho aditivadas com duas cepas de bactérias homofermentativas produtoras de ácido láctico (*L. plantarum* 30114 e *L. platarum* 30115) demonstraram haver um pequeno aumento da estabilidade aeróbia da forragem (6,4h) em relação ao tratamento controle.

Pedroso (2003) avaliou o efeito de aditivos químicos, bacterianos e suas associações sobre a estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar. Os resultados demonstraram existir uma diminuição de estabilidade de 65h da silagem não aditivada, para somente 45h quando aditivada com *L. plantarum*, contudo o autor verificou que o tratamento contendo *L. plantarum* mais uréia na concentração de 1% da MV obteve a maior estabilidade aeróbia, representada por 79h sem variações de temperatura acima de 2 °C em relação a temperatura ambiente.

Muck e Kung Jr. (1997) avaliaram inúmeros trabalhos que utilizaram preferencialmente bactérias ácido lácticas homofermentativas e verificaram existir inconsistência da ação do aditivo quanto à melhora de estabilidade aeróbia. Ribeiro et al. (2005) ressaltam que os poucos avanços obtidos com a utilização de bactérias exclusivamente produtoras de ácido láctico decorrem do fato de que este ácido não se mantém no meio quando ocorre contato da silagem com o oxigênio.

Segundo Ribeiro et al (2005) os problemas observados com a utilização de bactérias homofermentativas estimularam o interesse pelo desenvolvimento de novos aditivos.

## 2.2.1.6 Aditivos

### 2.2.1.6.1 Uréia

De acordo com Pedroso (2003) os trabalhos com aditivos químicos visando o controle do desenvolvimento de leveduras em silagem foram baseados nos resultados promissores na década de setenta com silagem de milho tratada com amônia (NH<sub>3</sub>).

Alli et al. (1983) obtiveram resultados importantes para confirmação dos benefícios envolvendo o uso da amônia como aditivo para confecção de silagem de cana-de-açúcar. Trabalhando com dose de 4,5kg NH<sub>3</sub>/t em silos laboratoriais os autores verificaram a diminuição inicial de fungos e leveduras, redução de 47,9% na perda de MS e de 46,4% na perda de carboidratos solúveis, ainda constataram uma diminuição na porcentagem de FDA e aumento no teor de ácido láctico na silagem.

A possibilidade de obtenção da amônia através da uréia impulsionou as pesquisas com o uso desse aditivo. Segundo Nussio e Schmidt (2005) inúmeros trabalhos vêm sendo realizados para avaliar o efeito da uréia como aditivo em silagem de cana-de-açúcar (PEDROSO, 2003; SCHMIDT et al., 2004; SIQUEIRA et al., 2004). Os autores verificaram resultados interessantes quando as doses de uréia estavam entre 0,5% e 1% da MV.

Sousa et al. (2005) avaliaram os parâmetros fermentativos de silagem de cana-de-açúcar com aditivos químicos e bacterianos, incluindo uréia na concentração de 1% MV. Os resultados mostraram que os aditivos alteraram a cinética das perdas durante os tempos de estocagem, sendo que a silagem tratada com uréia apresentou em relação ao controle menor perda por gases (28,01% contra 32,5%) e maior recuperação de matéria seca (74,24 contra 64,71%).

Pedroso (2003) avaliou o efeito de aditivos químicos na estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar. Os aditivos utilizados continham diferentes concentrações de hidróxido de sódio e uréia (0,5, 1,0 e 1,5%) da MV. Os resultados mostraram que a menor concentração de uréia levou a uma redução na estabilidade aeróbia em 25% quando comparada ao controle (48h vs 65h), a maior concentração resultou em acréscimo de 22% na estabilidade (79h vs 65h). Segundo o autor esses dados

evidenciam o aumento do poder inibidor do desenvolvimento de leveduras, com o aumento da dose de uréia.

Roth et al. (2005) trabalhando com diferentes concentrações de uréia (0,5; 1,0 e 2,0% na MV) constataram que o aumento de 1% de uréia representa uma elevação de 9,7 unidades percentuais no teor de proteína bruta. Utilizando equações matemáticas os autores verificaram que a maior digestibilidade estava associada à adição de 1,37% de uréia, e que o efeito do aditivo sobre a menor recuperação de hemicelulose, ocorreu com a adição de 1,3% de uréia na MV.

Junqueira (2006) trabalhando com novilhas recebendo silagens de cana-de-açúcar aditivadas com diferentes concentrações de uréia (1,0, 1,5 e 2,0% na MV) e *L. buchneri*, não observou diferença entre os tratamentos quanto ao consumo de matéria seca (kg/d), a conversão alimentar (kg MS/kg GPD) ou taxa de ganho diário de peso vivo. O consumo de matéria seca variou de 7,73 kg no tratamento com uréia (1,5% MV) até 8,76 kg no tratamento com *L. buchneri*. A conversão alimentar variou de 8,15 para o tratamento uréia 1,0% MV até 9,17 para o tratamento contendo *L. buchneri*. A taxa de ganho de peso variou de 0,98 kg para o tratamento uréia 1,0% até 1,05 kg para o tratamento contendo o *L. buchneri*.

#### **2.2.1.6.2 *Lactobacillus buchneri***

Segundo Ribeiro et al. (2005) a inabilidade de bactérias ácido lácticas homofermentativas em promover estabilidade aeróbia despertou o interesse da pesquisa pelo uso de bactérias heteroláticas capazes de produzir ácidos com efeito antifúngico e ao mesmo tempo estáveis em meio aeróbio. O *L. buchneri* se tornou uma opção como aditivo, pois além de produzir ácido acético, que é comprovadamente um agente antifúngico (DANNER, 2002), não produz etanol, graças à ausência da enzima acetaldéido desidrogenase. A incapacidade de síntese de etanol pelo *L. buchneri* é extremamente desejável, já que muitas bactérias heteroláticas produzem álcool quando fermentam glicose e frutose até gliceraldeído 3 fosfato e acetilfosfato pela via 6-fosfogluconato.



Oude Elferink et al. (2001) demonstraram a habilidade do *L. buchneri* em transformar ácido láctico em 1,2-propanodiol e ácido acético. Segundo Siqueira et al. (2005) é importante lembrar que a redução de ácido láctico representa uma diminuição do substrato potencialmente fermentescível por determinadas cepas de leveduras.

Inúmeros trabalhos comprovaram os bons resultados obtidos com *L. buchneri* antes dessa bactéria ser estudada como aditivo em silagens de cana-de-açúcar (NISHIRO et al., 2003, ADESOGAN et al., 2003, DRIEHUIS et al., 1999, WEINBERG et al., 2002).

Ranjit e Kung Jr (2000) avaliaram os efeitos de inoculantes microbianos, homoláticos e heteroláticos, e ácido propiônico sobre a fermentação e a estabilidade aeróbia de silagens de milho. Os autores concluíram que a adição de  $1 \times 10^6$  ufc/g de forragem representou em aumento de estabilidade acima de 873,5 horas em relação ao tratamento controle. O mesmo tratamento apresentou maior teor de carboidratos residuais, maior concentração dos ácidos acético e láctico, e pH similar ao do tratamento com ácido propiônico depois de 3 dias de exposição da silagem ao ar.

Kung Jr et al. (2003) estudando o efeito do *L. buchneri* na produção de leite de vacas alimentadas com silagem de alfafa observaram que os animais recebendo silagem tratada com a bactéria produziram mais leite do que os animais que receberam silagem sem aditivos, 40,7 kg/d e 39,9 kg/d respectivamente.

Segundo Siqueira et al. (2005) a retomada das pesquisas com silagem de cana-de-açúcar nos anos 2000 baseia-se em uma maior preocupação com o manejo pós-abertura do silo. Dentro deste contexto, aditivos como *L. buchneri* tomam papel importante e cada vez mais freqüente nas pesquisas nacionais (NUSSIO; SCHMIDT, 2004).

O valor nutritivo de silagem de cana-de-açúcar inoculada com *L. buchneri* foi avaliado por Siqueira et al. (2005). Os autores concluíram haver maior teor de carboidratos não fibrosos e maior digestibilidade da matéria seca em silagens aditivadas com *L. buchneri* em comparação as silagens tratadas com a associação de bactérias ("*P.acidipropionici*" + "*L.plantarum*"), uréia ou benzoato de sódio.

Pedroso (2003) avaliando o efeito de aditivos bacterianos, como *L. pantarum* e *L. buchneri*, e químicos, benzoato de sódio, sorbato de potássio e uréia, concluiu que o *L.*

*buchneri* é um dos mais promissores aditivos, pois diminuiu a produção de etanol na silagem e aumentou a estabilidade aeróbia. A silagem aditivada com a bactéria demorou 78 horas para perder a estabilidade, o que corresponde a um aumento de 63% em relação à silagem controle, não aditivada. O teor de etanol encontrado na silagem com *L. buchneri* foi de 1,9% da MS enquanto na silagem controle esse teor chegou a 4,05 % da MS.

Toledo Filho et al. (2004) concluíram que o uso de *L. buchneri* foi capaz de aumentar a estabilidade aeróbia de rações, ainda que esse aumento não tenha sido verificado na silagem exclusivamente. A ração contendo silagem de cana-de-açúcar sem aditivo e concentrado, apresentou estabilidade aeróbia de 1 dia, enquanto a ração contendo a silagem aditivada com a bactéria ( $5 \times 10^4$  ufc/g) apresentou estabilidade 4 vezes maior.

Pedroso (2003) avaliando o desempenho de novilhas recebendo silagem de cana-de-açúcar queimada observou um aumento nos índices de desempenho dos animais quando estes recebiam silagem tratada com *L. buchneri*. A melhor conversão alimentar apresentada pelos animais recebendo a silagem aditivada (7,73 kg MS/kg GPD) em comparação com os animais recebendo a silagem controle (9,37 kg MS/kg GPD) é resultado de um consumo similar, associados a um ganho de peso diário 32% maior para os animais comendo a silagem preservada com a bactéria.

#### **2.2.1.6.3 *Lactobacillus diolivorans***

Tendo em vista a melhoria da estabilidade aeróbia em silagem de milho Driehuis et al. (1999) realizaram 4 experimentos trabalhando com diferentes doses de *L. buchneri*. Os resultados obtidos mostraram claramente que o aumento da concentração do inoculante era acompanhado por um aumento de estabilidade muito aquém do esperado. As análises químicas indicaram uma diminuição do ácido lático que era convertido em ácido acético e teoricamente 1,2-propanodiol, contudo, esse se mostrou em concentrações cada vez mais baixas em função do aumento nas doses de *L. buchneri*. De alguma maneira, assim como mencionado por Driehuis, o aditivo ou outro

microrganismo estava convertendo o 1,2-propanodiol, sintetizado pelo *L. buchneri*, em 1-propanol mais ácido propiônico.

O ácido propiônico em combinação com o ácido acético apresenta um efeito sinérgico capaz de explicar os valores elevados de estabilidade e conseqüente longevidade da silagem (MOON, 1983). A obtenção de ácido propiônico há muito vem sendo procurada pelos pesquisadores, contudo sem muito êxito. Kung Jr e Ranjit (2001) trabalhando com *Propionum bacterium* (bactérias produtoras de ácido propiônico) concluíram que essas bactérias não eram capazes de competir com a população epifítica e se manter no meio, ou seja, não aumentavam a concentração do ácido de maneira consistente.

Trabalhando nos dados obtidos por Driehuis et al (1999), Krooneman et al (2002) repetiram as mesmas condições para confeccionar uma nova silagem. Utilizando-se de avançadas técnicas de biotecnologia, aliadas a convencionais análises microbiológicas, como meio de cultura contendo somente o substrato específico (neste caso o 1,2-propanodiol), os pesquisadores isolaram, classificaram e descobriram uma nova cepa de lactobacilos à qual deram o nome de *L. diolivorans*, capaz de produzir ácido propiônico segundo a equação:



#### **2.2.1.6.4 Associações de microrganismos**

Ribeiro et al. (2005) reportaram a importância da associação entre inoculantes para elaboração de aditivos. Segundo os autores o aumento no interesse envolvendo grupos distintos de microorganismos pauta-se na melhoria dos processos fermentativos, papel desempenhado pelas bactérias homofermentativas, e no aumento da estabilidade aeróbia verificada pelo incremento de ácidos produzidos por bactérias heterofermentativas.

Filya (2003) combinando *L. buchneri* com bactérias ácido lácticas homofermentativas constatou que houve um aumento significativo de ácido acético em silagens contendo *L. buchneri* e *L. buchneri* associado com *L. plantarum* quando comparadas às silagens controle, não aditivadas, e inoculadas exclusivamente com *L.*

*plantarum*. A combinação entre os diferentes tipos de bactérias propiciou a diminuição do pH, do nitrogênio amoniacal e das perdas fermentativas.

Filya et al. (2004) observaram melhoras na estabilidade aeróbia e redução na produção de CO<sub>2</sub> quando associaram bactérias homofermentativas (*L. plantarum*) com bactérias heterofermentativas produtoras de ácido acético e propiônico (*P. acidipropionici*).

As melhorias em estabilidade aeróbia e a diminuição da população de leveduras observadas por Driehuis et al. (1999) são atribuídas ao aumento na concentração dos ácidos propiônico e acético, que apresentam efeito antifúngico e sinérgico (MOON, 1983), além do 1-propanol (DANNER et al, 2002). O fato do *L. buchneri* não ser capaz de transformar o 1,2-propanodiol, resultante de sua ação sobre o ácido láctico, em ácido propiônico e 1-propanol indica a coexistência de *L. buchneri* e outro microrganismo na silagem de milho em questão. A confirmação da presença do segundo microrganismo só foi possível quando Krooneman et al. (2002) isolou da silagem uma bactéria capaz de utilizar 1,2-propanodiol como substrato, o então descoberto *L. diolivorans*.

#### **2.2.1.6.5 1,2-propanodiol**

As suspeitas de que o 1,2-propanodiol fosse uma substância co-participante no aumento da estabilidade aeróbia de silagens aditivadas com *L. buchneri* foram descartadas por Danner et al. (2002). Os autores não verificaram aumento na estabilidade aeróbia de silagens de milho tratadas com 1,2-propanodiol sintético. A média de estabilidade conferida a silagem com 1,2-propanodiol (36,33h) foi menor do que as médias dos demais tratamento estudados, inclusive menor do que o tratamento com 1-propanol (75,75h).

Nishiro et al. (2003) mencionam que o 1,2-propanodiol parece não apresentar efeito sobre a estabilidade aeróbia na silagem, contudo a possibilidade de serem obtidos ácido propiônico e 1-propanol a partir deste composto pode justificar seu uso.

A utilização de 1,2-propanodiol no tratamento de cetose é uma prática veterinária já estabelecida (HAMADA et al., 1984). Quando consumido pelo ruminante, uma grande porção é absorvida pela parede do rúmen e participa do metabolismo do carboidrato

(CLAPPERTON; CZERKAWSKI, 1972). Assim como é sugerido em silagens, no rúmen a porção a ser degradada pelos microrganismos gera aumento de ácido propiônico e 1-propanol (CZERKAWSKI; BRECKENRIDGE 1973).

### **2.2.1.7 Ação antifúngica dos ácidos**

O início da utilização de ácidos fracos para promover a inibição de fungos e leveduras é uma tradição secular. Mesmo tendo diferentes estruturas, os ácidos dividem um modo de ação em comum, todos têm seu efeito antifúngico potencializado em pH mais baixo. Em soluções aquosas, concentrações equimolares dos ácidos e suas formas dissociadas estabelecem o ponto de equilíbrio, chamado de pKa. Um pH abaixo do valor pKa significa um aumento nas concentrações das formas não dissociadas dos ácidos.

A ação antifúngica dos ácidos está associada ao caráter lipofílico de suas moléculas quando na forma não dissociada, o que confere a estes a capacidade de atravessar a membrana plasmática. Dentro da célula, com pH citoplasmático perto da neutralidade, ocorre a liberação de cátions e ânions promovido pela dissociação dos ácidos. Íons carregados não podem atravessar a membrana plasmática o que provoca a diminuição de pH e acúmulo de ânions. A acidificação do citoplasma pode reduzir o crescimento celular pela inibição da glicólise, prevenção do transporte ativo e interferência na transdução de sinais. A resposta da célula à acidificação do meio intracelular vem com o acionamento do transporte ativo dos íons para o meio externo. Tal situação é possível graças ao uso da H<sup>+</sup>-ATPase localizada na membrana plasmática. A eficiência desse processo realizado pela célula é questionável, já que os íons em meio extracelular com pH abaixo pKa podem retomar a forma de ácidos não dissociados e assim ter acesso ao meio intracelular novamente (LAMBERT; STRATFORD, 1999) (figura 1).

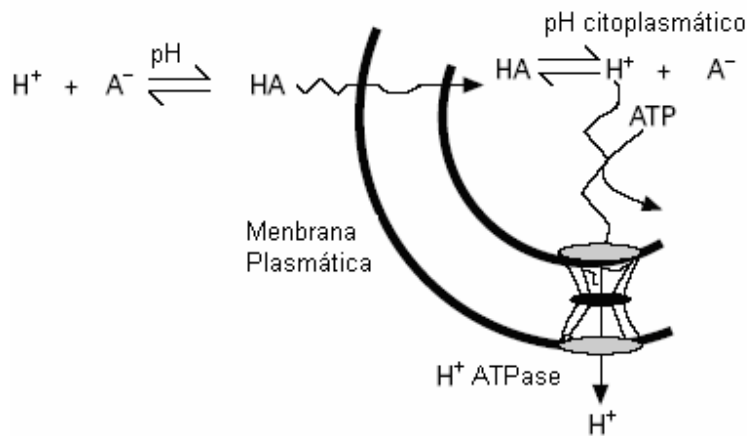


Figura 1 – Meio extracelular e equilíbrio citoplasmático entre ácidos fracos e ânions. Somente moléculas não carregadas (HA) de ácidos fracos podem passar livremente através da membrana plasmática. Ânions carregados ( $A^-$ ) e prótons ( $H^+$ ) são retidos na célula, os prótons citoplasmáticos são expelidos pela  $H^+ ATPase$  ligada à membrana. Adaptado de: Lambert e Stratford (1999)

## 2.2.2 Material e métodos

### 2.2.2.1 Local do experimento

O experimento foi realizado no Departamento de Zootecnia da USP/ESALQ, em Piracicaba-SP, com início em 15 de dezembro de 2005.

### 2.2.2.2 Silos laboratoriais e confecção da silagem

As silagens foram confeccionadas com cana-de-açúcar da variedade RB72-454, colhida manualmente com 12 meses de crescimento. Uma picadora estacionária foi regulada para corte de tamanho de partículas entre 0,5 e 1cm. Após a ensilagem os silos laboratoriais foram mantidos em local coberto, sob temperatura ambiente.

Foram usados 64 baldes plásticos (silos laboratoriais) de 20 litros de capacidade, contendo 2 kg de areia, sendo estes separados da forragem por uma tela de plástico e um pano. A função da areia é absorver o efluente produzido. O enchimento dos silos foi

realizado de forma a se obter baldes com densidade de  $550 \text{ kg/m}^3$ , garantindo dessa forma, condições semelhantes aos diferentes tratamentos. Na tampa de cada balde foi adaptada uma válvula, do tipo Bulsen, para permitir o escape dos gases formados durante a fermentação. Esse sistema permite a quantificação da perda por gases, enquanto o sistema de drenagem montado no interior do balde permite a mensuração das perdas por efluente. Os 64 baldes foram abertos em dois períodos, sendo 32 deles abertos aos 80 dias após a ensilagem e o restante após 140 dias.

### 2.2.2.3 Tratamentos

Os tratamentos adotados foram os seguintes:

- 1- Controle (água)
- 2- *L. buchneri*  $5 \times 10^4$  ufc/g
- 3- *L. diolivorans*  $1 \times 10^5$  ufc/g
- 4- *L. diolivorans*  $1 \times 10^6$  ufc/g
- 5- *L. buchneri*  $5 \times 10^4$  ufc/g + *L. diolivorans*  $1 \times 10^6$  ufc/g
- 6- Uréia 1% MV
- 7- 1,2- Propanodiol 1% MS
- 8- 1,2- Propanodiol (1% MS) + *L. diolivorans*  $1 \times 10^6$  ufc/g

### 2.2.2.4 Aplicação dos aditivos

Montes de 140 kg de cana-de-açúcar fresca picada receberam suas respectivas doses de tratamento. Todos aditivos foram diluídos em água destilada, mesmo a forragem referente ao tratamento controle recebeu o mesmo volume de água aplicado aos demais tratamentos (4,2 L/t). Após aplicação dos aditivos com apoio de pulverizadores manuais, o material foi revolvido inúmeras vezes para se atingir o máximo de homogeneidade possível da massa de forragem.

Os tratamentos com o *L. buchneri* receberam a concentração de bactérias recomendada pelo fabricante do produto (Lallemand). O produto utilizado foi o Lalsilcana®, constituído pela cepa *L. buchneri* 40788. De acordo com as especificações

do produto, 2 g diluídos em água é o suficiente para garantir a inoculação de  $5 \times 10^4$  ufc/g em uma tonelada de forragem.

Os tratamentos contendo *L. diolivorans* foram obtidos de fonte de inóculo não comerciais (Lallemand, França). Para a confecção do tratamento *L. diolivorans*  $1 \times 10^5$  ufc/g, foram necessários 3,65g desse inóculo. Todos os tratamentos contendo *L. diolivorans*  $1 \times 10^6$  ufc/g receberam 36,5g do produto.

Assim como os outros tratamentos a uréia também foi diluída antes da aplicação para atingir a concentração de 1% com base na massa verde, resultando no uso de 1,4 kg para os 140 kg de cana-de-açúcar tratados.

O componente 1,2-propanodiol foi aplicado com base no teor de matéria seca da forragem, visando atingir a concentração de 1%.

#### **2.2.2.5 Enchimento dos silos**

Para se manter as mesmas condições aos diferentes tratamentos é fundamental que as densidades entre os baldes sejam as mais próximas possíveis. O cálculo para estabelecer o peso total da forragem foi determinado tendo como objetivo atingir a densidade de  $550 \text{ kg/m}^3$ . Dentro deste contexto, camadas sucessivas com 10 cm de espessura foram compactadas com os pés até o peso final do balde atingir aproximadamente 12 kg de forragem.

Como prevenção a contaminação dos tratamentos com aditivos previamente aplicados, algumas medidas foram adotadas, tais como: Uso de botas plásticas descartáveis, desinfecção dos instrumentos com fogo e álcool 70% além da troca de lonas plásticas e pulverizadores entre cada tratamento.

Durante o enchimento dos silos amostras foram retiradas para determinação do teor de matéria seca da forragem e para elaboração de extrato aquoso (KUNG JR, 2000).



### 2.2.2.6 Avaliação de perdas

Os silos laboratoriais foram abertos aos 80 e 140 dias após a ensilagem. Os oito tratamentos, contendo 4 baldes cada, foram avaliados quanto as perdas de matéria seca total, perdas gasosas e perdas por efluente. O peso dos baldes e de seus componentes individuais foram medidos previamente, desta forma possibilitando os cálculos de perdas.

Na abertura foram anotados os pesos dos baldes com e sem a forragem. O conjunto (silo laboratorial) sem a forragem é constituído pela tampa, o próprio balde e o sistema de drenagem com o pano, a tela e areia. A diferença de peso entre o conjunto vazio antes do enchimento, e a medida do mesmo conjunto vazio após a abertura, permite estimar o calculo de perdas por efluente.

A perda gasosa pode ser quantificada pela diferença entre a quantidade de matéria seca da forragem no fechamento do silo, e a quantidade de matéria seca existente no balde na época da abertura.

As perdas totais de matéria seca resultam da diferença entre a quantidade de matéria seca da forragem ensilada no fechamento do silo, e a quantidade de matéria seca na forragem recuperada, descontando-se desta a perda por efluente. De uma maneira simplificada, pode ser equacionar a perda total de MS como a soma das perdas por gás e efluente.

### 2.2.2.7 Equações para estimar perdas

Perda gasosa (%MS), eq. (1).

$$PG = \left\{ \frac{(MSis - MSfs)}{MSis} \right\} \times 100 \quad (1)$$

em que:

*PG*= perda gasosa;

*MSis*= Matéria seca inicial descontada a tara seca= (Peso do balde após enchimento – peso do conjunto vazio (sem a forragem) antes do enchimento) x teor de MS da forragem no fechamento;

$MSfs$ = Matéria seca final descontada a tara seca= (Peso do balde cheio antes da abertura - peso do conjunto vazio (sem a forragem) antes do enchimento) x teor de MS da forragem na abertura.

Perda por efluente (kg/t), eq (2).

$$PE = \frac{Pef \times 1000}{MVi} \quad (2)$$

em que:

$PE$ = perda por efluente;

$Pef$ = peso de efluente= (Peso do conjunto vazio antes da abertura – peso do conjunto vazio antes do enchimento);

$MVi$ = quantidade de massa verde da forragem ensilada.

Perda total de matéria seca (%MS), eq. (3)

$$PMS = \left\{ \frac{(MSis - MSfu)}{MSis} \right\} \times 100 \quad (3)$$

em que:

$PMS$ = perda total de matéria seca;

$MSis$ =Matéria seca inicial descontada a tara seca= (Peso final do balde após enchimento – peso do conjunto vazio (sem a forragem) antes do enchimento) x teor de MS da forragem no fechamento;

$MSfu$ = Matéria seca final descontada a tara úmida= (Peso do balde cheio antes da abertura - peso do conjunto vazio (sem a forragem) na abertura) x teor de MS da forragem na abertura.

#### 2.2.2.8 Ensaio de estabilidade aeróbia

O ensaio de estabilidade aeróbia foi realizado em uma sala equipada com sistema de controle de temperatura permitindo variação de meio grau em relação a temperatura média de 24°C.

Amostras de 4 kg de silagens, vindas dos silos laboratoriais, foram acomodadas em baldes plásticos abertos, sem que houvesse compactação da massa. Um sensor de temperatura “datalogger”, instalado no centro geométrico de cada balde, foi calibrado para aferir a temperatura a cada duas horas. Com o auxílio de um programa computacional (Dickson®, Addison, USA) os dados foram recuperados ao final da avaliação.

Pesagens diárias e amostragem aos 5 e 10 dias de avaliação foram realizadas com o intuito de se obter dados de perda de matéria seca decorrentes da exposição da silagem em aerobiose.

A estabilidade foi avaliada quanto ao tempo necessário para se atingir a variação de 2°C das silagens em relação à temperatura ambiente (expressa em hora) (KUNG, JR 2000). Ainda em relação a estabilidade, foi calculado o acúmulo aos 5 e 10 dias (ADITE-5 e ADITE-10), da diferença média diária entre a temperatura das silagens expostas ao ar e a temperatura ambiente (expressa em °C).

#### **2.2.2.9 Avaliação químico-bromatológica**

As amostras de cana-de-açúcar *in natura* e silagens foram secas em estufa a 60°C por 72h (SILVA, 1981) e moídas contra peneira de malha de 1mm em moinho do tipo Wiley. As amostras processadas serviram de material para as análises bromatológicas convencionais realizadas no laboratório de bromatologia do departamento de zootecnia da USP/ESALQ.

O teor proteína foi determinado por condutividade térmica, utilizando-se o equipamento LECO® (Leco Corporation, Michigan, USA).

A porção fibrosa foi analisada quanto ao teor de fibra em detergente neutro (FDN) e teor fibra em detergente ácido (FDA) (VAN SOEST et al., 1994).

A matéria seca laboratorial foi determinada em estufa a 105 °C durante 24h (AOAC, 1990). A desidratação mais intensa permite a retirada de água residual da amostra pré-processada em estufa de 60°C (AOAC, 1990).

A matéria mineral foi obtida após incineração de amostras em forno a 550 °C durante 3h (HARRIS, 1970).

As amostras úmidas coletadas durante a abertura e fechamento dos silos foram utilizadas para elaboração de extrato aquoso segundo Kung Jr. (1996). Resumidamente, 25g de amostra foram processados em 225ml de água durante 1 minuto. O valor de pH do extrato de silagem foi medido em potenciômetro digital (DIGMED<sup>®</sup>-DM20). Após filtração em papel Whatman<sup>®</sup> 54, o material recebeu 3 gotas de ácido sulfúrico 50% e foi então centrifugado durante 15 minutos a 10.000 rpm. O extrato que foi armazenado em tubos eppendorff de 1,5 ml, e mantido congelado a -20 °C serviu como amostra nas análises de etanol, carboidratos solúveis e ácidos graxos.

O teor de etanol foi medido usando-se um analisador bioquímico YSI 2700 Select<sup>®</sup> (Biochemistry Analyser, Yellow,OH,EUA) provido de membrana com enzimas imobilizadas, apropriada para essa determinação. Após calibrado com soluções padronizadas de etanol (2 g/L), o aparelho forneceu leitura direta de concentração em g/L.

O teor de carboidratos solúveis foi mensurado com base na adaptação do método colorimétrico (490 nm) sugerido por Dubois, et al, (1956). A adaptação foi realizada em relação a um aumento na diluição das amostras, já que silagens de cana-de-açúcar normalmente apresentam teor carboidratos mais elevado.

O teor de ácido lático foi avaliado por meio de uma adaptação do método espectrofotométrico (565 nm) de Pryce (1969). A adequação da curva padrão 10 vezes maior do que a sugerida foi necessária, já que a alíquota de amostra a ser utilizada foi muito reduzida.

A avaliação microbiológica das amostras foi realizada segundo Kung Jr (1996). A mesma solução que deu origem ao extrato para as análises de colorimetria, foi usada como fonte de inóculo em meio de cultura (Oxoid) específico para bactérias ácido lácticas, leveduras e fungos. Os valores obtidos da contagem das placas de Petri representam as unidades formadoras de colônias existentes na amostra após 48h em incubadora com temperatura fixa de 32°C.

Tabela 1 - Composição bromatológica da cana-de-açúcar *in natura* utilizada para confecção das silagens

Variáveis	% da MS
MS (%)	30,00
MM (% MS)	1,66
PB (% MS)	2,60
FDN (% MS)	52,97
Carboidrato solúvel (% MS)	22,71

#### 2.2.2.10 Análise estatística

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com esquema fatorial 2x8, com quatro repetições em esquema de parcelas subdivididas (split-plot) sendo os fatores das parcelas os oito tratamentos utilizados e o fator atribuído a sub-parcela os dois tempos de abertura. Os dados foram analisados pelo procedimento GLM do SAS®, versão 8 (SAS,1999). O teste dos quadrados mínimos, LSMEANS, foi utilizado para comparar as médias entre os tratamentos, sendo essas consideradas diferentes com nível de significância de 5%.

O comando PROC CORR foi utilizado para estabelecer as correlações existentes entre as variáveis consideradas.

### 2.2.3 Resultados e discussão

#### 2.2.3.1 Avaliação da composição bromatológica

Resultados referentes ao teor de MS das silagens (Tabela 2) revelaram valores comumente encontrados na literatura e diferentes entre si em função do tratamento recebido. A média dos valores observados para o teor de matéria seca foi de 23,12%. Pedroso (2003) trabalhando com o mesmo tipo forragem após 120 dias de ensilagem,

obteve teor de matéria seca de 26,6%, enquanto Freitas et al. (2004) observaram valores bem inferiores 20,49% MS em silagens aditivadas com hidróxido de sódio.

A diferença entre os tratamentos pode ser explicada pelas altas correlações entre o teor de MS e as perdas fermentativas (correlação negativa de 92% para perdas gasosas), Tabela 3. Na tabela 4, nota-se que os tratamentos apresentando *L. diolivorans* acompanhado por alguma fonte de 1,2-propanodiol (sintético ou sintetizada pelo *L.buchneri*) apresentaram as menores perdas por gases e as menores perdas de matéria seca, além de ambos apresentarem os maiores teores de MS, provavelmente pela maior preservação dessa durante a fermentação.

Os teores de matéria mineral variando entre 2,37% a 3,7% MS (Tabela 2) estão abaixo dos valores encontrados na literatura. Kung, Jr. e Stanley (1982) obtiveram valores de 7,37% MS em silagens de cana-de-açúcar colhida com um ano de crescimento vegetativo. Alcântara et al. (1989) obtiveram teores de matéria mineral em silagens de cana-de-açúcar de 4,6% em silagens controle e de 7,03% quando tratadas com NaOH. Pedroso et al. (2005), demonstraram existir um aumento no teor de matéria mineral em função do tempo fermentação da silagem, sendo que este tende a se estabilizar (4,01%) depois dos 15 primeiros dias de estocagem. Segundo os autores as diferenças de concentração de matéria mineral estão mais relacionadas às perdas gasosas resultantes de fermentações. Apesar de alguns valores (Tabela 4) corroborarem com essa tendência, em geral, no presente estudo, não houve correlação significativa. Não foi verificada diferença estatística entre as datas aberturas quanto ao teor de matéria mineral provavelmente porque o material já estava estável aos 80 dias.

Os valores dos teores de proteína estão dispostos na Tabela 2. As diferenças entre os tratamentos observados para os teores de proteína bruta, podem ser justificados pelo aumento do teor de nitrogênio não protéico vindo da adição de uréia em um dos tratamentos. A adição de 1% de uréia na MV elevou o teor de proteína bruta para 15,21%, ou seja, 3,8 vezes maior do que o valor obtido pelo tratamento controle. Os outros tratamentos apresentaram valores esperados (4,9% a 3,51% MS) tendo-se como base os trabalhos já publicados no Brasil e exterior (PEDRSO 2003). Junqueira (2006) obteve valores próximos aos encontrados na Tabela 1. A autora reporta valores de 3,5%, 3,39% e 12,03% MS para os tratamentos controle, *L. buchneri* e uréia 1% MV

respectivamente. Naquele experimento notou-se que a adição de 1% de uréia na MV ocasionou aumento médio no teor de proteína de 8,94%. Roth et al. (2005) trabalhando com silagens de cana-de-açúcar tratadas com diferentes doses de uréia obtiveram teores de proteína bruta de 10,1% MS. Os autores relatam aumentos de 7,55% no teor de proteína para cada 1% de uréia adicionada à massa verde de forragem.

Resultados referentes ao teor de FDN são mostrados na Tabela 2 e são similares aos dados encontrados na literatura (JUNQUEIRA, 2006). Os valores diferem em função do tratamento adotado, sendo que todos os tratamentos contendo *L. diolivorans* com exceção do tratamento *L. diolivorans* 10<sup>6</sup>ufc/g, apresentaram valores abaixo da média (70,2% MS). As diferenças entre os teores de FDN dos tratamentos podem estar relacionadas à síntese de 1-propanol realizada pelo *L. diolivorans* ao degradar 1,2-propanodiol (Krooneman, 2002). O 1-propanol é um conhecido solvente industrial usado para agir sobre as ligações ésteres da celulose. O menor teor de FDN apresentado pelo tratamento com uréia decorre do fato desta ter a capacidade de solubilizar a hemicelulose da fibra (PEDROSO, 2003).

Junqueira (2006) observou um aumento progressivo do teor de FDN de silagens de cana-de-açúcar à medida que o tempo de fermentação se prolongou, resultando na diminuição do teor de carboidratos solúveis transformados em gases e água durante a fermentação. Os tratamentos foram constituídos de diferentes doses de uréia, 1,0, 1,5 e 2,0%MV, sendo o maior teor de FDN (75%) apresentado pela menor dose (1,0% MV).. O fato das maiores concentrações de uréia resultarem em menores valores de FDN vai de acordo com a hipótese de solubilização de frações da fibra pela ação da uréia (Junqueira, 2006).

Lucci et al. (2003) trabalhando com cana-de-açúcar *in natura* e na forma de silagem com diferentes concentrações de uréia 0, 0,5 e 1% MV, observaram diminuição do teor de FDN com a dose de 0,5% MV (71,71% MS) de uréia em relação ao tratamento controle (75,73% MS), contudo tal efeito não foi observado com a dose de 1% MV (74,63% MS).

Aditivos podem alterar o teor de FDN pela manutenção do teor de carboidratos solúveis preservados na massa ensilada já que ambos são representados em porcentagem da MS. A não alteração no teor de FDN da silagem aditivada pode ser

justificada quando os carboidratos não representam uma fração significativa da planta, ou quando não há eficácia do aditivo em preservar os carboidratos. No presente experimento o aditivo contendo *L. buchneri* não modificou o teor de FDN em relação ao tratamento controle (Tabela 2), sendo tal situação recorrente na literatura consultada (KUNG, JR; RANJIT, 2001).

Taylor et al. (2002) investigando o efeito do *L. buchneri* sobre a estabilidade aeróbia, fermentação e valor nutricional de silagens de cevada, constataram valores similares de FDN nas silagens controle e tratadas com *L. buchneri*  $5 \times 10^6$  ufc/g, 62,6% e 65,8% da MS, respectivamente. Os teores de carboidratos solúveis nas silagens controle e aditivada também foram similares, 2,59% da MS e 2,78% da MS.

Adesogan et al. (2003) não verificaram diferença no teor de FDN e de carboidratos solúveis em silagem de grãos processados tratada com *L. buchneri* e não tratada, sendo respectivamente 12,9% da MS e 11,19% da MS os valores de FDN, enquanto 7,18% da MS e 7,54% da MS os valores de carboidratos solúveis.

Como FDN e carboidratos solúveis fazem parte dos constituintes da planta, o aumento de um implica na diminuição percentual do outro. Em silagens nas quais o teor de carboidratos solúveis é muito alto, mesmo que exista uma baixa eficiência do aditivo, isso pode se resultar em uma diminuição no teor de FDN em função de altas recuperações de matéria seca.

Siqueira et al. (2005) constataram baixos valores de FDN em silagens de cana-de-açúcar tratadas com *L. buchneri* em comparação aos valores obtidos na silagem controle, 66,7% MS e 75,1% MS respectivamente. Esses valores podem ser explicados pela maior recuperação (68%) dos carboidratos solúveis na silagem tratada, contra somente 40,8% na silagem controle, sendo que os carboidratos representavam cerca de 36,9% MS da planta ao ser ensilada.

A ação do *L. diolivorans* sobre a fração fibrosa pode ser constatada no trabalho de Toledo Filho et al. (2005). No experimento com o uso de *L. diolivorans* os autores verificaram diminuição no teor de FDN, atribuída primeiramente aos carboidratos preservados pelo tratamento que também apresentou as menores perdas gasosas, contudo diminuição constatada nos teores de hemicelulose e celulose podem ter colaborado para redução das frações fibrosas nas silagens.



Os dados referentes aos teores de fibra em detergente ácido (FDA) estão expostos na Tabela 2. A média dos valores obtidos nos tratamentos foi de 44,08% MS, o que condiz com valores frequentemente encontrados na literatura (ALCÂNTARA, 1989), contudo houve grandes variações (48,85% MS a 39,62% MS) em função do efeito dos diferentes aditivos utilizados.

Os tratamentos que apresentaram o menor teor de FDA também foram os que apresentaram menor de FDN, concomitantemente foram os que apresentaram as menores perdas gasosas e as menores perdas totais.

Alli et al. (1982) observaram aumento no teor de FDA em função do tempo de fermentação do material. Assim como o teor de FDN, a porção menos digestível da fibra, tem sua participação aumentada no percentual total da forragem em função da diminuição do teor de carboidratos solúveis processados pelos microrganismos da silagem. Os autores obtiveram valores de FDA na ordem de 42,3% para silagens de cana-de-açúcar sem aditivos, e curiosamente o tratamento contendo  $\text{NH}_3$  não resultou em teores menores de FDA.

Ao avaliar a composição bromatológica de silagens de cana-de-açúcar após 94 dias de ensilagem, Pedroso (2003) verificou a diminuição dos teores de FDA na silagem tratada com uréia, os baixos teores de carboidratos associados as perdas gasosas levaram o autor a concluir que o efeito da uréia sobre os teores de fibra estavam relacionadas as suas características hidrolíticas. Da mesma forma pode ser verificado no presente experimento, o efeito reduzido deste tratamento sobre as perdas gasosas totais (Tabela 4) o teor de carboidratos solúveis remanescentes na silagem (Tabela 2).

Os dados referentes ao teor de carboidratos solúveis presentes nas silagens estão apresentados na Tabela 2. Houve grande diminuição no teor de carboidratos se comparado as silagem em relação a planta *in natura* antes do momento de fechamento dos silos (Tabela 1). Dos 22,71% MS de carboidratos solúveis restaram em média 4,2% da MS, sendo que houve diferença para este parâmetro em função dos aditivos usados e do tempo de abertura. A análise estatística revelou o teor de carboidratos após 80 dias de ensilagem de 4,76 % da MS, e após 140 dias de 3,64%.

Segundo Pedroso et al. (2005), esse decréscimo acentuado no teor de carboidratos solúveis em função do tempo de ensilagem ocorre de maneira inversa ao

observado para perdas gasosas e produção de etanol. A síntese de etanol pelos microrganismos indesejáveis, principalmente levedura, é feita com base na utilização dos carboidratos, gerando com isso CO<sub>2</sub> responsável pelo aumento nas perdas gasosas e conseqüentemente, pelo aumento em perdas totais de matéria seca. No presente experimento houve alta correlação entre o teor de etanol e as perdas de MS total e gasosa (61,2% e 63,5% respectivamente), conforma tabela 4.

Alli et al. (1983) observaram a diminuição dos teores de carboidratos solúveis de silagens de cana-de-açúcar em função do tempo, sendo que a planta original continha o teor de 34,2% MS, e após 55 dias essa porcentagem decresceu para 1,27%.

Os tratamentos contendo *L. diolivorans* suprido com alguma fonte de 1,2-propanodiol (sintético ou produzido pelo *L. buchneri*) resultaram em maiores valores residuais de carboidratos solúveis.

Pedroso et al. (2005) verificaram que o uso de *L. buchneri* reduziu o teor de carboidratos, mesmo em relação à silagem controle, 5,69% da MS e 9,13%, respectivamente. No presente estudo foi demonstrado (Tabela 2) que embora o *L. buchneri* tenha apresentado rendimento pouco satisfatório, houve preservação de carboidratos solúveis, quando comparado ao tratamento controle, 3,66% MS e 1,79% MS, respectivamente.

A análise de tratamentos dentro dos períodos revelou diferenças na estratégia do uso de carboidratos nas silagens aditivadas com *L. diolivorans* suprido por alguma fonte de 1,2-propanodiol. O tratamento contendo a associação entre as duas bactérias apresentou o teor de carboidratos reduzidos de 7,4% na primeira abertura (80 dias) para 3,43%, concordando com a tendência comumente observada nos experimentos que avaliam a dinâmica da fermentação em função do tempo (PEDROSO et al, 2005). O tratamento contendo *L. diolivorans* mais 1,2-propanodiol não apresentou alterações na concentração de carboidratos entre as aberturas, sendo que o teor observado na primeira abertura 5,97% era semelhante ao teor observado aos 140 dias após a ensilagem. Normalmente esse fenômeno ocorre quando um teor residual de carboidratos solúveis se encontra baixo no início do processo de fermentação (silagem controle após 80 dias apresentou teor de carboidrato residual de 1,82%), quando as populações de microrganismos epífitas estão inibidas pela ação de um inoculante, ou

quando a dificuldade de acesso ao carboidrato residual força a utilização de outras substâncias como substrato. Ou seja, quando se estabelece uma situação de restrição ao fornecimento do substrato preferencial, os carboidratos solúveis, o *L. diolivorans* pode fazer uso de componentes disponíveis no meio, tais como o 1,2-propanodiol (KROONEMAN et al, 2002).

Os teores de etanol das silagens de cana-de-açúcar estão apresentadas na Tabela 2. Os dados são valores condizentes com o que é frequentemente observado na literatura (JUNQUEIRA, 2006). Os resultados obtidos variaram em função dos tratamentos, sendo que os teores mais baixos indicam menor fermentação alcoólica e, conseqüente, menor perda na forma de gases produzidos neste processo (PEDROSO, 2003). Os tratamentos contendo *L. diolivorans* mais alguma fonte 1,2-propanodiol, respectivamente *L. buchneri* mais *L. diolivorans* e 1,2-propanodiol mais *L. diolivorans*, foram os que apresentaram menor teor de etanol, 3,93% e 2,1%, o que resultou em menores perdas gasosas registradas durante a fermentação da silagem 20,62% e 20,36% (Tabela 4).

Ao contrário do obtido por Junqueira (2006) o tratamento com *L. buchneri* não foi diferente do tratamento controle quanto ao teor de etanol no presente estudo. Com o *L. buchneri* a autora obteve o menor teor de etanol (3,46%) em relação a todos os outros tratamentos, sendo que a silagem controle apresentou um teor de 5,75%. A uréia testada na concentração de 1% MV resultou no teor de 3,06% de etanol, sendo significativamente diferente do controle. No atual experimento *L. buchneri* e uréia 1% MV não apresentaram diferença em relação silagem controle (7,91%), sendo respectivamente os valores de 6,45% e 9,04% para os teores de etanol.

Foi observado que o tratamento recebendo exclusivamente o microrganismo *L. diolivorans*  $10^5$ ufc/g, resultou em teor de etanol menor do que da silagem controle, inclusive menor do que o tratamento com *L. diolivorans* $10^6$ ufc/g, sugerindo a possibilidade de controle da população de leveduras.

A participação do ácido láctico nas silagens foi mensurada e está apresentada na Tabela 2. Os valores variaram de 1,08% MS a 3,72% MS, sendo que a média dos tratamentos foi de 2,21% MS. Houve redução no teor de ácido láctico em função do tempo de abertura, sendo que o teor aos 80 dias de fermentação foi igual a 2,85% e

após 140 dias de 1,57%. A queda no teor de ácido láctico é provavelmente resultado da utilização deste como substrato pelos aditivos bacterianos (DRIEHUIS, 1999), o que causou aumento significativo no pH das silagens de 3,48 para 3,51. Os dados do presente estudo estão de acordo com trabalhos publicados, contudo existe grande variação quanto aos valores obtidos para essa variável nos diferentes trabalhos.

Alli et al. (1982) verificaram teores de ácido láctico variando entre 1,66% MS e 1,93% MS. Alcântara obteve 1,52% MS em silagens de cana-de-açúcar sem aditivo e 2,91% MS em silagens tratadas com NaOH.

Kung Jr e Stanley (1982) trabalhando com a ensilagem de cana-de-açúcar colhida em diferentes períodos de desenvolvimento vegetativo, observaram teores de ácido láctico variando entre 5,65 % MS a 2,82% MS, sendo que o menor valor foi acompanhado pelo maior teor de etanol. O comportamento observado no atual experimento não segue a tendência observada por Kung Jr e Stanley (1982) já que baixos valores de ácido láctico não foram necessariamente acompanhados de altos valores de etanol (Tabela 2). A presença de outros ácidos produzidos pelos diferentes aditivos, poderia justificar, ao menos em parte, a diminuição no teor de etanol pelo controle da população de leveduras. Contudo, os dados referentes a avaliação microbiológica não foram apresentados pois apresentaram baixa consistência decorrentes de dificuldades ocorridas durante a incubação.

No primeiro experimento onde efeitos do *L. diolivorans* foram observados, Driehuis et al. (1999) constataram que o aumento na atividade desta bactéria era acompanhado de diminuição no teor de ácido láctico.

Os autores exploraram o aumento gradativo de *L. buchneri* inoculados em silagens de milho e foi verificado que a medida em que se aumentava as adições da bactéria produtoras de 1,2-propanodiol (*L. buchneri*), o teor de ácido láctico era reduzido em até 7 vezes quando comparado com o resultado obtido na silagem controle. A redução no teor de ácido láctico ocorre devido ao uso deste, pelo *L. buchneri* como substrato para síntese de outras substâncias: 1,2-propanodiol e ácido acético. A utilização do 1,2-propanodiol pelo *L. diolivorans* resulta em aumento na concentração de 1-propanol e ácido propiônico, como constatado por Driehuis et al. (1999).

No atual experimento valores no teor do ácido láctico de 1,26% MS e 1,86% MS foram encontrados nos tratamentos onde *L. dilliovarans* coexistiam com fontes de 1,2-propanodiol, esses valores são similares aos obtidos por Driehuis (1999), contudo não houve diferença estatística entre os valores obtidos pelos dois tratamentos e a silagem controle.

Os valores de pH das silagens estão apresentados na Tabela 2. As silagens tiveram pH variando entre 3,78 e 3,46, desta forma se encontram dentro dos limites reportados na literatura, para silagens de cana-de-açúcar (PEDROSO 2003, JUNQUEIRA 2006). McDolnald (1991) cita que valores entre 4,2 e 3,8 devem ser esperados em silagens bem conservadas. No presente estudo, mesmo contando com valores de pH abaixo de 3,8 em todos os tratamentos, esses não devem ser avaliados de maneira isolada na caracterização de silagens, já que outros fatores, como a velocidade de declínio da concentração de íons e a capacidade tamponante da forragem interferem de maneira conjunta no efeito antifúngico dos ácidos.

Junqueira (2006) obteve valores de pH variando entre 3,46 e 3,85 em silagens de cana-de-açúcar, sendo o menor valor resultante do efeito do *L. buchneri*. Assim como no experimento relatado pela autora, pode se notar na Tabela 2 que os maiores valores obtidos para o pH foram relativos às silagens tratadas com uréia (3,78), seguidas das silagens controle (3,56) e, daquelas contendo *L. buchneri* (3,5). Segundo Vilela (1998) silagens com qualquer fonte de  $\text{NH}_3^+$  devem ter o abaixamento do pH dificultado pelo fato do  $\text{NH}_3^+$  se ligar aos íons  $\text{H}^+$  do meio. Tal fato foi constatado também por Roth et al. (2005), onde o aumento nas concentrações de uréia levaram ao crescimento do pH da silagem de cana-de-açúcar (4,1), em tratamento contendo 1% de uréia na MV, muito acima do valor encontrado para o mesmo tratamento no presente estudo (3,78).

Os valores obtidos em todos os tratamentos contendo *L. diolivorans* foram mais baixos que os valores de pH dos demais tratamentos. Driehuis et al. (1999) verificaram que o aumento da dose de inoculante de *L. buchneri* até  $10^6$  ufc/g geraram aumento nos valores de pH, em função da diminuição na concentração de ácido láctico usado como substrato por esse microrganismo. Desta forma, mesmo havendo interferência da presença desconhecida de *L. diolivorans* nas silagens confeccionadas por Driehuis et al. (1999), e pouco provável que seja este o responsável pelo aumento do pH, mas sim

a presença de *L. buchneri* que afeta tradicionalmente a concentração de ácido láctico. Siqueira et al. (2004) trabalhando com silagem de cana-de-açúcar tratada com *L. buchneri*  $5 \times 10^4$  ufc/g obtiveram valor de pH de 3,43, sendo este similar ao resultado obtido pelo tratamento com *L. buchneri* no presente experimento (3,5).

Tabela 2 - Composição bromatológica das silagens de cana-de-açúcar inoculadas com aditivos químicos, bacterianos e associações de aditivos

Variáveis	Tratamentos								Média	EPM	Abert	Abertx Trat
	Controle	Lb 10 <sup>4</sup>	Ld 10 <sup>5</sup>	Ld 10 <sup>6</sup>	Lb +Ld	1,2 p	1,2 p+ Ld 10 <sup>6</sup>	Uréia				
MS (%)	23,01 <sup>c</sup>	22,50 <sup>c</sup>	22,83 <sup>c</sup>	20,34 <sup>d</sup>	24,51 <sup>b</sup>	23,1 <sup>c</sup>	26,30 <sup>a</sup>	22,38 <sup>c</sup>	23,12	0,31	NS	NS
MM (% MS)	2,41 <sup>d</sup>	2,69 <sup>c</sup>	2,77 <sup>bc</sup>	3,7 <sup>a</sup>	2,72 <sup>c</sup>	2,37 <sup>d</sup>	2,98 <sup>b</sup>	2,97 <sup>b</sup>	2,83	0,07	NS	NS
PB (% MS)	3,998 <sup>b</sup>	4,08 <sup>b</sup>	4,11 <sup>b</sup>	4,9 <sup>b</sup>	4,05 <sup>b</sup>	3,991 <sup>b</sup>	3,51 <sup>b</sup>	15,21 <sup>a</sup>	5,48	0,58	NS	NS
FDN (% MS)	73,70 <sup>a</sup>	73,56 <sup>a</sup>	67,73 <sup>b</sup>	73,53 <sup>a</sup>	63,40 <sup>c</sup>	77,12 <sup>a</sup>	67,30 <sup>bc</sup>	65,25 <sup>bc</sup>	70,20	1,40	*	NS
FDA (% MS)	45,61 <sup>b</sup>	45,55 <sup>b</sup>	42,88 <sup>c</sup>	46,98 <sup>ab</sup>	39,62 <sup>d</sup>	48,85 <sup>a</sup>	41,74 <sup>cd</sup>	41,40 <sup>cd</sup>	44,08	0,31	NS	NS
Etanol (% MS)	7,91 <sup>ab</sup>	6,45 <sup>bc</sup>	5,56 <sup>cd</sup>	8,1 <sup>ab</sup>	3,93 <sup>de</sup>	7,57 <sup>ab</sup>	2,1 <sup>e</sup>	9,04 <sup>a</sup>	6,33	0,68	NS	NS
Ác. Láctico (% MS)	2,23 <sup>bc</sup>	2,02 <sup>bcd</sup>	3,72 <sup>a</sup>	2,85 <sup>ab</sup>	1,86 <sup>bcd</sup>	1,08 <sup>d</sup>	1,26 <sup>cd</sup>	2,67 <sup>b</sup>	2,21	0,38	**	NS
pH	3,56 <sup>b</sup>	3,50 <sup>c</sup>	3,39 <sup>e</sup>	3,46 <sup>d</sup>	3,371 <sup>e</sup>	3,54 <sup>b</sup>	3,370 <sup>e</sup>	3,78 <sup>a</sup>	3,5	0,01	*	NS
CHO Sol (% MS)	1,79 <sup>e</sup>	3,70 <sup>d</sup>	4,73 <sup>bcd</sup>	3,72 <sup>d</sup>	5,44 <sup>abc</sup>	3,66 <sup>d</sup>	5,93 <sup>a</sup>	4,63 <sup>cd</sup>	4,20	0,38	*	**

Nota: Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (P<0,05). NS = não significativo, \* (P<0,05), \*\* (P<0,01), Abert =efeito de período de abertura, Abert x trat =efeito da interação entre período de abertura e tratamento. Controle = Silagem sem aditivo contendo água (1 L/t), Lb 10<sup>5</sup>=(*L. buchneri* 5x10<sup>4</sup> ufc/g de forragem úmida), Ld = (*L. diolivorans* 1x10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> ufc/g de forragem úmida), Lb + Ld = (*L. buchneri* 5x10<sup>4</sup> + *L. diolivorans* 10<sup>6</sup> ufc/g de forragem úmida), uréia = (1% MV), 1,2 p = (1,2-propanodiol a 1 % MS) e 1,2 p + Ld = (1,2-propanodiol a 1 % + *L. diolivorans* 10<sup>6</sup> ufc/g de forragem úmida).

### 2.2.3.2 Avaliação de perdas nos processos fermentativos

#### 2.2.3.2.1 Perda por gases

Os dados de perdas gasosas são apresentados na Tabela 4, Constatou-se que os tratamentos contendo *L. diolivorans* com alguma fonte de 1,2-propanodiol, sintético ou vindo do *L. buchneri*, apresentaram os menores valores, 20,36% MS e 20,62% MS respectivamente. Contudo, contrariando a expectativa, o tratamento contendo  $10^6$  ufc/g foi responsável pela maior perda de gás, chegando a 32,51% MS. Os outros tratamentos não diferiram do tratamento controle. Uma hipótese para explicar o aumento de perdas gasosas no tratamento *L. diolivorans*  $1 \times 10^6$  cfu/g MV está no fato de esta bactéria ser heterolática, ou seja, capaz de sintetizar ácido láctico e outros ácidos causando indiretamente perdas de MS pela aumento na produção de CO<sub>2</sub>.

Os resultados obtidos para esse parâmetro estão dentro do que se observa na literatura, contudo dados muito divergentes são encontrados, isso porque inúmeras variáveis podem alterar a perda gasosa, entre eles o tipo de fermentação, o teor de MS, teor de carboidratos e até mesmo a presença e o tipo de aditivos bacterianos inoculados na silagem.

Os dois tratamentos que apresentaram as menores perdas gasosas foram também os tratamentos que apresentaram a menor fermentação alcoólica, visto o teor de etanol apresentado na Tabela 2. A fermentação alcoólica gera grande quantidade de CO<sub>2</sub> que é perdido na forma de gás, isso faz com que a alta correlação existente entre o teor de etanol e as perdas gasosas sejam justificadas (Tabela 3). Contudo, a baixa concentração de etanol não priva necessariamente, a silagem de grandes perdas gasosas. Pedroso (2003) verificou diminuição significativa no teor de etanol de silagens de cana-de-açúcar tratadas com uréia 0,5% MV em relação à silagem controle (2,48% e 4,05% respectivamente), entretanto, as perdas gasosas não diferiram estatisticamente (6,14% MS para 5,47% MS). Os valores obtidos por Pedroso (2003) são inferiores aos relatados neste experimento, contudo, aquele autor encontrou perdas gasosas máximas de 15% em silagens de cana-de-açúcar sem aditivo após 90 dias de ensilagem, bem inferior ao observado no presente estudo, o que poderia justificar em parte as divergências.



Junqueira (2006) avaliando silagens de cana-de-açúcar com *L. buchneri* observou perdas gasosas de 14,97%, enquanto silagens tratadas com uréia 1% MV apresentaram perdas de 15,98%, e na silagem controle esse valor foi de 22,19%. No experimento atual não houve diferença significativa na porcentagem de perdas gasosas entre esses mesmos aditivos mencionados e a silagem controle.

Sousa et al. (2005) avaliando as perdas por gases em silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e bacterianos verificaram que nem a uréia 1% MV e nem o *L. buchneri*  $5 \times 10^4$  UFC/g diferiram do tratamento controle, relevando valores de 28,01%, 33,48% e 32,5%, respectivamente. Esse relato se assemelha aos dados obtidos nesse experimento, e da mesma forma, tais aditivos não se mostraram eficientes para tal parâmetro. Contudo, Toledo Filho et al. (2005) constataram haver diminuição de perdas gasosas em silagens tratadas com aditivos: *L. buchneri*  $5 \times 10^4$  ufc/g (26,75% MS) e *L. diolivorans*  $10^6$  ufc/g (19,6% MS). A divergência aparente dos dados na literatura sugere que outros fatores estão associados ao controle de perdas gasosas quando da utilização de aditivos.

Além da correlação significativa observada entre perda por gases e etanol (Tabela 3), foram observados outros resultados interessantes com base na análise de correlação entre as variáveis apresentada na Tabela 3. A alta correlação negativa existente entre as perdas gasosas e o teor de matéria seca da silagem (Tabela 3) é provavelmente resultado das equações usadas para os cálculos de perdas, como pode ser observado no item 2.2.2 material e métodos. A provável explicação estaria no fato de que nas silagens com elevada perda por gases há o desaparecimento de matéria seca, em especial carboidratos solúveis, que resultaria em silagens com menor teor de matéria seca final como pode ser observado na tabela 2.

A existência de correlações significativas e positivas entre as porções fibrosas da planta e as perdas gasosas decorre, provavelmente, do fato dessas frações apresentarem correlação negativa com o principal substrato para a geração de gases, os carboidratos solúveis preservados durante a fermentação conforme tabela 3.

O pH foi correlacionado positivamente com o teor de etanol nas silagens (Tabela 3). Altos valores para ambos os parâmetros são características de fermentações indesejáveis. Contudo o pH, que é uma variável dependente da produção de ácidos, foi negativamente correlacionado com os carboidratos solúveis (Tabela 3). A partir dessas correlações é possível se entender que silagens com

maior teor de etanol apresentando elevados valores de pH e baixos teores de carboidratos solúveis apresentaram fermentação preferencialmente alcoólica. Como pode ser visto na Tabela 2, os tratamentos contendo *L. diolivorans* com alguma fonte de 1,2-propanodiol, seguiram o comportamento inverso ao descrito, pois houve redução nos valores de pH e nos teores de etanol das silagens, dessa forma, o uso dos carboidratos possivelmente deve ter sido feito pelas bactérias na produção dos ácidos e não pelas leveduras na produção de álcool.

A perda de matéria seca total foi intimamente correlacionada com as perdas gasosas (Tabela 3), isso pode ser justificado pelo fato das perdas gasosas representarem de 86,9% a 99,7% das perdas totais. Os valores observados para perdas totais de MS na silagem similares são observados na literatura (SOUSA et, al 2005).

Tabela 3 - Coeficiente de correlação de parâmetros fermentativos das silagens de cana-de-açúcar

Parâmetros	Perda de gases	Perda total de MS	Etanol	pH
Perda de gases	-	0,84**	-	-
Perda de MS efluente	0,15	0,20	-0,02	-0,05
Etanol	0,63**	0,61**	-	0,62**
Carboidratos solúveis	-0,55**	-0,41**	-0,44**	-0,39**
Matéria seca %	-0,92**	-0,81**	-0,59**	-0,35**
FDN	0,54**	0,42**	0,21	0,10
pH	0,48**	0,42**	0,62**	-

Nota: \* = (P<0,05), \*\* = (P<0,001) Perda de gases (%MS), Perda total de matéria seca (%), Etanol=(%MS), Perda de MS efluente (% MS).

Sousa et al, (2005) observaram perdas totais de 35,25%, 31,49% e 36,7% em silagens de cana-de-açúcar controle, tratadas com uréia 1% MV e *L. buchneri*  $5 \times 10^4$  ufc/g, e de forma análoga o presente estudo não constatou diferenças de perdas de MS por gases para os tratamentos impostos sendo os valores observados de 31,45%, 31,58% e 31,88% respectivamente.

O mesmo comportamento observado para as perdas gasosas foi também relatado para as perdas totais de MS. Os tratamentos *L. diolivorans* adicionados de fontes de 1,2-propanodiol ou *L. diolivorans* mais *L. buchneri* os responsáveis pelas menores perdas totais (Tabela 4).

Muitos dos benefícios envolvendo o uso do *L. buchneri* são resultantes dos efeitos deste em diversos fatores envolvendo a fase pós-abertura do silo, ou seja,

em geral os resultados que normalmente justificam a utilização do *L. buchneri* não são relacionados com a dinâmica fermentativa. Como observado por Driehuis et al, (2001) aumentos gradativos na adição de *L. buchneri* em silagens de milho resultaram em perdas de MS 2.8 vezes maiores do que o a silagem controle. Kung Jr e Ranjit (2001) observaram recuperações de matéria seca em silagens de cevada com  $1 \times 10^5$  ufc/g e  $5 \times 10^5$  ufc/g (91,8% e 89,5%), abaixo da recuperação obtida na silagem controle (92,9%). Contudo, os mesmos autores obtiveram recuperação igual ao controle (92,6%) em silagens com  $10^6$  ufc/g. Driehuis et al. (1999) observaram as mesmas tendências ao obter perdas de MS maiores em baixas doses de inoculação de *L. buchneri* e maiores quando a adição era triplicada. Junqueira (2006) obteve maior recuperação de MS em silagens cana-de-açúcar tratadas com *L. buchneri*  $5 \times 10^4$  ufc/g (84,48%) em comparação ao observado na silagem controle (77,26%). Os dados obtidos na literatura relativos à dinâmica fermentativa em silagens aditivadas com *L. buchneri* ainda são erráticos, mas parece haver uma dose considerada mínima para que durante a fermentação haja perspectiva positiva de sua utilização. Também deve-se considerar que o desempenho desse aditivo pode apresentar diferenças de acordo com as fontes de forragem estudada. No caso da silagem de milho, os tratamento controle originalmente apresentou bom padrão de fermentação com a presença de bactérias homoláticas, fato que não ocorre quando se considera a conservação da cana-de-açúcar onde a fermentação alcoólica é bastante indesejável.

Dados divergentes também são observados na literatura quanto ao efeito da adição de uréia nos parâmetros fermentativos. Junqueira (2006) obteve maiores recuperações de MS nas três doses de uréia utilizadas, contudo Pedroso (2003) não observou diferença em relação à silagem controle, quando foi adicionado 0,5% MV de uréia. Em outro experimento Schmidt et al. (2004) observaram diferentes comportamentos para silagens de cana-de-açúcar confeccionadas por duas variedades recebendo uréia 0,5% MV após 120 dias de ensilagem. Naquele caso, a alteração varietal parece representar diferenças na disponibilidade de carboidratos solúveis, sugerindo haver necessidade de adequação da dose de uréia à composição da forragem a ser conservada.

Tabela 4 - Perdas resultantes da fermentação das silagens de cana-de-açúcar inoculadas com aditivos químicos, microbianos e associações de aditivos

Variáveis	Tratamentos								EPM	Média	Abert	Abert x Trat
	Controle	Lb 10 <sup>4</sup>	Ld 10 <sup>5</sup>	Ld 10 <sup>6</sup>	Lb + Ld	1,2 p	1,2 p+ Ld 10 <sup>6</sup>	Uréia				
Perdas Totais (% MS)	31,45 <sup>ab</sup>	31,88 <sup>ab</sup>	29,27 <sup>b</sup>	35,15 <sup>a</sup>	23,73 <sup>c</sup>	32,45 <sup>ab</sup>	20,42 <sup>c</sup>	31,58 <sup>ab</sup>	1,34	29,49	NS	NS
Perdas gases (% MS)	28,91 <sup>bc</sup>	29,41 <sup>b</sup>	26,60 <sup>c</sup>	32,51 <sup>a</sup>	20,62 <sup>d</sup>	30,00 <sup>ab</sup>	20,36 <sup>d</sup>	29,09 <sup>bc</sup>	0,96	27,19	NS	NS
Perda efluente (kg/ t MV)	33,84 <sup>bc</sup>	33,34 <sup>c</sup>	35,06 <sup>bc</sup>	37,56 <sup>a</sup>	36,30 <sup>ab</sup>	33,45 <sup>c</sup>	34,59 <sup>bc</sup>	35,19 <sup>abc</sup>	0,87	34,91	NS	NS

Nota: Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (P<0,05). NS = não significativo, \* (P<0,05), \*\* (P<0,01), Abert = efeito de período de abertura, Abert x trat = efeito da interação entre período de abertura e tratamento. Controle = Silagem sem aditivo contendo água (1 L/t), Lb 10<sup>5</sup> = (*L. buchneri* 5x10<sup>4</sup> ufc/g de forragem úmida), Ld = (*L. diolivorans* 1x10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> ufc/g de forragem úmida), Lb + Ld = (*L. buchneri* 5x10<sup>4</sup> + *L. diolivorans* 10<sup>6</sup> ufc/g de forragem úmida), uréia = (1% MV), 1,2 p = (1,2-propanodiol a 1 % MS) e 1,2 p + Ld = (1,2-propanodiol a 1 % + *L. diolivorans* 10<sup>6</sup> ufc/g de forragem úmida).

### 2.2.3.3 Análise da pós-abertura: estabilidade aeróbia

Os dados referentes ao ensaio de estabilidade aeróbia estão apresentados na Tabela 5. Os resultados de estabilidade aeróbia, ou seja, o tempo necessário para observar elevação de 2 °C da temperatura da silagem em relação ao ambiente, analisados segundo a metodologia proposta por Kung Jr (2000), não apresentaram diferenças entre tratamentos, sendo a média 39,03 h. Houve diferença significativa entre as datas de abertura para essa variável, sendo que inicialmente apresentou 31,35h de estabilidade, enquanto que na segunda abertura esse valor foi de 48,03h. O aumento de estabilidade está normalmente associado à diminuição no teor de carboidratos entre os períodos de abertura (PEDROSO, 2005).

Toledo Filho et al. (2005) não observaram diferenças no número de horas para se atingir a estabilidade aeróbia em silagens de cana-de-açúcar tratadas sem aditivo (28,3h), com *L. buchneri* (29,5h) e com *L. diolivorans* (55,6h).

A obtenção de valores similares para o acúmulo de temperatura durante 5 ou 10 dias de avaliação (ADITE-5 e ADITE-10) (Tabela 5), contrasta com o que foi sugerido pelos dados de Pedroso (2003), que sugeriu grande variação nas medidas envolvendo a estabilidade de silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e bacterianos. O autor encontrou diminuição no ADITE-5 de silagens tratadas com *L. buchneri* (8°C) em comparação a silagem controle (41°C), e um aumento no período de estabilidade aeróbia de 63%.

De acordo com a Tabela 5 é possível constatar que houve efeito de abertura, tanto para o ADITE-5 quanto para o ADITE-10, ambos tiveram maior aquecimento na segunda abertura. O ADITE-5 apresentou 14,91°C após 80 dias e 30,43 °C após 180 dias de fermentação, enquanto que o ADITE-10 apresentou valores maiores, mas como o mesmo comportamento, 35,66 °C na primeira abertura e 61,86°C na última. Pedroso et al. (2005) observaram que as melhoras observadas em relação a aplicação do *L. buchneri* no ADITE-5, não se mantiveram no ADITE-10, uma vez que esse apresentou valores menores do que a silagem aditivada com uréia. Relatos anteriores na literatura (SOUSA et al., 2005) apontam que silagens aditivadas com *L. buchneri* não promoveram melhorias quanto à estabilidade aeróbia, e com ADITE-5 até 30% menor em relação à silagem controle. Nesse caso a adição de uréia 1% MV não foi suficientes para promover estabilidade ou reduzir o acúmulo de temperatura (ADITE).

Os dados de temperatura máxima das silagens quando expostas ao ar e tempo para se atingir tal temperatura estão apresentados na Tabela 5. A média da temperatura máxima das silagens quando expostas ao ar foi de 40,01 °C e o tempo médio para se atingir essa temperatura foi de 83,97h. Os valores obtidos são similares aos resultados obtidos por Neto et al. (2005), em silagens controle de cana-de-açúcar nas quais após 3 dias a temperatura medida foi de 32,1 °C.

Junqueira (2006) também não obteve diferença quanto aos valores de temperatura máxima nos diferentes tratamentos químicos e bacterianos impostos às silagens de cana-de-açúcar, sendo que em média a temperatura foi de 40,5 °C. Toledo Filho et al. (2005) não encontraram diferenças quanto ao tempo para se atingir a temperatura máxima em silagens de cana-de-açúcar tratadas sem aditivos (48,6h), com *L.buchneri* (53,08h) e *L. diolivorans* (84,37h).

O tempo em horas para início da elevação da temperatura das silagens expostas em relação à temperatura ambiente foi mensurado e está apresentado na Tabela 5. Não houve diferença significativa entre os tratamentos. A média de 21,97h esteve bem abaixo da média encontrada por Junqueira (2006) (148,8h) ao tratar silagens de cana-de-açúcar com uréia e *L. buchneri*. A explicação para isso está, provavelmente, na precisão dos sensores de temperatura utilizados neste experimento, capazes de detectar variações de temperatura de 0,1 °C.

As perdas de MS em 10 dias de avaliação estão relatadas na tabela 5, e mostram não haver diferença entre os tratamentos, contudo foram significativas entre as datas de abertura. A primeira abertura sofreu perdas maiores, da ordem de 18,71% MS, enquanto a segunda abertura apresentou perdas de somente 8,51% MS. Essas diferenças estão associadas à quantidade de ácidos totais, principalmente aqueles capazes de preservar melhor a silagem em meio aeróbio, outra hipótese seria a da não existência de quantidades significativas de substrato para o crescimento microbiano no tempo zero, como normalmente é observado em silagens controle com baixo teor de carboidrato residual, limitando a atividade biológica no período pós-abertura do silo.

Toledo Filho et al. (2004) não observaram diferenças de perda de MS após 10 dias de exposição em silagens de cana-de-açúcar controle (19,82%) e tratadas com *L. buchneri*  $5 \times 10^4$  UFC/g (17,05%). Junqueira (2006) ao avaliar silagens de cana na pós abertura, não obteve diminuição da perda de MS em silagens aditivadas com uréia 1% MV (15,87% MS) em relação ao controle (13,85% MS). Segundo a autora,

a inoculação de *L. buchneri*  $5 \times 10^4$  UFC/g levou ao aumento nas perdas de MS (17,79% MS) naquele estudo.

Tabela 5 - Estabilidade aeróbia das silagens de cana-de-açúcar inoculadas com aditivos químicos, microbianos e associações de aditivos

Variáveis	Tratamentos								Média	EPM	Abert	Abert x trat
	Controle	Lb 10 <sup>4</sup>	Ld 10 <sup>5</sup>	Ld 10 <sup>6</sup>	Lb +Ld	1,2 p	1,2 p+ Ld 10 <sup>6</sup>	Uréia				
EA (h)	47,75	37,75	38,50	41,01	26,68	37,62	44,43	43,8	39,03	6,21	*	NS
TIE (h)	20,24	22,18	24,18	27,99	15,10	18,10	18,18	31,37	21,97	5,01	NS	NS
TMáx (°C)	40,02	41,53	40,69	39,97	41,27	40,15	36,47	38,05	40,01	1,33	NS	NS
TTmáx (h)	85,04	72,61	97,11	67,09	84,86	61,86	77,82	114,11	83,97	20,62	NS	NS
ADITE-5	23,31	24,80	22,70	22,59	24,79	24,04	20,19	18,94	23,26	4,60	*	NS
ADITE-10	48,54	47,02	55,85	44,00	49,25	44,89	45,92	54,60	49,95	10,68	*	NS
PMS (%)	12,52	15,09	15,55	12,40	14,50	14,00	13,29	11,49	13,61	1,25	**	NS

Nota: Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (P<0,05). NS = não significativo, \* (P<0,05), \*\* (P<0,01), Abert = efeito de período de abertura, Abert x trat = efeito da interação entre período de abertura e tratamento. Controle = Silagem sem aditivo contendo água (1 L/t), Lb 10<sup>5</sup> = (*L. buchneri* 5x10<sup>4</sup> ufc/g de forragem úmida), Ld = (*L. diolivorans* 1x10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> ufc/g de forragem úmida), Lb + Ld = (*L. buchneri* 5x10<sup>4</sup> + *L. diolivorans* 10<sup>6</sup> ufc/g de forragem úmida), uréia = (1% MV), 1,2 p = (1,2-propanodiol a 1 % MS) e 1,2 p + Ld = (1,2-propanodiol a 1 % + *L. diolivorans* 10<sup>6</sup> ufc/g de forragem úmida). EA = estabilidade aeróbia, TIE = tempo para início de elevação da temperatura. TMáx = Temperatura máxima, TTmáx = tempo necessário para se atingir a temperatura máxima, ADITE-5 e ADITE-10 = acúmulo térmico entre a diferença média diária da temperatura das silagens expostas ao ar e a temperatura ambiente em 5 e 10 dias, PMS = perda de matéria seca durante 10 dias de exposição ao ar.



Os resultados da avaliação dos coeficientes de correlações dos parâmetros de estabilidade aeróbia estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Coeficiente de correlação de parâmetros de estabilidade aeróbia das silagens de cana-de-açúcar

Parâmetros	T <sub>máx</sub>	EA	Perda de MS
EA	-0,61**	-	-
T <sub>máx</sub>	-0,30	0,27	0,07
ADITE-5	0,45**	-0,28*	-0,31*
ADITE-10	0,39**	-0,21	-0,18
Perda de gases	0,32**	-0,49**	-

Nota: \* = (P<0,05), \*\* = (P<0,001), EA = estabilidade aeróbia, T<sub>Máx</sub> = Temperatura máxima, ADITE-5 e ADITE-10 = acúmulo da diferença média diária entre a temperatura das silagens expostas ao ar e a temperatura ambiente em 5 e 10 dias, PMS = perda de matéria seca durante 10 dias de exposição

Os parâmetros de estabilidade aeróbia e temperatura máxima estão correlacionados de maneira negativa (tabela 6). A rápida quebra da estabilidade gera, segundo o coeficiente de correlação, maiores picos temperatura, o que parcialmente está correlacionado a perda de gases.

De maneira geral os coeficientes de correlação obtidos são baixos, embora algumas vezes, significativos. Os acréscimos de temperatura, seja pela intensidade ou pela antecipação na elevação, estão correlacionados entre si e sugerem maiores perdas de matéria seca. Contudo, as perdas totais de matéria seca não podem ser explicadas exclusivamente com os dados referentes à elevação de temperatura.

## 2.3 CONCLUSÃO

O estudo da associação de aditivos na ensilagem de cana-de-açúcar oferece a oportunidade para novos ganhos em relação às estratégias de manejo atualmente recomendadas.

Tratamentos utilizando *Lactobacillus diolivorans* 10<sup>6</sup>ufc/g em associações com *Lactobacillus buchneri* ou 1,2-propanodiol sintético, apresentaram características desejáveis para a ensilagem de cana-de-açúcar. Para tal, novas pesquisas são necessárias, como experimentos testando diferentes concentrações, avaliação de estabilidade aeróbia e sobretudo, estudos de desempenho animal para definitiva recomendação.

A inoculação de silagens de cana-de-açúcar com o microrganismo *Lactobacillus diolivorans* adicionado exclusivamente promoveu respostas menos favoráveis do que quando associado a uma fonte de 1,2-propanodiol e apontou a contagem  $10^5$  ufc/g como mais promissora.

O aditivo *Lactobacillus buchneri*  $5 \times 10^4$  ufc/g quando adicionado isoladamente não apresentou boa eficácia em relação às variáveis estudadas de fermentação e estabilidade aeróbia. As respostas discrepantes que têm sido relatadas com o uso desse microrganismo sugerem a reavaliação das dosagens recomendadas para silagem de cana-de-açúcar.

A adição exclusiva de 1,2-propanodiol, na ensilagem como esperado, não apresentou melhoras nos parâmetros avaliados sugerindo a possibilidade de não haver população de *L. diolivorans* epífita em contagem suficiente para gerar resposta positiva.

Contrariamente a expectativa, a uréia 1%MV não foi efetiva em controlar a produção de etanol e as perdas ocorridas na fermentação, embora tenha promovido alterações positivas na composição química da silagem com a redução no teor de FDN.

## Referências

ADESOGAN, A.T.; SALAWU, M.B.; ROSS, A.B.; DAVIES, D.R.; BROOKS, A.E. Effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides* inoculants, or chemical additive on the fermentation, aerobic stability, and nutritive value of crimped wheat grains. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 86, p.1789-1796, 2003.

ALCÂNTARA, E.; AGUILERA, A.; ELLIOT, R.; SHIMADA, A. Fermentation and utilization by lambs of sugarcane harvested fresh and ensiled with and without NaOH. 4. Ruminant kinetics. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 23, p. 323-331, 1989.

ALLI, I.; BAKER, B.E. Studies on the fermentation of chopped sugarcane. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 7, p. 411-417, 1982.

ALLI, I.; FAIRBAIRN, R.; BAKER, B. E.; GARCIA, G. The effects of ammonia on the fermentation of chopped sugarcane. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 9, p. 291-299, 1983.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15<sup>th</sup> ed. Arlington: AOAC, 1990. v.1, 1117p.

BOIN, K.K.; TEDESCHI, L.O. Cana-de-açúcar na alimentação de gado de corte. In: WALLACE, R.J., CHESSON, A. **Biotechnology in animal feeds and animal feeding**. New York: VCH, 1995. chap.12, p. 33-54.

CASALI, A.O.; REZENDE, A.V.; BARCELOS, A.F.; RODRIGUES, R.; MEDEIROS, L.T.; BASTOS, R.C. Avaliação da silagem de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) aditivada com raspa de batata (*Solanum tuberosum* L.). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: SBZ, 2004. 1 CD ROM.

CLAPPERTON, J.L.; CZERKAWSKI, J.W. Metabolism of propane-1:2-diol infused into the rumen of sheep. **British Journal of Nutrition**, London, v. 27, p. 553-560, 1972.

CZERKAWSKI, J.W.; BRECKENRIDGE, G. Dissimilation of 1,2-propanediol by rumen micro-organisms. **British Journal of Nutrition**, London, v. 29, p. 317-330, 1973.

DANNER, H.; HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; BRAUN, R. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.69, n.1, p. 562-567, 2002.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; VAN WIKSELAAR, P. G. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri* with or without homofermentative lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 56, p. 330–343, 2001.

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

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, p. 350, 1956.

DURIX, A.; JEAN-BLAIN, C.; SALLMANN, H.P. Use of a semicontinuous culture system (RUSITEC) to study the metabolism of ethanol in the rumen and its effects on ruminal digestion. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v.71, p.115-123, 1991.

FILYA, I. The effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. **Journal of Applied Microbiology**, New York, v.95, p.1080-1086, 2003.

FILYA, I.; SUCU, E.; KARABULUT, A. The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. **Journal of Applied Microbiology**, New York, v. 97, p. 818-826, 2004.

FREITAS, A.W.P.; PEREIRA, J.C.; ROCHA, F.C.; COSTA, M.G.; LEONEL, F.P.; RIBEIRO, M.D.; SILVA, C.J.; SILVA, L.O.; MOREIRA, M.S. Características da silagem de cana-de-açúcar tratada com dois inoculantes e enriquecida com resíduo de soja. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41, 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: SBZ, 2004. 1 CD ROM.

HAMADA, T.; HODATE, K.; MATSUMOTO, M.; ISHII, T. Counteractive effects of propionate or 1,2-propanediol against hypoglycemia and ketonemia of tributyrin-treated cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 67, p. 1452-1456, 1984.

HARRIS, L.E. **Os métodos químicos e biológicos empregados na análise de alimentos**. Gainesville: University of Florida, 1970. 150p.

JUNQUEIRA, M.C. **Aditivos químicos e inoculantes microbianos em silagens de cana-de-açúcar: perdas na conservação, estabilidade aeróbia e o desempenho de animais**. 2006. 98p. Dissertação (Mestrado em ciência animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

KROONEMAN, J; FABER, F; ALDERKAMP, A. *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, New York, v.52, p.639-646, 2002.

KUNG JUNIOR, L. Microbial and chemical additives for silage – effects on fermentation and animal response. In: WORKSHOP SOBRE MILHO PARA SILAGEM, 2000, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fealq, v.2, p.53, 2000.

KUNG JUNIOR, L. Preparation of silage water extracts for chemical analyses. **Standard operating procedure** – 001 2.03.96. ed. University of Delaware – Ruminant Nutrition Lab. – Worrilow 309. 1996.

KUNG JUNIOR, L.; RANJIT, N. K. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.84, p. 1149-1155, 2001.

KUNG JUNIOR, L.; STANLEY, R.W. Effect of stage of maturity on the nutritive value of whole-plant sugarcane preserved as silage. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 54, p. 689-696, 1982.

KUNG JUNIOR, L.; TAYLOR, C.C.; LYNCH, M.P.; NEYLON, J.M. The effect of treating alfafa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Albany, v. 86, p. 336-343, 2003.

LAMBERT, R.J.; STRATFORD, M. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. **Journal of Applied Microbiology**, New York, v. 86, p. 157-164, 1999.

LUCCI, C.S.; VALVASORI, E.; LOPES, R.; CAPEZZUTO, A.; FONTOLAN, V.; BUFFARAH, G. cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) in natura ou ensilada, adicionadas ou não de uréia, em dietas para ruminantes. Digestibilidade aparente. **Boletim da Indústria Animal**, Nova Odessa, v.60, p.47-53, 2003.

MATSUOKA, S.; HOFFMANN, H.P. Variedades de cana-de-açúcar para bovinos. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 5., 1993, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1993. p. 17-35.

MATTOS, W.R.S. **Cana-de-açúcar: recurso forrageiro do passado, presente e futuro**. 2003. 103 p. Tese (Livre docência) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2003.

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

MOON, N.J. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.55, p.453-460, 1983.

MUCK, R.E.; KUNG JUNIOR, L. Effects of silage additives on ensiling. In: SILAGE: FIELD TO FEEDBUNK, Herchey, 1997. **Proceedings...** Herchey, NRAES, 1997. p.187-199; 200-210.

NETO, G.B.; SIQUEIRA, G.R.; NOGUEIRA, J.R.; REIS, R.R.; SILVA, D.N.; ROTH, A.P.T.P.; ROTH, M.T.P. Pós-abertura de silagem de cana-de-açúcar cv. IAC86-2480 (*Saccharum officinarum* L.) com doses de óxido de cálcio. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42, 2005, Goiânia, **Anais...** Goiânia: UFG/SBZ, 2005. 1 CD ROM.

NISHIRO, N; YOSHIDA, M; SHIOTA, H; SAKAGUCHI, E. Accumulation of 1,2-propanediol and enhancement of aerobic stability in whole maize silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.94, p.800-807, 2003.

NUSSIO, L.G.; SCHMIDT, P. Silagens de cana-de-açúcar para bovinos leiteiros: aspectos agronômicos e nutricionais. In: SANTOS, F.A.P.; MOURA, J.C.; FARIA, V.P. VISÃO TÉCNICA E ECONÔMICA DA PRODUÇÃO LEITEIRA: 2005. Piracicaba **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 193-218.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; KROONEMAN, J.; GOTTSCHAL, J.C.; SPOELSTRA, S.F.; FABER, F.; DRIEHUIS, F. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2 propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p.125-132, 2001.

PEDROSO, A.F. **Aditivos químicos e microbianos como inibidores da produção de etanol em silagens de cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2003. 120 p. Tese (Doutorado em agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

PEDROSO, A.F.; NUSSIO, L.G.; PAZIANI, S.F.; LOURES, D.R.S.; IGARASI, M.S.; COELHO, R.M.; PACKER, I.H.; HORII, J.; GOMES, L.H. Dinâmica da fermentação e da microflora epífita em silagem de cana-de-açúcar. **Scientia agrícola**, Piracicaba, v. 62, n.5, p. 427-432, 2005.

PEDROSO, A.F.; NUSSIO, L.G.; PAZIANI, S.F.; LOURES, D.R.S.; IGARASI, M.S.; MARI, L.J.; COELHO, R.M.; RIBEIRO, J.L.; ZOPOLLATTO, M.; HORII, J. Bacterial inoculants and chemical additives to improve fermentation in sugar cane (*Saccharum officinarum*) silage. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 13., 2002 Auchincruive. **Anais...** Auchincruive: SAC, 2002. p 55-66.

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

RANJIT, N.K.; KUNG JUNIOR., L. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 83, p.526-535, 2000.

RIBEIRO, J.L.; QUEIROZ, O.C.M.;NUSSIO,L.G. Desenvolvimento de aditivos microbianos para ensilagem: Realidade e perspectivas. In: REIS, R.A.; SIQUEIRA, G.R.; BERTIPAGLIA, L.M.A. **Volúmosos na produção de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2005. p. 1-24.

ROTH, M.T.P.; SIQUEIRA, G.R.; REIS, R.A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.B.; BERNARDES, T.F.; PIRES, A.J.V.; ROTH, A.P.T.P.; AMARAL, R.C. Ensilagem da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) tratada com doses de uréia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia, **Anais...** Goiânia: UFG/SBZ, 2005. 1 CD ROM.

SAS INSTITUTE. **SAS users guide**: statistics. Cary, 1999. 965p.

SCHMIDT, P.; NUSSIO, C.M.B.; RODRIGUES, A.A.; NUSSIO, L.G.; SANTOS, P.M.; SILVA, C.E. Produtividade, composição morfológica, digestibilidade e perdas no processo de ensilagem de duas variedades de cana-de-açúcar, com e sem adição de uréia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. 41, 2004. Campo Grande, **Anais...** Campo Grande: SBZ, 2004.1 CD ROM.

SCHMIDT, P.; NUSSIO, L.G.; NUSSIO, C.M.B.; RODRIGUES, A.A.; SANTOS, P.M.; RIBEIRO, J.L.; MARI, L.J.; ZOPOLLATTO, M.; SANTOS, M.C.; QUEIROZ, O.C.M.; SOUSA, D.P. Forage variety and maturity on fermentative losses of sugarcane silages added with urea.. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 14, 2005, Belfast. **Proceedings...** Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2005. p. 263.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. Viçosa: UFV, 1981. 166p.

SILVA, S.C. A cana-de-açúcar como alimento volumoso suplementar. In: SANTOS, F.A.P.; NUSSIO, L.G.; CORSI, M.; SILVA, S.C.; FARIA, V.P. **Volúmosos para bovinos**. Piracicaba: FEALQ, 1993. p. 59-74.

SIQUEIRA, G.R. **Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) ensilada com aditivos químicos e microbianos**. 2005. 92 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2005.

SIQUEIRA, G.R.; BERNARDES, T.F.; REIS, R.A. Instabilidade aeróbia de silagens: efeitos e possibilidades de preservação. **Volumosos na produção de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2005. p. 25-60.

SIQUEIRA, G.R.;SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; BERNARDES, T.F.; REIS, R.A.; AMARAL, R.C.; PIRES, A.; ROTH, M.T.P. Interações entre inoculantes microbianos e aditivos químicos na fermentação e na estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004. Campo Grande, **Anais...** Campo Grande: SBZ, 2004.1 CD ROM.

SOUSA, D. P.; MATTOS, W.R.S.; NUSSIO, L.G.; MARI, L.J.; SANTOS, M.C.; ZOPOLLATTO, M.; SCHMIDT, P.; RIBEIRO, J.L. ; QUEIROZ, O.C.M.; JUNQUEIRA, M.C.; CAMARGO, M.S.; TOLEDO FILHO, S.G.; FIGUEIRÓ, R.N. Avaliação das perdas por efluentes e gases em silagens de cana-de-açúcar aditivadas com inoculantes químicos e bacterianos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia, **Anais...** Goiânia: UFG/SBZ, 2005. 1 CD ROM.

TAYLOR, C.C.; RANJIT, N.J.; MILLS, J.A.; NEYLON, J.M.; KUNG JR, L. The effect of treating whole-plant barley with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 85, p. 1793-1800, 2002.

TOLEDO FILHO, S.G., SCHIMIDT, P., NUSSIO, L.G., SOUSA, D.P., QUEIROZ, O.M. Estabilidade aeróbia de rações contendo silagens de cana-de-açúcar inoculadas com "*Lactobacillus buchneri*" 40788 e de ingredientes concentrados. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande, **Anais...** Campo Grande: SBZ, 2004. 1 CD ROM.

TOLEDO FILHO, S.G.; SOUSA, D.P.; Queiroz, O.C.M.;RIBEIRO, J.L.; MARI, L.J. Perdas durante a ensilagem de cana-de-açúcar inoculada com aditivos microbianos. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, nº 13, 2005, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba:USP, 2005. 1 CD-ROM.

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

VILELA, D. Aditivos para silagens de plantas de clima tropical. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA., 35, 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998. 1 CD ROM.

WEINBERG, Z.G., G. ASHBELL, Y. HEN; A. ARIELI, G. SZAKACS, I. FILYA.  
Ensiling whole-crop wheat and corn in large containers with *Lactobacillus plantarum*  
and *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Industrial Microbiology and  
Biotechnology**, Hampshire, v. 28, n.1, p. 7-11, 2002.



### 3 SILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum* L.) COMPARADA A FONTES TRADICIONAIS DE VOLUMOSOS SUPLEMENTARES NO DESEMPENHO DE VACAS DE ALTA PRODUÇÃO

#### Resumo

O experimento foi realizado para avaliar o desempenho de vacas de alto potencial de produção de leite recebendo rações contendo diferentes fontes de volumosos. Foram utilizadas 48 vacas da raça Holandesa em estágio intermediário de lactação. O experimento foi delineado em múltiplos quadrados latinos 4X4 e os animais foram divididos em 4 baias coletivas em um sistema de confinamento tipo *free stall* nas quais permaneceram os 84 dias de avaliação sendo alimentadas duas vezes ao dia. Os períodos experimentais de 21 dias cada foram divididos em 14 dias de adaptação e 7 dias de coleta de dados. Os tratamentos utilizados consistiram de quatro fontes de volumosos: cana-de-açúcar *in natura*, silagem de cana-de-açúcar inoculada com *L. buchneri*, silagem de milho e a mistura de silagem de milho e cana-de-açúcar *in natura* (50:50). Na semana de coleta, amostras de ração total, volumosos e sobras foram tomadas para determinação bromatológica e as amostras de leite para determinação da sua composição. Observações de comportamento ingestivo dos animais foram realizadas durante turnos de 24h em cada período experimental. Um ensaio de estabilidade aeróbia foi realizado comparando rações totais e volumosos exclusivos no último período de avaliação. Amostras de volumosos e rações totais foram expostas ao ar em uma sala com temperatura controlada. Os resultados de estabilidade aeróbia mostraram que a silagem de cana-de-açúcar aditivada obteve o maior tempo sem aquecimento do material (13,25h). A ração de silagem de milho apresentou uma baixa estabilidade aeróbia (3,0h), justificando a menor ingestão desta ração em relação às demais. Os dados de desempenho mostraram diferenças na ingestão matéria seca, sendo os maiores valores observados para o tratamento silagem de cana-de-açúcar (23,5 kg/dia) e a mistura cana-de-açúcar mais silagem de milho (23,5 kg/dia). Todas as rações apresentaram elevadas produções de leite (22,65 kg/dia) que não diferiram entre si. O teor de gordura, no leite foi maior nos tratamentos contendo silagem de milho (3,61%) e silagem de milho mais cana-de-açúcar *in natura* (3,48%). Na avaliação do comportamento dos animais a ingestão de FDN acompanhou a tendência de maior consumo revelado nos tratamentos contendo silagem de cana-de-açúcar (10,18 kg FDN/dia) e na mistura de volumosos (9,36 kg FDN/dia). Pode-se concluir que a cana-de-açúcar *in natura* ou na forma ensilada foi capaz de suprir animais de grande demanda, desde que às rações fossem adequadamente balanceadas. Além disso, a cana-de-açúcar ensilada revelou-se como alternativa interessante em substituição a fonte de cana-de-açúcar *in natura* nos aspectos de desempenho e de economicidade.

Palavras-chave: aditivos, produção de leite, silagem de milho, comportamento ingestivo

## SUGARCANE SILAGE (*Saccharum officinarum* L.) COMPARED TO TRADITIONAL ROUGHAGE SOURCES ON THE PERFORMANCE OF HIGH PRODUCING DAIRY COWS

### Abstract

The experiment was carried out to evaluate the performance of high producing dairy cows fed with rations containing different sources of roughage. Forty eight mid lactation Holstein cows were assigned to a multiple latin square 4x4 design and the animals were allotted into 4 collective pens in the “free stall” barn, during 84-d evaluation period. The experimental periods of 21 days were divided in 14 days to adaptation and 7 days for data and sample collection. The treatments used were: fresh sugarcane, sugarcane silage inoculated with *L. buchneri*, corn silage and the mixture of corn silage and fresh sugarcane (50:50). During the collection period, samples of roughage sources, total mixed rations and orts were taking for chemical analyses, and the milk was sampled to determinate the compositions. The ingestive behavior of animal was measured over a 24-h shift during the experimental period. An aerobic stability assay was performed along with the performance trial comparing roughage sources and exclusively or mixed with concentrate by the end of the trial. Forages and the TMR were exposed to air in a temperature-controlled room. The results from the aerobic stability trial showed that inoculated sugarcane silage took longer time to start heating the material (13.25h). The corn silage rations presented low aerobic stability (3.0h), which might explain the lower dry matter intake notice when compared to the other source. The animal performance data has shown significant differences for the DM intake highest values observed for the sugarcane silage (23.5 kg/day) and the mixture of fresh sugarcane with corn silage (23.5 kg/day). All rations supported high milk yields (24.4-25.5 kg/day) which did not differ each other. The milk fat content was higher for both, the corn silage treatment (3.61%) and fresh sugarcane plus corn silage (3.48%). The ingestive behavior data suggested NDF intake following the same trend of higher DM intake across the treatments containing sugarcane silage (10.18 kg NDF/d) or the mix of roughage sources (9.36 kg NDF/d). It can be concluded that both, fresh sugarcane or sugarcane silage were able to supply nutrients to high producing animals, as long as the feeds are properly balanced. Furthermore, the sugar cane silage was exhibited as an interesting forage alternative when compared to fresh sugarcane for both, animal performance and economical profitability.

Keywords: additives, milk production, corn silage, ingestive behavior

### 3.1 Introdução

A cana-de-açúcar vem sendo utilizada durante décadas pelos produtores de leite devido a vantagens, tais como: alta produção de MS/ha, sendo reportados valores entre 80 a 150 t/ha, ponto de maturação fisiológica coincidindo com a época de escassez de forragem, alta produção de NDT/ha (15 t/ha), quando comparado a forragens tradicionais como milho (8 t/ha) (LIMA; MATOS, 1993).

Associando as vantagens da utilização da cana-de-açúcar como volumoso suplementar, as dificuldades logísticas que envolvem o uso dessa forragem na forma de capineira, torna-se compreensível o crescente interesse do uso desta planta na forma de silagem, principalmente em confinamentos indústrias e grandes fazendas.

A manutenção da cana-de-açúcar em ambientes anaeróbios, leva contudo, a altas produções de álcool, resultantes da alta susceptibilidade da planta a ação de leveduras, o que resulta em grandes perdas de MS devido à conversão de carboidratos em gases e energia despendida na forma de calor. Perdas maiores podem ainda ocorrer no cocho por uma possível recusa do animal, frente ao excesso de álcool na forragem. Kung Jr e Stanley (1982) reportaram teores de etanol em torno de 17,5% em relação à MS.

O uso de aditivos bacterianos é uma ferramenta a ser utilizada com o propósito de controlar a população de leveduras e minimizar os efeitos indesejáveis do álcool na forragem. O *L. buchneri* é uma bactéria heterolática responsável pela síntese de ácido acético, um poderoso antifúngico capaz de controlar a população de microrganismos, causando um déficit energético dentro da célula e a conseqüente quebra da “homeostase” celular. Os benefícios deste aditivo bacteriano têm sido demonstrados principalmente quanto à manutenção da estabilidade aeróbia após a abertura do silo e exposição da silagem ao ar. Ranjit e Kung Jr (2000) obtiveram estabilidade aeróbia acima de 900h para silagem de milho tratada com *L. buchneri*  $10^6$  ufc/g, enquanto a silagem não tratada apresentou estabilidade de somente 26,5h.

O processo de ensilagem visa à manutenção, e não a melhora dos aspectos nutricionais dos alimentos. A possibilidade de se fazer uso de aditivos como o *L. buchneri*, que propiciam uma melhor conservação da forragem, possibilitam também

a indagação sobre a melhoria e até a possível similaridade no desempenho de animais recebendo cana-de-açúcar *in natura* ou na forma de silagem.

A silagem de milho é tradicionalmente utilizada pelos produtores de leite. É a forragem mais utilizada para a ensilagem. Segundo Nussio et al. (2001) isso ocorre devido à composição bromatológica apresentar os requisitos necessários à confecção de uma boa silagem, como: teor de MS variando entre 30% a 35% e teor mínimo de 3% de carboidratos solúveis, ambos os fatores associados ao baixo poder tampão favorecem boa fermentação microbiana. Os autores reportaram variações no teor de proteína bruta entre 6,6% a 8,2% e digestibilidade entre 64,7% e 66,6%, características estas que comprovam elevada qualidade da forragem.

Constantemente são encontrados na literatura trabalhos avaliando o desempenho de vacas de alta produção recebendo diferentes fontes de forragem, em comparação à silagem de milho, tanto pelo fato de ser uma planta capaz de suprir a demanda nutricional desses animais, como também pelo fato de ser uma das forragens mais estudadas tanto no exterior como no Brasil. A discrepância quanto aos aspectos nutricionais entre as forragens cana-de-açúcar e milho, traz um desafio quanto ao balanceamento da dieta e a eficiência dos programas de formulação.

O presente trabalho tem por objetivo comparar o desempenho de animais de alta produção recebendo silagem de cana-de-açúcar ou fontes tradicionais de volumosos, como a cana-de-açúcar *in natura* ou a silagem de milho. Dentro dos interesses aqui trabalhados então ainda a avaliação dos efeitos das diferentes dietas sobre a composição do leite e o comportamento dos animais.

## **3.2 Desenvolvimento**

### **3.2.1 Revisão Bibliográfica**

#### **3.2.1.1 Desempenho animal com dietas a base de silagem de cana-de-açúcar**

Como o processo de ensilagem é um procedimento que visa somente a conservação das características da planta, não é de se esperar melhoras do ponto de vista nutricional, frente às baixas porcentagens de proteína e desequilíbrio mineral encontrados na própria cana-de-açúcar *in natura* (NUSSIO; SCHMIDT,

2005). Melhorias em relação à planta que deu origem a silagem só são verificadas em silagens cujo aditivo tenha a propriedade de adicionar mais nutrientes à silagem, exemplo do milho, ou da polpa cítrica em silagens de capins ou até mesmo da uréia nas silagens de cana-de-açúcar.

Além dos aspectos nutricionais que devem ser corrigidos para possibilitar um alto desempenho animal, a cana-de-açúcar usada na forma de silagem apresenta substâncias frequentemente apontadas como suspeitas por uma redução no consumo pelo animal.

A confecção de silagens de cana-de-açúcar sem aditivos capazes de controlar a população de leveduras, leva à produção de altos teores de etanol resultantes de fermentação alcoólica. Nussio e Schmidt (2005) mencionam a possibilidade de o álcool ser um agente promotor de recusa do alimento pelo animal. Alcântara et al. (1989) verificaram diminuição de 34% no consumo de cordeiros alimentados com silagem de cana-de-açúcar elaborada sem aditivos, apresentando esta o teor de etanol 6,6 vezes maior do que silagens tratadas com aditivos.

A utilização de bactérias heteroláticas, com o intuito de se aumentar as concentrações de determinados ácidos, como o ácido acético produzido pelo *L. buchneri* vem da necessidade de se aumentar a estabilidade aeróbia da forragem. Contudo em estudos anteriores houve indícios de que o aumento do ácido acético estaria relacionado à redução no consumo de MS. Inúmeros trabalhos recentes vêm demonstrando não existir a interferência do ácido sobre a ingestão voluntária em grandes ruminantes. Schmidt et al. (2004) não observaram diferença de consumo das silagens de cana-de-açúcar controle e tratadas com *L. buchneri*  $3,6 \times 10^5$  ufc/g, sendo respectivamente 6,9 kg/d e 7,03 kg/d.

A fração fibrosa representa um aspecto intrínseco à planta e favorável a restrição do consumo. O FDN, ao contrário dos carboidratos solúveis da cana-de-açúcar, apresenta baixa digestibilidade (<40%), sendo desta forma, um constituinte vegetal relacionado negativamente ao consumo (LANDELL et al, 2002). Tal fato pode ser minimizado pelo uso de agentes com capacidade hidrolítica, como a uréia, ou pelo uso de plantas geneticamente melhoradas.

Roth et al. (2005) observaram diminuição no teor de FDN em silagens de cana-de-açúcar aditivada com doses crescentes de uréia. No trabalho os autores obtiveram silagem controle, sem tratamento, com teor de FDN de 75% da MS enquanto silagens tratadas com 1% de uréia apresentaram 64,9% da MS.

Em 2002 o Instituto Agronômico de Campinas apresentou a variedade IAC86-2480, uma planta melhorada a partir de conceitos modernos de melhoramento de forragens para a produção animal, ou seja, visando não só a elevada produção de carboidratos solúveis, mas também a melhor digestibilidade da fibra. A nova variedade apresenta teor de FDN de apenas 44,18% sendo desta forma à planta com menor teor de FDN entre as variedades mais produzidas (LANDELL et al, 2002). A comparação de desempenho animal mostrou um melhora em 18% na conversão alimentar de bovinos recebendo a IAC86-2480 em relação a RB72454, uma das variedades mais produzidas no Estado de São Paulo.

### **3.2.1.2 Desempenho animal com dietas a base de cana-de-açúcar *in natura* ou silagem de milho**

Tanto a cana-de-açúcar *in natura* como a silagem de milho são fontes tradicionais de volumosos suplementares.

A cana-de-açúcar apresenta limitações do ponto de vista nutricional, relacionadas aos baixos teores de proteína e minerais, principalmente fósforo e enxofre. A necessidade de correção frequentemente é atendida pelo uso de uréia, como fonte barata de nitrogênio, e sulfato de amônio, garantindo assim a síntese de aminoácidos sulfurosos essenciais. A proporção entre N:S deve estar próxima a 12:1, sendo que na prática essa proporção é obtida com o uso de uréia e sulfato de amônio na proporção de 9:1 (NUSSIO; SCHMIDT, 2005).

Mesmo existindo a correção de cana-de-açúcar com uréia e minerais, tal procedimento não supre as altas exigências de animais em crescimento e vacas em lactação (LIMA; MATTOS, 1993). Vilela et al. (2003) compararam o desempenho de vacas mestiças recebendo cana-de-açúcar com diferentes suplementos. Os autores obtiveram baixos valores de produção de leite corrigido para 4% de gordura e de seus constituintes, proteína e gordura, quando a forragem foi corrigida somente com uréia. No mesmo trabalho os autores concluíram que o mesmo tratamento adicionado de farelo de algodão ou farelo de trigo apresentava maiores consumos diários e maiores produções de leite corrigido. De acordo com Lima e Mattos (1993) o fornecimento de proteína não degradável no rúmen, ácidos graxos de cadeia longa e amido de baixa degradabilidade ruminal podem levar a desempenhos melhores do que a simples correção da cana-de-açúcar com uréia.

O efeito do FDN da cana-de-açúcar sobre o desempenho de vacas mestiças foi estudado por Fernandes et al. (2001), que simularam o desempenho dos animais em função da variação de carboidratos, FDN e lignina e de suas respectivas digestibilidades em 15 diferentes variedades. Os autores concluíram que a cana-de-açúcar utilizada como principal volumoso da dieta levou a uma diminuição na ingestão de MS e energia, o que levou a baixa predição de produção de leite. A energia metabolizável decresceu em 24% em função do aumento de 20% no de FDN da ração.

A silagem de milho é tradicionalmente usada como fonte de volumoso suplementar. A planta de milho apresenta teores de proteína variando na ordem de 6,6% a 8,2% e digestibilidade variando entre 64,7% e 66,6%. A alta qualidade do milho se reflete em significativos ganhos de desempenho frequentemente reportados na literatura.

Dias et al. (2001) observaram maiores produções de leite em animais recebendo dietas com silagem de milho (15,23 kg/d) em comparação aos animais que receberam dietas à base de silagem de sorgo em estágio de maturação de grãos leitosos (12,55 kg/d).

O uso da silagem de milho implica em custos para o sistema de produção, já que constitui um volumoso de alto custo por tonelada de MS (R\$ 250,00). Muitos trabalhos vêm sendo publicados visando a substituição da silagem de milho por fontes de volumosos mais baratas.

Magalhães et al. (2004) avaliaram o desempenho e a viabilidade econômica da substituição de silagens de milho por cana-de-açúcar *in natura* em dietas para vacas em lactação. As substituições ocorreram na ordem de 0, 33, 66 e 100%, sendo que na medida em que se aumentava a proporção de cana-de-açúcar, foi constatada uma diminuição linear no consumo (177,9; 169,42; 165,69; e 156,8 g/kg<sup>0,75</sup>) acompanhada da diminuição de produção (24,17; 23,28; 22,10 e 20,36 kg/dia) e da receita (8,32; 7,60; 6,55 e 5,63 R\$/dia). Apesar disto os autores concluíram que a substituição em 33% ainda seria economicamente viável.

Mendonça et al. (2004) avaliaram o comportamento ingestivo de vacas holandesas recebendo dietas à base de silagem de milho (com 60% de volumoso) ou cana-de-açúcar *in natura* sendo que a última entrando em 60% ou 50% na dieta total. Os autores verificaram que as dietas contendo cana-de-açúcar levaram os animais a apresentar aumento no tempo despendido em ócio e uma redução no

consumo total de MS, sendo que esta foi maior quando a dieta apresentou 60% do volumoso na ração total.

### **3.2.2 Material e métodos**

#### **3.2.2.1 Local do experimento**

O experimento foi realizado no Departamento de Zootecnia ESALQ, em Piracicaba-SP, tendo início em 3/7/2004.

#### **3.2.2.2 Confeção das silagens e manejo da cana-de-açúcar *in natura***

Três diferentes tipos de forragens foram usadas como fonte de volumoso para os animais, sendo estas: silagem de milho, silagem de cana-de-açúcar e cana-de-açúcar *in natura*.

A silagem de milho foi confeccionada sem o uso de aditivos. A colheita foi realizada com uma colhedora acoplada ao trator, o tamanho de partículas médio foi de 1,0cm. O material foi acondicionado em silo de alvenaria do tipo trincheira. A compactação ocorreu durante tempo equivalente ao período de colheita, sendo o que o peso do trator estava dentro dos 40% do peso total de forragem trazida ao silo por hora. A massa foi coberta com lona plástica dupla face de 200 micras. Sacos de areia foram colocados sobre a lona e ao redor do silo para a vedação do processo.

A silagem de cana-de-açúcar foi confeccionada com o uso de inoculante bacteriano Lalsilcana®, constituído pela cepa *L. buchneri* 40788. De acordo com as especificações do produto, 2g foram diluídos em água para garantir a inoculação de  $5 \times 10^4$  ufc/g em uma tonelada de forragem. A solução contendo o microrganismo foi aspergida sobre a massa de forragem em solução contendo água destilada e aplicada com auxílio de bomba de baixa pressão.

A cana-de-açúcar proeminente da variedade RB72-454 de um talhão de 3º corte, foi colhida com uma colhedora acoplada ao trator e regulada para um corte de tamanho de partícula médio de 1,0 cm. A compactação do material foi realizada com os pés, o que não permitiu a deposição de camadas maiores do que 30 cm por etapa de compactação. O silo utilizado foi do tipo poço, revestido de alvenaria, com capacidade para 12 toneladas. Após o abaulamento da massa de forragem foi



realizada a vedação com lona plástica de dupla fase e lajotas de concreto substituindo os tradicionais sacos de areia, para a melhor adesão do filme plástico à massa de forragem.

A cana-de-açúcar fresca foi recebida de uma área externa cultivada com a variedade RB72-454 trazidas em feixes para o Departamento de Zootecnia em dias intercalados e somente foi picada no momento de fornecimento aos animais. A planta era picada em picadora estacionária regulada para corte de tamanho de partícula de 1,0 cm.

### 3.2.2.3 Tratamentos

Os tratamentos foram constituídos das diferentes rações fornecidas aos animais. O balanceamento das rações foi realizado com base no NRC - Gado de Leite (2001), visando permitir a produção potencial de 30 kg/dia. As rações eram isoproteicas e isoenergéticas de forma a equilibrar o potencial de produção dos diferentes tratamentos, constituindo como fonte de variação apenas o efeito causado pela origem do volumoso. Os ingredientes concentrados usados na ração foram: milho moído, polpa cítrica, caroço de algodão, farelo de algodão, farelo de soja, bicarbonato de sódio e mistura mineral (Tabela 7).

Tabela 7 – Composição de ingredientes das rações experimentais oferecidas

Ingredientes, % MS	Cana	Sil.cana	Sil.milho	Cana + Sil.milho
Cana-de-açúcar in natura	40,0	-	-	-
Silagem de cana-de-açúcar	-	40,0	-	22,51
Silagem de milho	-	-	50,0	22,51
Milho moído fino	7,99	7,99	-	-
Polpa cítrica	12,9	12,9	14,8	17,52
Caroço de Algodão	10	10	10	10
Farelo de Algodão	12	12	10	10
Farelo de soja	14,0	14,0	12,1	14,39
Bicarbonato de sódio	0,70	0,70	0,70	0,70
Premix mineral-vitamínico	2,38	2,38	2,38	2,38

Nota: Cana = Cana-de-açúcar *in natura*, Sil. Cana = Silagem de cana-de-açúcar, Sil. Milho = Silagem de Milho, Cana + Sil. Milho = Cana de açúcar in natura (50%) + Silagem de Milho (50%).

### 3.2.2.4 Animais e instalações

O ensaio de desempenho foi realizado com 48 vacas da raça Holandesa de alto potencial de produção. Os animais apresentavam em média cerca de 220 dias de lactação e receberam aplicações regulares de somatotropina bovina injetável.

Os animais foram mantidos em sistema de confinamento do tipo “free stall”, com 12 animais alojados por baia. Em cada baia havia bebedor coletivo, sistema de arrefecimento (micro pulverizadores e ventiladores), cocho coletivo e camas individuais com areia. A areia das camas era substituída constantemente e as baias limpas a cada dois dias para manter a higiene das instalações dos animais.

A sala de ordenha era localizada exatamente ao lado do confinamento evitando que os animais tivessem que se deslocar por longas distâncias. A sala de ordenha dispunha de um sistema de ordenha mecânica provida de coletores de amostra de leite e medidores de produção individual.

### **3.2.2.5 Rotina experimental**

Antes do início do período experimental, os animais receberam rações contendo silagem de milho durante 10 dias, independentemente dos tratamentos as quais fossem submetidos.

O período experimental foi de 84 dias, sendo constituído por quatro períodos de 21 dias, sendo 14 dias de adaptação e 7 dias de coleta.

A alimentação foi fornecida a vontade, duas vezes ao dia, sendo sempre permitida uma sobra de 10%. A quantidade de alimento fornecido e as sobras eram quantificadas todos os dias, sendo sempre necessários ajustes para que não houvesse sobra em excesso. Semanalmente foram efetuados ajustes quanto ao teor de MS dos alimentos, que eram repassados as planilhas de consumo, permitindo aferir a ração oferecida no período subsequente.

A distribuição da ração era realizada durante os períodos de ordenha (6:00h e 18:00h), com o uso de um vagão misturador provido de balança digital.

O manejo dos silos, tanto de cana-de-açúcar como o de milho visava à retirada de material deteriorado com a utilização de no mínimo 15 cm de camada do silo por dia e a retirada uniforme do material, reduzindo assim a superfície de contato do painel com o ar.

A cana-de-açúcar fornecida na forma de capineira foi trazida em feixes em dias intercalados, e foi picada diariamente antecedendo o momento do seu fornecimento.

Durante a semana de coleta, foram tomadas amostras diárias das rações fornecidas, das sobras e dos volumosos, e essas foram agrupadas ao final do período experimental. As amostras de leite eram coletadas 3 vezes durante a

semana, sendo que cada amostragem era feita parcialmente no período da manhã e o restante ao final da tarde. Juntamente com as amostras de leite, eram monitoradas as produções individuais dos animais.

Na mesma semana de coleta foram realizadas medidas para avaliação do comportamento dos animais, ou seja, observação durante 24 horas realizadas a cada dez minutos, em metade dos animais do experimento (24 vacas).

Durante o segundo período de avaliações amostras dos volumosos e das rações foram coletadas para a confecção de um ensaio de estabilidade aeróbia desses ingredientes e da mistura.

### **3.2.2.6 Delineamento experimental**

O delineamento experimental utilizado foi o de múltiplos quadrados latinos 4x4, sendo que os dados foram analisados segundo o procedimento GLM do programa estatístico SAS (1999). As médias foram comparadas utilizando-se o procedimento LSMEANS, com nível de significância de 5%. As vacas animais foram alocadas aos lotes levando-se em consideração critérios como: número de partições, produção de leite durante o período pré-experimental, e status fisiológico na lactação (dias em lactação) desta forma tentando-se manter a homogeneidade dentro de cada quadrado latino constituído.

### **3.2.2.7 Avaliação químico-bromatológica**

As amostras das dietas, sobras e volumosos foram secas em estufa a 60°C por 72h (SILVA, 1981) e moídas contra peneira de malha de 1mm em moinhos do tipo Wiley. As amostras processadas serviram de material para as análises bromatológicas convencionais realizadas no laboratório de bromatologia do departamento de zootecnia da USP/ESALQ.

O teor proteína foi determinado por condutividade térmica, utilizando-se o aparelho LECO® (Leco Corporation, Michigan, USA).

A porção fibrosa foi analisada quanto ao teor de fibra em detergente neutro (FDN) e teor fibra em detergente ácido (FDA) (VAN SOEST et al., 1994).

A matéria seca laboratorial foi determinada em estufa a 105 °C durante 24h (AOAC, 1990), a desidratação mais intensa permite a retirada de água residual da amostra pré-processada em estufa de 60°C (AOAC,1990).

A matéria mineral foi obtida após incineração de amostras em forno a 550 °C durante 3h (HARRIS, 1970).

O extrato etéreo foi realizado pelo contato sucessivo de uma quantidade conhecida da amostra com éter de petróleo, após esse processo o material é seco em estufa a 60°C e depois pesado em balança analítica. O peso de material recuperado é remetido ao peso inicial da amostra.

As amostras úmidas coletadas durante os últimos sete dias de cada período foram utilizadas para elaboração de um extrato segundo Kung Jr (1996). Resumidamente, 25g de amostra foram processados em 225ml de água durante 1minuto. O valor do pH do extrato de silagem foi medido em potenciômetro digital (DIGMED® -DM20). Após filtragem em papel Whatman® 54, o material recebeu 3 gotas de ácido sulfúrico 50% e foi então centrifugado durante 15 minutos a 10.000rpm. O extrato que foi armazenado em tubos eppendorff de 1,5 ml, e mantido congelado a -20°C serviu como amostra nas análises de etanol, carboidratos solúveis e ácidos graxos.

O teor de etanol foi medido usando-se um analisador bioquímico YSI 2700 Select® (Biochemistry Analyser, Yellow,OH, EUA) provido de membranas com enzimas imobilizadas, apropriada para essa determinação. Após calibrados com soluções padronizadas de etanol (2 g/L), o aparelho forneceu leitura direta de concentração em g/L.

O teor de carboidratos solúveis foi mensurado através de uma adaptação do método colorimétrico (490 nm) sugerido por Dubois, et al, (1956). A adaptação foi feita em relação a um aumento na diluição das amostras, já que silagens de cana-de-açúcar normalmente apresentam teor carboidrato muito elevado.

O teor de ácido lático foi avaliado por meio de uma adaptação do método espectrofotométrico (565 nm) de Pryce (1969). A adequação da curva padrão 10 vezes maior do que a sugerida foi necessária, já que a alíquota de amostra a ser utilizada foi muito pequena.

### **3.2.2.8 Ensaio de estabilidade aeróbia**

Amostras de 4 kg das rações e dos volumosos exclusivos foram usadas para confeccionar o ensaio de estabilidade aeróbia, contemplados com 3 repetições cada, totalizando 24 unidades experimentais e 8 tratamentos.

O ensaio de estabilidade aeróbia foi realizado em uma sala equipada com sistema de controle de temperatura permitindo variação de 0,5 °C em relação à temperatura média de 24°C.

As amostras foram acomodadas em baldes plásticos abertos, sem que houvesse compactação da massa. Um sensor de temperatura “datalogger”, instalado no centro geométrico de cada balde, foi calibrado para aferir a temperatura a cada duas horas. Com o auxílio de um software (Dickson<sup>®</sup>, Addison, USA) os dados foram armazenados e recuperados ao final da avaliação.

A estabilidade foi avaliada quanto ao tempo necessário para se atingir a elevação de 2°C as silagens em relação à variação da temperatura ambiente (expressa em horas) (KUNG JR, 2000). Ainda em relação à estabilidade, foi calculado o acúmulo térmico de 5 e 10 dias (ADITE-5 e ADITE-10), da diferença média diária entre a temperatura das silagens expostas ao ar e a temperatura ambiente (expressa em °C), o tempo para o início da elevação da temperatura (expresso em h), a temperatura máxima (expressa em °C) e o tempo para se atingir a temperatura máxima (expresso em h).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo que os dados foram analisados com o procedimento GLM do programa estatístico SAS (1999). As médias foram comparadas utilizando-se o recurso LSMEANS, com nível de significância de 5%. Os baldes foram alocados de maneira aleatória dentro da sala de estabilidade.

### **3.2.2.9 Avaliação do comportamento ingestivo das vacas**

A avaliação do comportamento animal teve por objetivo verificar diferenças no comportamento ingestivo do animal em função da ração recebida.

Neste experimento foram avaliados seis dos doze animais contidos em cada baia, o que determinou um total de 24 animais avaliados por período experimental.

Foram realizados quatro períodos de avaliação, dessa forma os animais foram avaliados em todas as rações oferecidas.

Os 24 animais foram observados durante 24h, em intervalos de 10 minutos. Os períodos de avaliação do comportamento ingestivo sempre ocorreram durante a semana de coleta de dados para o experimento de desempenho.

Dentre as variáveis observadas estão os períodos de ócio com o animal em pé ou deitado, período de ruminação com o animal em pé ou deitado, ingestão da ração (alimentação) e consumo de água. Os parâmetros estabelecidos com base nessas variáveis foram: tempo total de ingestão de água, de alimentação, em ócio (soma do período de ócio com animal em pé ou deitado), ruminando (soma do período de ruminação com animal em pé ou deitado), mastigando (soma do período alimentação com o período gasto ruminando), consumo médio diário, taxa de ingestão (tempo de alimentação/ consumo médio diário), taxa de ruminação (tempo ruminando/ consumo médio diário), taxa de mastigação (tempo de mastigação/ consumo médio diário) taxa de ingestão de FDN (tempo de alimentação/ consumo de FDN médio diário).

O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino 4x4, sendo que os dados foram analisados segundo procedimento GLM do programa estatístico SAS (1999). As médias foram comparadas utilizando-se o recurso LSMEANS, com nível de significância de 5%.

### **3.2.2.10 Desempenho dos animais**

O desempenho dos animais foi avaliado durante a semana de coleta de dados. O consumo foi obtido pela subtração da quantidade de MS restante no cocho da quantidade de matéria seca fornecida na ração. As medidas de fornecimento e sobra foram realizadas todos os dias, bem como a amostragem para verificação do teor de MS dos ingredientes, rações e sobras.

A produção de leite foi computada individualmente, com base nos medidores de produção automáticos acoplados ao sistema de ordenha. As medições foram realizadas três vezes na semana de coleta, em dias intercalados e nos dois horários de ordenha.

Os parâmetros avaliados para o desempenho dos animais foram: ingestão diária de MS (kg/d), produção diária de leite (kg/d), produção corrigida para 4% de

gordura (kg/d), eficiência alimentar levando-se em consideração a produção de leite corrigida para 4% (kg leite corrigido/kg alimento ingerido).

### **3.2.2.11 Composição do leite**

As amostras de leite coletadas durante a semana foram enviadas para o Laboratório da clínica do Leite do Departamento de Zootecnia da USP/ESALQ para avaliação de parâmetros de composição. Foram realizadas as seguintes análises: Teor de proteína no leite, teor de gordura, teor de lactose, teor de sólidos e sólidos não gordurosos.

### **3.2.3 Resultados e discussão**

#### **3.2.3.1 Avaliação da estabilidade aeróbia dos volumosos e das dietas**

Os dados relacionados a determinação da estabilidade aeróbia estão apresentados na Tabela 8.

Para a variável estabilidade aeróbia, que considera o tempo necessário para o acréscimo de 2 °C na temperatura da silagem exposta ao ar em relação à temperatura ambiente, adotando-se o conceito proposto por Kung Jr (2000) pode ser constatado que a silagem de cana-de-açúcar apresentou maior período de estabilidade em relação aos demais volumosos, sendo que as 13,25h de estabilidade obtidas diferem significativamente da média de estabilidade obtida pelos outros volumosos (3,16h). De maneira geral, as rações apresentaram maior estabilidade em relação aos volumosos avaliados exclusivamente, com exceção da ração contendo silagem de milho que resultou em valores de estabilidade semelhantes ao da silagem exclusiva.

Siqueira et al. (2004), verificaram aumento de estabilidade aeróbia em silagens de cana-de-açúcar inoculadas com *L. buchneri*  $5 \times 10^4$  ufc/g, (60h), o que representou um aumento de 46% em relação à silagem controle sem aditivo.

Pedroso et al. (2005) também relataram o aumento de estabilidade aeróbia em silagens de cana-de-açúcar tratadas com *L. buchneri* inoculadas em  $5 \times 10^4$  ufc/g. Houve aumento de estabilidade aeróbia de 11% em relação à silagem controle, sendo que o tratamento com *L. buchneri* apresentou estabilidade de até 72h. Os

autores mencionaram que a estabilidade aeróbia esta sujeita a inúmeros fatores, sendo desta forma comum observar diferentes intensidades no efeito dos aditivos.

Toledo Filho et al. (2004) obtiveram valores de estabilidade próximos ao obtido no presente experimento, e observaram 14,4h de estabilidade aeróbia na silagem de cana aditivada com *L. buchneri*  $5 \times 10^4$  ufc/g. No mesmo trabalho foram também avaliadas as estabilidades de silagens de cana-de-açúcar aditivadas e misturadas a ingredientes concentrados frequentemente utilizados como constituintes de rações. Os autores verificaram que de maneira geral os tratamentos contendo os ingredientes concentrados apresentaram maior estabilidade aeróbia (55,8h) em relação a avaliação dos volumosos exclusivos (19,2h). A adição dos ingredientes concentrados ao tratamento contendo *L. buchneri* levou a estabilidade de 14,4h para um total de 96h. De acordo com os autores os concentrados alteram o teor de MS do meio, desta forma podendo interferir na pressão osmótica o que poderia promover a inibição do desenvolvimento de microrganismos aeróbios e consequentemente diminuindo os efeitos deletérios desses na silagem.

O tempo para elevação de temperatura foi baixo para todos os tratamentos avaliados no presente estudo (Tabela 8). O tratamento que mais demorou para iniciar o aquecimento foi o tratamento contendo a mistura de volumosos, cana *in natura* mais silagem de milho, com apenas 2,41h foi detectada uma variação progressiva de  $0,1^{\circ}\text{C}$ .

Os valores encontrados para o tempo necessário para iniciar o aquecimento diferem muito dos valores encontrados frequentemente na literatura, Junqueira (2006) avaliando silagens de cana-de-açúcar com diferentes aditivos observou aumento na temperatura das silagens inoculadas com *L. buchneri*  $5 \times 10^4$  ufc/g somente após 132h de exposição ao ar. Isso pode ser explicado ao menos em parte nos diferentes experimentos. Os sensores digitais podem registrar variações de temperatura da ordem de  $0,1^{\circ}\text{C}$ . A avaliação com equipamentos mais precisos faz também com que a constatação de início do aquecimento se diferencie das variáveis relacionadas à temperatura máxima, ou tempo necessário para atingir a temperatura máxima. Esse fato pode ser confirmado pela baixa correlação existente entre o tempo necessário para o início da elevação e os valores observados para temperatura máxima e tempo para temperatura máxima (Tabela 9).

Os valores relativos a temperatura máxima são apresentados na tabela 8. A temperatura máxima ou as medidas que levam em consideração a variação de



temperatura em relação à temperatura ambiente (ADITE-5 E ADITE-10), consistem em medidas indiretas para estimar a perda de energia imposta ao sistema pela ação deletéria de microrganismos aeróbios. Pelos dados observados na tabela 8 a menor temperatura máxima foi obtida com a silagem de cana-de-açúcar (42,15°C) seguida pela cana-de-açúcar *in natura* (44,43°C), contudo tal comportamento não foi observado quando esses volumosos foram avaliados em mistura com os ingredientes concentrados. A maior temperatura registrada foi para a ração contendo silagem de milho (50,93°C), embora o tempo necessário para se atingir tal valor tenha sido um dos maiores (133,33h), o que revela uma lenta ascensão da temperatura ao pico. As rações contendo cana-de-açúcar e silagem de milho como volumosos exclusivos também demonstraram uma lenta ascensão da temperatura até o pico máximo, sendo 153,62h e 127,58h respectivamente.

Quanto ao tempo para se atingir a temperatura máxima é visto que os valores apresentados para os volumosos exclusivamente (58,56h), na tabela 8, são menores que os observados para as rações (109,65h), com exceção da silagem de milho esse fato sugere que a mistura de ingredientes em ração completa pode funcionar como estratégia para evitar o aquecimento dos volumosos quando ofertado no cocho dos animais, como sugerido por O'Kiely et al. (2002).

Os valores para variável temperatura máxima são similares aos relatos de Junqueira (2006) que obteve 41,75 °C como sendo a temperatura máxima da silagem de cana-de-açúcar inoculada com *L. buchneri*, contudo esse valor foi atingido após 102h do início do ensaio. O maior tempo necessário para se atingir a temperatura máxima associado a menor disponibilidade de carboidratos solúveis para o uso das populações pioneiras de microrganismos aeróbios. A autora ainda reportou existir cerca de 6,2% de carboidratos solúveis residuais na silagem após a abertura do silo, o que representa um baixo teor se comparado aos valores obtidos no atual experimento, de 16,10% (Tabela 10). Outro fator que poderia reduzir a velocidade de utilização dos carboidratos seria o maior teor de ácido acético típico das silagens inoculadas com *L. buchneri*, contudo esse dado é dificilmente relatado na literatura disponível.

Toledo Filho et al. (2004) também observaram aumento do tempo (45,6%) para se atingir a temperatura máxima quando compararam as variáveis avaliadas em volumosos exclusivos ou misturados aos ingredientes concentrados. No presente

experimento essa expansão no tempo para atingir a máxima temperatura foi de 46,8%.

A silagem de milho exclusiva (127,58h) não apresentou diferença significativa em relação a ração contendo da própria (133,33h) para a variável tempo necessário para se atingir a temperatura máxima (Tabela 8). A ausência de benefício com a adição de ingredientes concentrados a silagem de milho se deu pelo elevado tempo observado para alcançar a temperatura máxima no volumoso exclusivo (127,30h). A maior lentidão para atingir a temperatura máxima na silagem de milho é possivelmente explicada pelo baixo teor de carboidratos solúveis residuais nessa forragem (Tabela8). Com isso, o aquecimento da massa nesse volumoso depende então de estágios mais avançados de deterioração, quando os microrganismos começam a fazer uso de carboidratos mais complexos que os monossacarídeos e dissacarídeos constituintes da fração solúvel.

A dependência de fontes de carboidratos menos solúveis ou um possível efeito inibitório dos ingredientes concentrados sobre o desenvolvimento microbiano poderia sugerir a ocorrência de valores de temperatura máxima mais tardios. Esse fato pode ser constatado pela alta correlação existente entre as variáveis temperatura máxima e tempo para se atingir a temperatura máxima e o ADITE-10 (tabela 9).

Os dados de ADITE-5 e ADITE-10 estão apresentados na Tabela 8. Nota-se que os maiores valores de ADITE-10 estão justamente relacionados aos tratamentos com valores mais tardios para a variável temperatura máxima. O acúmulo da diferença média, entre a temperatura ambiente e a temperatura das silagens, nos 10 dias de avaliação, aconteceu mais intensamente quando houve o aumento tardio da temperatura, caso contrário o aquecimento precoce deveria aumentar o valor de ADITE-5. Os valores médios para ADITE-5 e ADITE-10 foram de 74,68°C e 148,69°C respectivamente. Ambos ADITES foram menores para a silagem de cana-de-açúcar, tanto na forma exclusiva, como na ração com concentrados (60,37°C e 115,42°C, respectivamente).

Os dados obtidos condizem com os valores freqüentemente encontrados na literatura. Junqueira (2006) obteve valores médios de ADITE-5 e ADITE-10 em torno de 43,6°C e 151,5°C, sendo que para silagem de cana-de-açúcar tratada com *L. buchneri* os valores foram de 83,50°C e 201,25°C.

Valores menores de ADITE-5 em silagens de cana-de-açúcar inoculadas com *L. buchneri* são encontrados na literatura. Pedroso (2003) observou valores de 25°C enquanto Siqueira et al. (2004) observou valores de 14,2°C.

A grande variação na magnitude de valores relatados para ADITE-5 e ADITE-10 na literatura, provavelmente se deve a variabilidade nas condições ambientais ocorridas durante a conclusão desses ensaios. Fatores como a precisão de controle da temperatura do local da avaliação, época do ano da avaliação e frequência de tomada de dados são mandatórios para a grandeza dos valores de ADITE gerados.

Tabela 8 - Estabilidade aeróbia das silagens de cana-de-açúcar inoculadas com aditivos químicos, microbianos e associações de aditivos

Variáveis	TRATAMENTOS								Média	EPM
	Volumosos				Rações					
	Sil.cana	Cana	Cana + sil.milho	Sil.milho	Sil.cana	Cana	Cana + Sil.milho	Sil milho		
EA, h	13,25 <sup>b</sup>	4,33 <sup>c</sup>	3,58 <sup>c</sup>	1,58 <sup>c</sup>	23,83 <sup>a</sup>	11,37 <sup>b</sup>	15,66 <sup>b</sup>	3,00 <sup>c</sup>	9,57	1,49
TIE, h	0,87 <sup>c</sup>	1,33 <sup>c</sup>	2,41 <sup>a</sup>	1,50 <sup>bc</sup>	1,16 <sup>c</sup>	1,62 <sup>abc</sup>	2,16 <sup>ab</sup>	1,00 <sup>c</sup>	1,51	0,27
TMáx, °C	42,15 <sup>d</sup>	44,43 <sup>c</sup>	48,43 <sup>b</sup>	48,56 <sup>b</sup>	46,70 <sup>b</sup>	47,65 <sup>b</sup>	46,80 <sup>b</sup>	50,93 <sup>a</sup>	46,95	0,68
TTmáx, h	43,50 <sup>d</sup>	33,91 <sup>d</sup>	29,25 <sup>d</sup>	127,58 <sup>ab</sup>	94,83 <sup>bc</sup>	153,62 <sup>a</sup>	56,83 <sup>cd</sup>	133,33 <sup>ab</sup>	84,10	14,81
ADITE-5, °C	60,37 <sup>e</sup>	77,91 <sup>cd</sup>	84,67 <sup>ab</sup>	88,20 <sup>a</sup>	77,53 <sup>cd</sup>	81,09 <sup>bc</sup>	74,52 <sup>d</sup>	53,11 <sup>f</sup>	74,68	1,50
ADITE-10, °C	115,42 <sup>e</sup>	131,03 <sup>d</sup>	143,41 <sup>c</sup>	158,99 <sup>b</sup>	158,13 <sup>b</sup>	170,76 <sup>a</sup>	163,71 <sup>ab</sup>	148,08 <sup>c</sup>	148,69	2,56

Nota: Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (P<0,05). NS = não significativo, \* (P<0,05), \*\* (P<0,01). EA = estabilidade aeróbia, TIE = tempo para início de elevação da temperatura. TMáx = Temperatura máxima, TTmáx = tempo necessário para se atingir a temperatura máxima, ADITE-5 e ADITE-10 = acúmulo térmico entre a diferença média diária da temperatura das silagens expostas ao ar e a temperatura ambiente em 5 e 10 dias, PMS = perda de matéria seca durante 10 dias de exposição ao ar.

Tabela 9 – Coeficiente de correlação de parâmetros de estabilidade aeróbia dos volumosos e das rações totais

	EA (h)	TIE (h)	TMáx (°C)	TTmáx (h)	ADITE-5	ADITE-10
EA (h)	1,00	-0,095	-0,383	-0,009	-0,076	0,157
TIE (h)		1,00	0,201	-0,224	0,463*	0,270
TMáx (°C)			1,00	0,520*	0,097	0,628**
TTmáx (h)				1,00	-0,028	0,599*
ADITE-5					1,00	0,453*
ADITE-10						1,00

Nota: \* = (P<0,05), \*\* = (P<0,001), EA = estabilidade aeróbia, TIE = tempo para elevação da temperatura, TMáx = Temperatura máxima, TTmáx = tempo necessário para se atingir a temperatura máxima, ADITE-5 e ADITE-10 = acúmulo da diferença média diária entre a temperatura das silagens expostas ao ar e a temperatura ambiente em 5 e 10 dias.

### 3.2.3.2 Avaliação da composição bromatológica

Tabela 10 - Avaliação bromatológica dos volumosos, rações oferecidas e sobras observadas durante o período experimental

Variáveis	Tratamentos (Forragens oferecidas)					
	Sil.cana	Cana	Cana+ Sil.milho	Sil.milho	DP	Amplitude
MS (%)	31,65	32,19	28,72	29,93	1,59	3,47
MM (% MS)	3,15	1,68	2,91	4,17	1,02	1,47
PB (% MS)	3,25	2,79	5,41	8,15	2,45	5,36
FDN (% MS)	53,48	52,38	53,78	51,13	1,20	2,65
FDA (% MS)	30,52	30,31	32,35	29,91	1,08	2,44
E.E (%MS)	1,12	0,70	1,56	2,42	0,73	1,72
Etanol (% MS)	0,45	ND	ND	ND	ND	ND
Ác. Lático (% MS)	3,08	ND	2,57	4,21	0,84	1,64
pH	3,59	6,8	4,05	3,85	0,32	0,73
CHO Solúveis (% MS)	16,10	25,71	20,35	2,59	9,87	23,12
Tratamentos (Rações experimentais - Oferecidas)						
	Sil.cana	Cana	Cana+Sil.milho	Sil.milho	DP	Amplitude
MS (%)	48,29	48,15	45,00	45,11	1,83	3,29
MM (% MS)	4,93	4,45	5,71	7,29	1,24	2,84
PB (% MS)	13,96	15,01	15,86	16,09	0,97	2,13
FDN (% MS)	41,81	38,63	39,89	39,63	1,33	3,18
FDA (% MS)	27,73	23,91	27,07	25,45	1,72	3,82
E.E (%MS)	3,80	3,37	3,60	4,38	0,43	1,01
pH	4,89	6,78	4,71	4,64	1,02	2,14
Tratamentos (Rações experimentais - Sobras)						
	Sil.cana	Cana	Cana+Sil.milho	Sil.milho	DP	Amplitude
MS (%)	44,33	45,24	43,93	41,90	1,41	3,34
MM (% MS)	5,56	4,96	5,54	6,08	0,46	1,12
PB (% MS)	8,56	9,55	10,28	11,24	1,13	2,68
FDN (% MS)	49,51	50,27	50,98	47,29	1,60	3,69
FDA (% MS)	31,62	31,82	33,31	32,29	0,75	1,69
E.E (%MS)	4,29	4,40	3,82	2,24	1,00	2,16
pH	4,75	5,19	5,39	5,07	0,27	0,64

Os dados referentes a avaliação bromatológica dos volumosos, rações oferecidas e sobras estão apresentados na Tabela 10.

Quanto as fontes de cana-de-açúcar utilizadas, constata-se que mesmo se utilizando de culturas colhidas em diferentes épocas e de variedades diferentes, a cana-de-açúcar *in natura* não apresentou grandes diferenças em relação a silagem de cana-de-açúcar nos parâmetros avaliados, com exceção da matéria mineral que foi maior para o volumoso na forma de silagem. As diferenças observadas quanto ao teor de carboidratos das duas fontes de cana-de-açúcar são resultantes da utilização de carboidratos solúveis pelos microrganismos contidos no material ensilado; o uso de aditivos microbianos pode inclusive acentuar essa redução, como observado por Driehuis et al. (2001). A composição média obtida para as fontes de cana-de-açúcar estão de acordo com a literatura consultada (ALCÂNTARA et al, 1989; PEDROSO,

2003; KUNG; STANLEY, 1982). Alcântara et al. (1989) trabalhando com tratamentos a base de cana-de-açúcar *in natura* e silagem de cana-de-açúcar controle, sem aditivos, obtiveram valores similares para os teores de matéria seca, proteína bruta e matéria mineral entre os tratamentos, sendo o último parâmetro numericamente maior para o volumoso ensilado. As diferenças entre os teores de carboidrato também são frequentemente reportadas na literatura. Pedroso (2003) obteve valores de 15,1% de MS para carboidratos solúveis em silagens de cana-de-açúcar tratadas com *L. buchneri* e ensiladas em silo do tipo poço, assim como ocorrido no presente estudo. O autor reportou que a cana fresca que deu origem a silagem continha 26,4% de carboidratos. A concentração de 3,08% MS de ácido láctico na silagem de cana-de-açúcar está inserida dentro da amplitude de variação relatada por Kung Jr e Stanley (1982). Contudo, os autores verificaram que silagens confeccionadas com plantas com tempo de crescimento entre 12 e 15 meses apresentaram teores de ácido láctico variando entre 5,65% e 4,33%, e no presente experimento a menor concentração reportada na Tabela 10 pode ser justificada pelo consumo de ácido láctico ocasionado pelo microrganismo *L. buchneri* inoculado a silagem. O teor de etanol verificado para silagem de cana-de-açúcar esteve contido entre os valores relatados por Pedroso (2003) (0,29%) e Junqueira (2006) (0,83%) em condições experimentais similares.

A avaliação químico-bromatológica da silagem de milho apresentou-se concordante com os valores frequentemente encontrados na literatura (ROSA et al 2004; ABREU et al 2004; ROTH et al 2004). É possível se observar na tabela 10 a diferença qualitativa da silagem de milho, é importante ressaltar o maior percentual de proteína em relação a silagem de cana-de-açúcar e cana-de-açúcar *in natura*.

Rosa et al (2004) avaliando silagens de diferentes híbridos de milho observaram teores de FDN e FDA similares aos apresentados na tabela 10, sendo 55,76% e 28,92% respectivamente. Os autores também reportaram valores similares para o teor de matéria seca (30,69%) e matéria mineral (3,61%). Valores para o teor de proteína são encontrados na literatura variando entre 9,74% (ROSA, 2004) até críticos 5,25% Oliveira et al. (2003). Os valores de ácido láctico encontrados na literatura internacional para silagens de milho são relativamente reduzidos, assim como o observado na Tabela 10. Ranjit e Kung Jr (2000) obtiveram valor de ácido láctico 7,78% MS em silagens de milho controle, enquanto Nishiro (2003) obteve 6,41% MS.

Os resultados observados para a mistura constituída de cana-de-açúcar *in natura* e silagem de milho, conforme esperado, mantiveram-se intermediárias aos valores observados para esses dois volumosos individualmente.

As variações nos parâmetros observados para as rações completas decorrem, em grande parte, da contribuição dos ingredientes concentrados. O aumento significativo no teor de matéria seca em todas as rações experimentais ganha importância relativa, pois poderia justificar o lento aquecimento destas em relação aos volumosos (TOLEDO FILHO et al. 2005). A baixa amplitude existente entre os parâmetros, como teor proteína, colaboram para constatação do equilíbrio entre os tratamentos de forma a oferecer potencial de produção de leite equivalente.

O material recusado (sobras) pelo animal foi caracterizado pelo maior teor de FDN e FDA para todos os tratamentos verificados. As maiores partículas encontradas nas silagens de milho e, constantemente recusadas pelos animais, eram aquelas formadas pelo sabugo do milho, de acordo com Nussio et al. (2001) essa fração pode representar cerca de 13,6% da planta inteira e apresenta cerca de 52,3% de digestibilidade. No caso de silagens de cana-de-açúcar, ou cana de açúcar *in natura* o material recusado normalmente era constituído principalmente de partículas de colmo de maior tamanho. Ao analisar a tabela 10 constata-se ter ocorrido certo grau de seleção dos ingredientes concentrados, mesmo considerando que as rações experimentais tenham sido misturadas mecanicamente pelo período mínimo de 5 minutos da oferta aos animais. A seleção ocorreu com maior intensidade na ração contendo cana-de-açúcar *in natura* e em menor intensidade nas silagens tanto de milho como de cana-de-açúcar. A menor capacidade de estratificação de ingredientes e seleção pelos animais tem sido observada em rações a base de cana-de-açúcar (MENDES, 2006) constituído em benefício dessa ração.

### **3.2.3.3 Avaliação do desempenho dos animais e composição do leite**

A ingestão de MS pelos animais (Tabela 11) foi maior para os tratamentos silagem de cana-de-açúcar e a associação cana-de-açúcar *in natura* mais silagem de milho. O tratamento com base na cana-de-açúcar *in natura* apresentou consumo intermediário, sendo o tratamento com silagem de milho o de menor ingestão relativa. Mesmo existindo variação na ingestão entre os animais, esse valor esteve

acima da ingestão de 21,4 kg de MS predita pelo NRC - Gado de Leite (2001). Não existem trabalhos disponíveis na literatura comparando os tratamentos silagem de cana-de-açúcar e a forragem *in natura*. Os valores de ingestão foram maiores do que a maioria dos trabalhos frequentemente encontrados na literatura (MENDONÇA et al., 2003; VILELA et al., 2003); isso decorre do fato das rações a base de cana-de-açúcar ou sua silagem, em geral, serem posicionadas para animais com produção de leite potencialmente inferior.

Tabela 11 – Desempenho de animais e composição do leite de vacas alimentadas com ração contendo diferentes fontes de volumosos

Variáveis	Sil.cana	Tratamentos		
		Cana	Cana + Sil. milho (50:50)	Sil.milho
Ingestão de MS, kg/dia	23,5 <sup>a</sup>	22,3 <sup>b</sup>	23,5 <sup>a</sup>	21,3 <sup>c</sup>
Produção de leite, kg/dia	24,4	24,6	25,2	25,5
PCG 4%, kg/dia	22,1	22,10	23,0	24,0
Eficiência, kg/kg MS	0,95 <sup>b</sup>	0,99 <sup>b</sup>	0,99 <sup>b</sup>	1,13 <sup>a</sup>
Gordura, g/kg	33,8 <sup>b</sup>	33,4 <sup>b</sup>	34,8 <sup>ab</sup>	36,1 <sup>a</sup>
Proteína, g/kg	31,7	32,4	32,2	31,7
Sólidos totais, g/kg	116	116	118	118
Lactose, g/kg	42,6	42,7	42,6	42,4
Sólidos Não Gordurosos, g/kg	82,5	83,3	83,0	82,4

Nota: Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ )

As produções de leite apresentadas na tabela 11 demonstram não existir diferenças entre os tratamentos, mesmo quando a produção foi corrigida para 4% de gordura.

Mendonça et al. (2004) avaliaram o desempenho de vacas holandesas recebendo rações com base em cana-de-açúcar *in natura*, e observaram que o consumo de 15,8 kg de MS em uma ração com 50% do volumoso levou a produções de leite de 20,1 kg diários. Vilela et al. (2003), trabalhando com rações com baixa quantidade de concentrado (<20%) sendo oferecidas a animais de baixa produção constataram o maior consumo, como sendo 7,85 kg de MS relativo a produções médias de 7,35 kg de leite diários. Valvasori et al. (1998) mensuraram a ingestão de MS das raças Holandesas e Pardo-suiça recebendo silagem de cana-de-açúcar não aditivadas e constataram o consumo de MS de 14,05 kg/d correspondente a produção de leite de apenas 11,78 kg/d.



Os tratamentos que receberam silagem de milho, tanto o tratamento exclusivo, como o adicionado com cana-de-açúcar *in natura*, apresentaram desempenho que não está totalmente de acordo com os dados observados em outros trabalhos na literatura. Alguns autores reportam existir aumento no consumo e na produção de leite em função do aumento da quantidade de silagem de milho na ração, principalmente quando comparado a dietas contendo cana-de-açúcar como fonte de volumoso (MAGALHÃES et al., 2004; CORRÊA et al., 2003).

Magalhães et al. (2004) avaliaram o desempenho de vacas holandesas e mestiças em função da substituição da silagem de milho por cana-de-açúcar *in natura* na ração e os autores concluíram existir redução linear na produção dos animais em função do aumento da participação da cana-de-açúcar. De acordo com os relatos, a substituição em 0%, 33,33% e 100% por cana-de-açúcar gerou redução na produção de leite (24,17, 23,28 e 20,36 kg/d) acompanhada de redução na ingestão de matéria seca, (20,03, 19,07 e 17,26 kg/d) respectivamente.

Corrêa et al. (2003) compararam o desempenho de vacas holandesas alimentadas com rações contendo silagem de milho de diferentes texturas ou cana-de-açúcar *in natura*. Os autores observaram maiores ingestões e produção de leite para os animais recebendo rações com silagem de milho, sendo a ingestão de MS de 23,0 kg/d contra 21,5kg/d e produção de leite de 34,2 kg/d contra 31,9 kg/d para os tratamentos contendo silagem de milho e cana-de-açúcar respectivamente.

Deve-se ressaltar que, embora a produção com base em cana-de-açúcar tenha sido inferior aquela observada com silagem de milho, a diferença foi pouca pronunciada e o patamar de produção de leite com base na cana-de-açúcar pode ser considerado muito favorável. Esse trabalho demonstra o grande potencial de exploração de rações a base de cana-de-açúcar mediante ao adequado balanceamento das rações e, em geral, com vantagens econômicas.

Pires et al. (1999) trabalhando com vacas holandesas verificaram não existir diferenças de produção de leite e ingestão de matéria seca pelo animal quando foram feitas substituições de 50% da silagem de milho por cana-de-açúcar, embora a substituição total da silagem de milho tenha promovido a redução de tais parâmetros.

Costa et al. (2005) avaliando o desempenho produtivo de vacas leiteiras alimentadas com diferentes proporções de cana-de-açúcar e concentrado, ou silagem de milho, observaram existir redução na ingestão de MS pelos animais e na

produção de leite quando a participação percentual dos volumosos era a mesma na ração. Contudo essas diferenças não foram observadas com um decréscimo de 20% na participação de cana-de-açúcar em relação à silagem de milho. De acordo com os dados, a ingestão de MS dos animais e a produção de leite para o tratamento contendo 60% de silagem de milho foram de 19,32 kg/d e 20,81 kg/d respectivamente, enquanto no tratamento contendo 40% de cana-de-açúcar *in natura* os valores foram de 19,81kg/d e 19,78 kg/d. Os dados de Costa e colaboradores se aproximam da situação apresentada no presente trabalho, já que também não houve diferenças entre produção dos animais recebendo as silagens de milho ou cana-de-açúcar *in natura* (Tabela 11). Como pode ser observado na tabela 7 houve alteração da participação de volumosos nas diferentes rações sendo que a cana-de-açúcar *in natura* contribuiu com 40% do total de matéria seca enquanto a silagem de milho participou em 50% do total de MS.

O teor e a produção de gordura no leite foram diferentes entre os tratamentos avaliados (Tabela 11), mas a magnitude destas diferenças não chegou a alterar as produções quando essas foram padronizadas em função do teor de gordura. Costa et al. (2005) não observou diferenças na produção de leite corrigida entre rações contendo 60% de silagem de milho e rações contendo 40% de cana-de-açúcar *in natura*, contudo, tratamentos que se apresentavam inferiores quanto a produção de leite sem correção se tornaram estatisticamente semelhantes quando padronizados para 3,5% de gordura.

A síntese de gordura no leite pode ser alterada em função da concentração de ácido acético advindo da fermentação de fibras. Os maiores teores de gordura constatado nas rações contendo silagem de milho no presente trabalho (Tabela 11), possivelmente, se fundamentam no fato da fibra de silagem de milho apresentar maior digestibilidade quando em comparação com a fibra da cana-de-açúcar. Antoniali et al. (2003) avaliando cultivares de milho para silagem reportaram valores digestibilidade do FDN de 20 híbridos de milho, variando entre 57,36% e 60,65%. Mizubuti et al. (2002) reportaram digestibilidade de 50,89% do FDN da silagem de milho fornecida a ovinos.

No caso da cana-de-açúcar Nussio e Schmidt. (2005) reportaram a baixa digestibilidade de porções fibrosas de cana-de-açúcar, sendo os valores de digestibilidade do FDN menores do que 40%. Lucci et al. (2003) reportaram valores

de digestibilidade de FDN para cana-de-açúcar *in natura* e silagem de cana-de-açúcar da ordem de 37,5% MS e 43,1% MS respectivamente.

Outros fatores interferem na fermentação da fibra e conseqüentemente na síntese de gordura. Por exemplo, Pires et al. (1999) trabalhando com substituições de silagem de milho por cana-de-açúcar *in natura* verificou menor teor de gordura e menor eficiência quando o único volumoso fornecido aos animais foi silagem de milho. Com a substituição de 50% da silagem de milho por cana-de-açúcar os autores verificaram o aumento no pH ruminal, ao qual foi atribuída a melhoria do ambiente ruminal, a melhor fermentação e aumentos de 8,6% na concentração de ácido acético no rúmen.

O teor de proteína, sólidos totais, lactose e sólidos não gordurosos variaram em pequena amplitude, resultando em similaridade entre os valores obtidos para os diferentes tratamentos, estando compreendidos dentro da amplitude de teores reportados para a composição de leite na literatura (PIRES et al., 1999; COSTA et al., 2005).

Pires et al. (1999) trabalhando com rações contendo silagem de milho e cana-de-açúcar *in natura* observaram teores de gordura de 2,98% e 3,59% respectivamente, e teores de proteína de 2,94% e 3,06%. Costa et al. (2005) observaram teores de 3,61% gordura no leite de animais recebendo rações a base de silagens de milho e de 3,45% para aqueles alimentados com rações contendo cana-de-açúcar. Os teores de proteína bruta foram de 3,65% e 3,63%, respectivamente, para os mesmos tratamentos mencionados. Segundo Frandson et al. (2003) a composição do leite pode ser alterada em função da ração. Teores de gordura no leite são afetados pelo aumento de energia disponibilizada ao animal pela ração. A concentração de proteína do leite pode ainda ser minimamente modificada pelo aumento da concentração de proteína na ração ou pela maior eficiência energética do metabolismo animal. Os autores ressaltaram que os outros componentes do leite sofrem variação menos sensíveis em comparação ao teor de gordura ou proteína.

Os dados de eficiência alimentar estão apresentados na Tabela 11 e de acordo com os resultados é possível constatar que os tratamentos contendo 50% ou 100% de silagem de milho como fonte de volumoso apresentaram valores estatisticamente maiores. A eficiência alimentar é resultado da relação entre produção de leite corrigida e a ingestão de matéria seca. Desta forma os tratamentos contendo silagens de milho, com maiores teores de gordura no leite e produções de leite

numericamente maiores apresentaram-se mais eficientes, embora as rações formuladas com base em cana-de-açúcar tenham sido mais econômicas.

### 3.2.3.4 Avaliação do comportamento ingestivo dos animais

Os dados de comportamento ingestivo estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Ingestão de matéria seca (IMS), ingestão de fibra em detergente neutro (FDN), comportamento ingestivo e tempos relativos de ingestão, ruminação e mastigação em vacas holandesas recebendo rações com diferentes fontes de volumosos

Variáveis	Tratamentos				EPM
	Sil. Cana	Cana	Cana+sil. Milho	Sil. milho	
IMS, kg MS/dia	24,35	22,59	23,46	21,29	0,785
IFDN, kg MS/dia	10,18 <sup>a</sup>	8,72 <sup>bc</sup>	9,36 <sup>ab</sup>	8,43 <sup>c</sup>	0,35
Ingestão água, min/dia	27,00	27,42	24,00	30,60	6,12
Ingestão ração, min/dia	322,20	334,28	318,00	315,00	29,70
Ruminação, min/dia	531,00	513,00	502,80	495,60	18,06
Mastigação, min/dia	853,20	848,40	820,80	810,00	14,78
Ócio, min/dia	560,40	564,60	595,80	625,20	46,68
TRIMS, min/kg MS	12,60	14,40	13,20	14,40	1,38
TRIFDN, min/kg MS	84,00	97,20	88,20	96,60	5,88
TRRUM, min/kg MS	21,60	22,80	21,00	23,40	1,08
TRMAST, min/kg MS	34,80	37,20	34,80	37,80	2,22

Nota: Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).IMS- ingestão de matéria seca; IFDN- ingestão de fibra em detergente neutro; TRIMS- tempo relativo de ingestão de matéria seca; TRIFDN- tempo relativo de ingestão de fibra em detergente neutro; TRRUM- tempo relativo de ruminação; TRMAST- tempo relativo de mastigação.

Os dados relativos a ingestão de matéria seca são resultantes das observações ocorridas durante o período de avaliação comportamental, ou seja, um dia por período experimental. Isso explica a diferença numérica existente entre os valores de ingestão de matéria seca apresentadas na tabela 11, que correspondem a média de todo o período experimental. Mesmo não havendo diferença estatística os valores numericamente maiores foram obtidos com tratamento silagem de cana-de-açúcar e a combinação de silagem de milho e cana-fresca, o que está de acordo com o observado na avaliação de desempenho, conforme relatado na Tabela 11.

Mari et al. (2006) compararam o efeito de diferentes fontes de volumosos, incluindo silagem de cana-de-açúcar aditivada com *L. buchneri* e cana-de-açúcar *in natura*, sobre o comportamento ingestivo de bovinos de corte. Os autores também

não constataram diferença significativa na ingestão de matéria seca entre os tratamentos contendo a forma *in natura*.

Mendonça et al. (2004) observaram aumento na ingestão de matéria (2,9 kg MS/dia) em vacas leiteiras sendo alimentadas com rações contendo silagem de milho em relação a rações com a mesma proporção de cana-de-açúcar *in natura*.

A ingestão de MS referente ao tratamento contendo silagem de milho se mostrou numericamente inferior em relação aos demais, assim como no experimento de desempenho, no qual essa diferença chegou a ser significativa e estatisticamente diferente. Como já observado essa redução no consumo se deve provavelmente a menor estabilidade da ração contendo silagem de milho em relação às rações com as outras fontes de volumosos (Tabela 8).

Junqueira (2006) mencionou que a ingestão de MS pode também ser negativamente afetada em função da porção fibrosa dos alimentos e de sua digestibilidade. Contudo o tratamento contendo silagem de cana-de-açúcar apresentou o maior valor de ingestão de FDN/dia (Tabela 12), mesmo reconhecendo que o FDN de cana-de-açúcar apresenta baixa digestibilidade potencial (item 3.2.3.3). Pode-se inferir dessa maneira, que a diferença quantitativa no consumo de matéria não tenha na porção fibrosa dos volumosos uma explicação satisfatória.

Mendonça et al. (2004), ao contrário do observado na tabela 12 obtiveram maior consumo de FDN/dia quando os animais receberam como fonte de volumoso a silagem de milho. Os autores verificaram aumento de 1,2 kg/dia no consumo de FDN de animais alimentados com silagem de milho em relação aos animais recebendo rações a base de cana-de-açúcar.

Segundo Albright e Arave (1997) os fatores que afetam a ingestão de água são: a temperatura ambiente, qualidade da água, a disponibilidade desta e a alimentação. Sendo que os três primeiros fatores foram controlados e mantidos de forma homogênea entre os tratamentos, somente a alimentação poderia resultar em diferenças para esse parâmetro. De acordo com os dados da Tabela 12, pode-se observar que a alteração na fonte de volumosos na ração não interferiu de maneira significativa no tempo de ingestão de água. Dados da literatura corroboram com os dados obtidos (MARI et al., 2006; ALBRIGHT; ARAVE., 1997). Mari et al. (2006) não constataram diferenças no consumo de água quando avaliados bovinos de corte alimentados com silagem de cana-de-açúcar ou com a planta *in natura*. De acordo com Albright e Arave (1997) as diferenças entre teores de matéria seca no alimento

ingerido pelos animais é um dos principais fatores pelos quais o alimento afeta a ingestão de água. Levando-se em consideração os dados de teor de matéria seca das rações (Tabela 10) é possível verificar que esses teores não diferiram a ponto de justificar variações no tempo ou volume de consumo de água.

Assim como não houve diferença estatística para a quantidade de matéria seca ingerida, não houve também variações quanto ao tempo despendido com a atividade de ingestão das rações.

Corrêa et al. (2003) também não observaram diferenças no tempo gasto pelos animais durante a ingestão de rações formuladas com cana-de-açúcar ou silagem de milho como volumoso.

O tempo de mastigação foi igual para todos os diferentes tratamentos (Tabela 10). Tal fato decorre do tempo de mastigação ser a somatória do tempo de ingestão de matéria seca e o tempo de ruminação, como nenhum desses dois parâmetros variaram significativamente não é de se esperar haver variação significativa no tempo de mastigação diferindo estatisticamente.

Mari et al. (2006) verificaram que os animais recebendo silagem de cana-de-açúcar apresentaram maior tempo de mastigação (478,7 min/dia) que os animais recebendo cana-de-açúcar *in natura* (386 min/dia).

Corrêa et al. (2003) atribuíram a não existência de variação quanto ao tempo gasto pelos animais durante a mastigação à similaridade entre a efetividade do FDN da fibra de silagens de milho e cana-de-açúcar picada. Com isso, a substituição do FDN de uma pelo FDN da outra fonte deveria alterar os tempos de mastigação. No presente estudo, entretanto, a ingestão de FDN foi maior para a silagem de cana-de-açúcar, o que contraria essa expectativa e sem explicação aparente. Assim como observado na tabela 12, os autores não obtiveram diferenças nos tempos relativos calculados para as variáveis de comportamento ingestivo.

### **3.3 Conclusão**

Quanto ao desempenho dos animais, as fontes contendo cana-de-açúcar se mostraram como alternativas interessantes em substituição integral ou parcial à silagem milho, realçando a importância do correto balanceamento das rações. A silagem de cana-de-açúcar aditivada se mostrou como estratégia satisfatória e

interessante na substituição da cana-de-açúcar *in natura* e os desempenho dos animais foram considerados similares com algumas vantagens para a versão ensilada.

A composição do leite diferiu quanto ao teor de gordura, sendo que para esta variável as rações contendo silagem de milho foram favorecidas.

A silagem de cana-de-açúcar aditivada com *L. buchneri* apresentou maior estabilidade aeróbia que os demais volumosos. As rações de maneira geral apresentaram maior estabilidade do que os volumosos, contudo a ração contendo silagem de milho mostrou baixa estabilidade aeróbia, sendo provavelmente devido a isso o menor consumo deste volumoso frete aos demais.

O comportamento ingestivo dos animais pouco foi alterado em função da substituição da fonte de volumoso nas rações estudadas.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, A.G.; EVANGELISTA, A.R.; AMARAL, P.N.C.; SALVADOR, F.M, SANTAROSA, L.C.; PADOVANI, R.F. Avaliação do padrão de fermentação em silagens de milho (*Zea mays* L.). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais ...** Campo Grande:Embrapa, 2004. 1 CD-ROM.
- ALBRIGHT, J.L.; ARAVE, C.W. **The behaviour of cattle**. 1<sup>st</sup> ed. Indiana: CAB, 1997. 306 p.
- ALCÂNTARA, E.; AGUILERA, A.; ELLIOT, R.; SHIMADA, A. Fermentation and utilization by lambs of sugarcane harvested fresh and ensiled with and without NaOH. 4. Ruminant kinetics. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 23, p. 323-331, 1989.
- ANTONIALI, M.; REIS, R.A.; NUSSIO, L.G.; MOREIRA, A.L.; SIMILI, F.F. Avaliação de cultivares de milho (*Zea mays* L) para a produção de silagem: composição bromatológica. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003. Santa Maria. **Anais ...** Santa Maria:UFSM, 2003. 1 CD-ROM.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15rd ed. Arlington: AOAC, 1990. v.1, 1117p.
- CORRÊA, C.E.S.; PEREIRA, M.N.; OLIVEIRA, S.G.; RAMOS, M.H. Performance of Holstein cows fed sugarcane or corn silages of different grain textures. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.60, p.621-629, 2003.

COSTA, M.G.; CAMPOS, J.M.S.; FILHO, S.C.V.; VALADARES, R.F.D.; MENDONÇA, S.S.; SOUZA, D.P.; TEIXEIRA, M.P. Desempenho produtivo de vacas leiteiras alimentadas com diferentes proporções de cana-de-açúcar e concentrado ou silagem de milho na dieta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.34, p.2437-2445, 2005.

DIAS, A.M.A.; BATISTA, A.M.V.; FERREIRA, M.A.; LIRA, M.A.; SAMPAIO, I.B.M. Efeito do estágio vegetativo do sorgo (*Sorghum bicolor*, (L.) Moench) sobre a composição química da silagem, consumo, produção e teor de gordura do leite para vacas em lactação, em comparação a silagem de milho (*Zea mays* (L.)). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.30, p.2086-2092, 2001.

DRIEHUIS, F., OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; VAN WIKSELAAR, P. G. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri* with or without homofermentative lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 56, p. 330–343, 2001.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, p. 350, 1956.

FERNANDES, A.M.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P.; PEREIRA, J.C.; CABRAL, L.S.; VITTORI, A.; PEREIRA, E.S. Estimativas da produção de leite por vacas holandesas mestiças, segundo o sistema CNCPS, em dietas contendo cana-de-açúcar com diferentes valores nutritivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.30, p.1350-1357, 2001.

FRANDSON, R.D.; WILKE, W.L.; FAILS, A.D. **Anatomy and physiology of farm animals**. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Koonan, 2003. 454 p.

HARRIS, L.E. **Os métodos químicos e biológicos empregados na análise de alimentos**. Gainesville: University of Florida, 1970. 150p.

JUNQUEIRA, M.C. **Aditivos químicos e inoculantes microbianos em silagens de cana-de-açúcar: perdas na conservação, estabilidade aeróbia e o desempenho de animais**. 2006. 98p. Dissertação (Mestrado em ciência animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

KUNG JUNIOR, L. Microbial and chemical additives for silage – effects on fermentation and animal response. In: WORKSHOP SOBRE MILHO PARA SILAGEM, 2000, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fealq, v.2, p.53, 2000.

KUNG JUNIOR, L. Preparation of silage water extracts for chemical analyses. **Standard operating procedure** – 001 2.03.96. ed. University of Delaware – Ruminant Nutrition Lab. – Worrilow 309. 1996.

KUNG JUNIOR, L.; STANLEY, R.W. Effect of stage of maturity on the nutritive value of whole-plant sugarcane preserved as silage. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 54, p. 689-696, 1982.



LANDELL, M.G.A.; CAMPANA, M.P.; RODRIGUES, A.A.; CRUZ, G.M.; BATISTA, L.A.R.; FIQUEIREDO, P.; SILVA, M.A.; BIDOIA, M.A.P.; ROSSETO, R.; MARTINS, A.L.M.; GALLO, P.B.; KANTHACK, R.A.D.; CAVICHIOLI, J.C.; VASCONCELOS, A.C.M.; XAVIER, M.A. A variedade IAC86-2480 como nova opção de cana-de-açúcar para fins forrageiros: manejo de produção e uso na alimentação animal. **Boletim técnico IAC**, Campinas, n. 193, p.36, 2002.

LIMA, M. M.; MATTOS, W.R.S. cana-de-açúcar na alimentação de bovinos leiteiros. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 5., 1993. Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fealq, 1993. p. 77-105.

LUCCI, C.S.; VALVASORI, E.; LOPES, R.; CAPEZZUTO, A.; FONTOLAN, V.; BUFFARAH, G. Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) in natura ou ensilada, adicionadas ou não de uréia, em dietas para ruminantes. Digestibilidade aparente. **Boletim da Indústria Animal**, Nova Odessa, v.60, p.47-53, 2003.

MAGALHÃES, A.L.R.; CAMPOS, J.M.S.; FILHO, S.C.V.,; TORRES, R.A.; NETO, J.M.; ASSIS, A.J. Cana-de-açúcar em substituição à silagem de milho em dietas para vacas em lactação: desempenho e viabilidade econômica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.33, p.1292-1302, 2004.

MARI, L.J.; NUSSIO, L.G.; SCHMIDT, P.; RIBEIRO, J.L.; ZOPOLLATTO, M.; SANTOS, M.C.; Queiroz, O.C.M.; CAMARGO, M.S.; TOLEDO FILHO, S.G.; JUNQUEIRA, M.C.; SOUSA, D.P. Comportamento ingestivo de bovinos de corte recebendo ração completa contendo cana-de-açúcar fresca ou ensilada. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., 2003, João Pessoa. **Anais ...** João Pessoa:UFPB, 2006. 1 CD-ROM.

MENDES, C.Q. **Silagem de cana-de-açúcar na alimentação de ovinos e caprinos: valor nutritivo, desempenho e comportamento ingestivo**. 2006. 103p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

MENDONÇA, S.S.; CAMPOS, J.M.S.; FILHO, S.C.V.; VALADARES, R.F.D.; SOARES, C.A.; LANA, R.P.; QUEIROZ, A.C.; ASSIS, A.J.; PEREIRA, M.L.A. Comportamento ingestivo de vacas leiteiras alimentadas com dietas a base de cana-de-açúcar ou silagem de milho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.33, p.723-728, 2004.

MIZUBUTI, I.Y.; RIBEIRO, E.L.A.; ROCHA, M.A.; SILVA, L.D.F.; PINTO, A.P.; FERNANDES, W.C.; ROLIM, M.A. Consumo e digestibilidade aparente das silagens de milho (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) e girassol (*Helianthus annuus* L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.31, p.267-272, 2002.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7<sup>th</sup> ed. Washington: National Academy Press, 2001. 408p.

- NISHIRO, N.; YOSHIDA, M.; SHIOTA, H.; SAKAGUCHI, E. Accumulation of 1,2-propanediol and enhancement of aerobic stability in whole maize silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.94, p.800-807, 2003.
- 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.; SCHMIDT, P. Silagens de cana-de-açúcar para bovinos leiteiros: aspectos agrônômicos e nutricionais. In: SANTOS, F.A.P.; MOURA, J.C.; FARIA, V.P. VISÃO TÉCNICA E ECONÔMICA DA PRODUÇÃO LEITEIRA. 2005. Piracicaba **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 193-218.
- O'KIELY, P.O.; CLANCY, M.; DOYLE, E.M. Aerobic stability of grass silage mixed with a range of concentrate feedstuffs at feed-out. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19., 2001, São Pedro. **Proceeding...** Piracicaba: FEALQ, 2001.p. 794-795.
- OLIVEIRA, R.L.; BARBOSA, M.A.A.F.; CUNHA, M.A.D.; GASTAL, D.W.; MENEZES, L.F.O.; CARVALHO, J.A.; COSTA, R.G.; MATOS, R.C.; LEITE, C.B. Avaliação da silagem de milho em função do tempo de abertura e da inoculação enzimático-microbiana. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais ...** Santa Maria:UFSC, 2003. 1 CD-ROM.
- PEDROSO, A.F. **Aditivos químicos e microbianos como inibidores da produção de etanol em silagens de cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2003. 120 p. Tese (Doutorado em agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- PIRES, A.V. **Efeito da inclusão de fontes de amido e silagem de milho em dietas à base de cana-de-açúcar na digestibilidade de nutrientes e na produção de leite de vacas holandesas**. 1999. 120p. Tese (Livre docência) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1999.
- PRYCE, J.D. A modification of Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. **Analyst**, Cambridge, v.94, p.1151-1152, 1969.
- RANJIT, N.K.; KUNG JUNIOR., L. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 83, p.526-535, 2000.
- ROSA, J.R.P.; SILVA, J.H.S.; RESTLE, J.; PASCOAL, L.L.; BRONDANI, I.L.; ALVES FILHO, D.C.; FREITAS, A.K. Avaliação do comportamento agrônômico da planta e valor nutritivo da silagem de diferentes híbridos de milho (*Zea mays*, L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.33, p.302-312, 2004.
- ROTH, M.T.P.; REIS, R.A.; BERNARDES, T.F.; SIQUEIRA, G.R.; ROTH, A.P.T.P.; AMARAL, R.C. Valor nutritivo das plantas e das silagens de híbridos de milho (*Zea*

mays). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais ...** Campo Grande:Embrapa, 2004. 1 CD-ROM.

ROTH, M.T.P.; SIQUEIRA, G.R.; REIS, R.A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.B.; BERNARDES, T.F.; PIRES, A.J.V.; ROTH, A.P.T.P.; AMARAL, R.C. Ensilagem da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) tratada com doses de uréia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia, **Anais...** Goiânia: UFG/SBZ, 2005. 1 CD ROM.

SAS INSTITUTE. **SAS users guide:** statistics. Cary, 1999. 965p.

SCHMIDT, P.; NUSSIO, C.M.B.; RODRIGUES, A.A.; NUSSIO, L.G.; SANTOS, P.M.; SILVA, C.E. Produtividade, composição morfológica, digestibilidade e perdas no processo de ensilagem de duas variedades de cana-de-açúcar, com e sem adição de uréia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004. Campo Grande, **Anais...** Campo Grande: SBZ, 2004.1 CD ROM.

SCHMIDT, P.; NUSSIO, L.G.; JUNQUEIRA, M.C.; PEDROSO, A.F.; LOURES, D.R.S.; PAZIANI, S.F.; ZOPOLLATTO, M.; MARI, L.J.; TOLEDO FILHO; S.G. Consumo e digestibilidade de silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e microbianos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais ...** Santa Maria:UFSM, 2003. 1 CD-ROM.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. Viçosa: UFV, 1981. 166p.

SIQUEIRA, G.R.;SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; BERNARDES, T.F.; REIS, R.A.; AMARAL, R.C.; PIRES, A.; ROTH, M.T.P. Interações entre inoculantes microbianos e aditivos químicos na fermentação e na estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004. Campo Grande, MS, **Anais...** Campo Grande: SBZ, 2004.1 CD ROM.

TOLEDO FILHO, S.G., SCHIMIDT, P., NUSSIO, L.G., SOUSA, D.P., QUEIROZ, O.M. Estabilidade aeróbia de rações contendo silagens de cana-de-açúcar inoculadas com *Lactobacillus buchneri* 40788 e de ingredientes concentrados. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande, **Anais...** Campo Grande: SBZ, 2004. 1 CD ROM.

TOLEDO FILHO, S.G.; SOUSA, D.P.; Queiroz, O.C.M.;RIBEIRO, J.L.; MARI, L.J. Perdas durante a ensilagem de cana-de-açúcar inoculada com aditivos microbianos. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 13., 2005, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba:USP, 2005. 1 CD-ROM.

VALVASORI, E.; LUCCI, C.S.; PIRES, F.L.;ARCARO, J.R.P.; ARCARO JUNIOR, L. Silagem de cana-de-açúcar em substituição a silagem de sorgo granífero para vacas leiteiras. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v.35, p.139-142, 1998.

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

VILELA, M.S.; FERREIRA, M.A, VÉRAS, A.S.C.; SANTOS, M.V.F.; FARIAS, I.; MELO, A.A.S.; RAMALHO, R.P.; ARAÚJO, P.R.B. Avaliação de diferentes suplementos para vacas mestiças em lactação alimentadas com cana-de-açúcar: desempenho e digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.32, p.768-777, 2003.