

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**AVALIAÇÃO DO VALOR NUTRITIVO E ESTABILIDADE AERÓBIA DE
SILAGEM DE PALHA DE FEIJÃO-FRADE E MAÇÃ
DE BAIXO CALIBRE**

Dissertação de Mestrado em Engenharia Zootécnica

Ana Rita Alves Pereira

Orientadores

Prof. Doutor Miguel António Machado Rodrigues

Prof. Doutor Luís Miguel Mendes Ferreira



Vila Real, 2016

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**AVALIAÇÃO DO VALOR NUTRITIVO E ESTABILIDADE AERÓBIA DE
SILAGEM DE PALHA DE FEIJÃO-FRADE E MAÇÃ DE BAIXO
CALIBRE**

Dissertação de Mestrado em Engenharia Zootécnica

Ana Rita Alves Pereira

Orientadores

Prof. Doutor Miguel António Machado Rodrigues

Prof. Doutor Luís Miguel Mendes Ferreira

Composição do Júri:

Prof. Doutora Ana Luísa Guimarães Dias Lourenço

Prof. Doutora Cristina Vitória de Miranda Guedes

Prof. Doutor Miguel António Machado Rodrigues

Vila Real, 2016

**Todas as ideias e factos apresentados neste trabalho
são da exclusiva responsabilidade da autora.**

À minha mãe.
“Hectares e hectares”.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais. Obrigada por nunca me terem negado a luta pelas oportunidades que, ao longo da minha vida, entendi que fossem adequadas para mim. A incerteza daquilo que o futuro me reserva, ainda que um pouco assustadora, é reflexo das possibilidades infinitas com que me deparo. Vocês são a razão pela qual hoje posso usufruir do privilégio que é a oportunidade de procurar e lutar por aquilo que sei que me fará feliz durante muitos, muitos anos. Que a minha vida daqui para a frente seja espelho da vossa orientação, pois não há nada de que me orgulhe mais.

Aos meus irmãos. Obrigada por me permitirem partilhar convosco este percurso. Não há amor que se compare àquele que tenho por vocês e não há nada que não fizesse para garantir a vossa felicidade e paz de espírito. Hoje e sempre convosco.

À minha família. Obrigada por incutirem em mim a certeza de que nunca me faltarão mãos para me ajudar a levantar no dia em que cair. Todos vocês são aquilo por que mais sou agradecida e uma das minhas principais fontes de pura felicidade.

Ao Mota. Obrigada por seres, sem dúvida alguma, a minha pessoa. É-me impossível encarar a ideia de que alguém pudesse ser mais para mim do que aquilo que tu és. A linha definida pelo universo para aquilo que viria a ser o meu percurso seria completamente diferente se não previsse a tua presença e eu não seria, com toda a certeza, a pessoa que sou hoje. Que todos aqueles que desejam atingir a plenitude de espírito pudessem avançar ao longo do seu percurso lado a lado com alguém que lhes proporcionasse aquilo que me tu me proporcionas. És-me o mundo.

Ao Professor Mendes. Obrigada por ter sido uma fonte de compreensão e disponibilidade incondicionais e ter sido a pessoa que foi para comigo ao longo dos anos. Em si encontrei a pessoa com que mais me identifiquei, a pessoa que melhor compreendeu os meus devaneios de personalidade (apesar de, na maioria das vezes, não merecer sequer uma fração da energia que disponibilizou comigo) e a pessoa que guardarei sempre comigo como um pilar indispensável durante aquela que espero que venha a ser uma vida de realização pessoal. Devo-lhe mais do que alguma vez poderei compensar e, por tudo isto, agradeço-lhe infinitamente.

Ao Professor Miguel. Obrigada por me entender de uma forma que outros não conseguiram. Foi um marco desde muito cedo e o primeiro a apresentar-me àquilo que hoje sei ser, sem qualquer dúvida, aquilo que quero fazer com o resto da minha vida. Será um orgulho e é, definitivamente, um objetivo, poder um dia corresponder às suas expectativas.

Ao Professor Divanildo. Obrigada por, provavelmente sem o saber, me ter tornado numa pessoa melhor. O dia em que conseguir ser alguém de quem o Professor se orgulhe será o dia em que terei atingido um grande objetivo. Nunca me esquecerei do quão especial foi para mim. Obrigada por tudo, do fundo do coração.

Aos Professores José Carlos, José Júlio, Paulo Rema, Severiano Silva e Maria José. Obrigada por me apresentarem a uma nova faceta da Amizade. Esta etapa que agora termina não teria sido a mesma sem os vossos ensinamentos e apoio e disponibilidade incondicionais.

À minha equipa. Obrigada meninas por me terem permitido crescer sob os vossos exemplos de sucesso. O vosso sentido de responsabilidade e liderança tornou-vos alvos da minha honesta admiração. Por tudo isto, pela influência que manifestaram sobre mim e por terem sido sempre uma constante ao longo do meu percurso, estar-vos-ei sempre grata

Ao Chris, Steph e Valéria. Obrigada por enriquecerem o meu espírito todos os dias durante os últimos 5 anos, muitas vezes sem eu o merecer. Foram sempre o meu porto seguro e hoje avanço para a próxima fase da minha vida sabendo que nunca me faltarão. É um orgulho e um privilégio saber que estarão comigo daqui para a frente.

À Xana, Mariana, Patrícia, Ricardo, Tomás, Hyan, Samuel e Jesus. Obrigada meus “pequeninos”, pela vossa amizade e carinho inesgotáveis. Adoro-vos como vocês não imaginam. Levar-vos-ei sempre comigo e tenho o maior orgulho em ter acompanhado a vossa evolução ao longo destes anos.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o valor nutritivo e estabilidade aeróbia de silagens de palha de feijão-frade (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e maçã, com diferentes níveis de incorporação destas matérias-primas (15% de palha e 85% de maçã, P15, 30% de palha e 70% de maçã, P30) durante períodos de ensilagem de diferente duração (45 e 60 dias). A composição química das misturas foi determinada antes e após o processo de ensilagem. A avaliação da sua composição microbiológica foi realizada no momento de abertura dos silos laboratoriais (dia 0) e durante um período de 12 dias. A estabilidade aeróbia das silagens foi avaliada durante 12 dias, através da medição da evolução da diferença entre as temperaturas dos silos e a temperatura ambiente e do seu pH. De um modo geral, os resultados obtidos indicaram que o período de ensilagem não teve um efeito significativo ($P>0,05$) sobre as variáveis analisadas. Como seria expectável, as silagens com maior incorporação de palha apresentaram teores mais elevados em MS (314 vs. 199 g/kg), constituintes da parede celular (NDF, 567 vs. 525 g/kg MS, ADF, 411 vs. 373 g/kg MS, ADL, 109 vs. 100 g/kg MS) e PB (134 vs. 121 g/kg MS). Pelo contrário, as silagens com menor incorporação de palha apresentaram uma concentração superior em WSC (33 vs. 21 g/kg MS). No momento de abertura dos silos, a silagem P15 apresentou valores mais elevados de ácidos acético, propiónico e láctico, e um pH inferior (3,82 vs. 4,29). O ácido butírico não foi detetado em nenhuma das silagens. No momento de abertura do silo (dia 0), as silagens P30 foram as que apresentaram uma maior carga de BAL (0,33 vs. 7,14 log UFC/g), *Enterobacteriaceae* (3,31 log UFC/g vs. não detetadas) e leveduras e fungos (6,49 vs. 2,44 log UFC/g). Relativamente à estabilidade aeróbia, verificou-se que as silagens P30 apresentaram uma variação de temperatura mais elevada (+9 e +13,5°C no período de ensilagem de 45 e 60 dias, respetivamente) quando comparada com a observada nas silagens P15 (+6°C e +5°C no período de ensilagem de 45 e 60 dias, respetivamente). Relativamente ao pH, a silagem P15 apresentou uma tendência clara para uma maior estabilidade dos seus valores durante o período de aerobiose. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o aumento da incorporação de maçã favoreceu o processo de ensilagem da palha de feijão-frade tendo-se obtido silagens estáveis no final dos dois períodos de ensilagem. Mais ainda, sugerem que o nível de incorporação de palha de 15% é o mais indicado para a obtenção de silagens estáveis após a abertura dos silos. Na medida em que a diminuição dos níveis de hidratos de carbono solúveis foi demasiado elevada em ambas as misturas, poder-se-á concluir que a utilização de aditivos que permitam uma acidificação mais rápida do material a ensilar poderá ser vantajosa.

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the nutritional value and aerobic stability of cowpea straw (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) and low caliber apple silage, at different levels of incorporation (15% apple with 30% straw, P15, and 30% apple with 70% straw, P30) and during different ensiling periods (45 and 60). The chemical composition of the mixtures was determined before and after the ensilage process. The evaluation of the microbiological composition was held at the opening of the laboratory silos (day 0) and during a period of 12 days. The aerobic stability of the silage was evaluated for 12 days by measuring the evolution of the difference between the temperatures of the silos and the room temperature and its pH. In general, the results indicated that the ensilage period had no significant effect ($P>0,05$) over the analyzed variables. On one hand, as expected, the silage with greater incorporation of straw had higher levels of dry matter (DM, 313.9 vs. 198.6 g / kg), cell wall constituents (NDF, 567 vs. 525 g/kg MS, ADF, 411 vs. 373 g/kg MS, ADL, 109 vs. 100 g/kg MS) and crude protein (134 vs. 121 g / kg DM). On the other hand, the silage with less straw incorporation showed the higher concentration of water-soluble carbohydrates (33 vs. 21 g / kg DM). Upon opening of the silo, P15 silage showed higher levels of acetic, propionic and lactic acid, and lower pH (3.82 versus 4.29). Butyric acid was not detected in any of the silages. In the silo opening time (day 0), the P30 silages showed a superior content of lactic acid bacteria (0.33 vs. 7.14 log CFU / g), *Enterobacteriaceae* (3.31 log UFC / g vs. undetected) and yeasts and fungi (6.49 vs. 2.44 log UFC / g). Regarding the aerobic stability, it was found that the P30 silage had a higher temperature range (9 and 13.5 °C over 45 and 60 days of ensilage, respectively) compared to that observed in P15 silage (5 and 6 °C over 45 and 60 days of ensilage, respectively). With regard to pH, P15 silage showed a clear tendency for a greater stability of its values during the aerobic period. The results of this study suggest that the addition of apple favored the ensiling process of cowpea straw as both silages were stable at the end of the two ensiling periods. Moreover, they suggests that the 15% straw incorporation level is the most suitable for obtaining stability after opening the silos. To the extent that the decrease of the soluble carbohydrate level was too high in both mixtures, it may be concluded that the use of additives enabling a more rapid acidification of the silage material can be advantageous.

ÍNDICE GERAL

1 - INTRODUÇÃO	1
2 – ATUALIDADE E TENDÊNCIAS DOS MERCADOS NACIONAL E INTERNACIONAL DE PROTEÍNA VEGETAL.....	2
2.1. DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE LEGUMINOSAS	2
2.2. PANORAMA INTERNACIONAL DA PRODUÇÃO DE PROTEAGINOSAS	2
2.3. PRODUÇÃO DE PROTEAGINOSAS EM PORTUGAL	4
3 – PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE SUBPRODUTOS AGROALIMENTARES UTILIZADOS EM ALIMENTAÇÃO ANIMAL	5
3.1. DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE SUBPRODUTOS.....	5
3.2. UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS EM ALIMENTAÇÃO ANIMAL	6
3.2.1. Caracterização e valorização de palhas para alimentação de ruminantes...	7
3.2.2. Tratamento sob a forma de silagem	9
4 - MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1. PREPARAÇÃO DO MATERIAL	12
4.2. PREPARAÇÃO DAS SILAGENS	13
4.3. ANÁLISES QUÍMICAS	14
4.4. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	16
4.5. ESTABILIDADE AERÓBIA	17
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
5 – RESULTADOS	18
5.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E VALOR NUTRITIVO DAS SILAGENS	18
5.2. MICROBIOLOGIA.....	21
5.3. ESTABILIDADE AERÓBIA	21
6 – DISCUSSÃO	23
7 – CONCLUSÕES.....	26
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Evolução da produção anual de proteaginosas na Europa entre 1993 e 2013	3
Figura 2 - Evolução da produção anual de proteaginosas em Portugal entre 1993 e 2013....	4
Figura 3 – Rendimento produtivo dos diferentes componentes de feijão-frade.....	8
Figura 4 – Maçã em processo de trituração (esquerda) e junção das matérias-primas (direita)	12
Figura 5 – Uniformização das misturas (esquerda) e comparação entre P15 e P30 (direita).	13
Figura 6 – Pesagem do material a ensilar (esquerda) e seu acondicionamento (direita).	13
Figura 7 – Comparação entre silagens P15 e P30 (esquerda) e processo de filtração para análises químicas (direita)	15
Figura 8 – Placagem para análise microbiológica (esquerda) e exemplo de placa após contagem de BAL (direita)	16
Figura 9 – Silo laboratorial em situação de aerobiose (esquerda) e material para determinação de pH (direita)	17
Figura 10 – Evolução da temperatura relativamente à temperatura ambiente e do pH das silagens P15 e P30 abertas aos 45 (esquerda) e 60 dias (direita), durante um período de 12 dias.	23

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Composição proteica média de diferentes espécies de proteaginosas	2
Quadro 2 - Classificação de subprodutos de acordo com a indústria de origem	5
Quadro 3 - Referências de utilização de subprodutos na alimentação de diferentes espécies animais nos últimos 10 anos	6
Quadro 4 – Composição química da palha de feijão-frade	8
Quadro 5 – Composição química das matérias-primas utilizadas no trabalho experimental	13
Quadro 6 – Composição química das misturas antes dos períodos de ensilagem.....	19
Quadro 7 – Composição química das misturas após os períodos de ensilagem.....	19
Quadro 8 – Variação da composição química de cada mistura antes da ensilagem e após a abertura dos silos	20
Quadro 9 – Composição das misturas em AGV após os períodos de ensilagem.....	22
Quadro 10 – Populações microbiológicas identificadas nas misturas após o processo de ensilagem.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS

P15 – Incorporação de 15% de palha de feijão-frade

P30 – Incorporação de 30% de palha de feijão-frade

ADF – Fibra Detergente Ácido

ADL – Lenhina insolúvel em detergente ácido

AGV – Ácidos Gordos Voláteis

aNDF – Fibra Detergente Neutro livre de cinzas

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

BAL – Bactérias do Ácido Láctico

CT – Capacidade Tampão

EPM – Erro padrão das médias

FAO – Food and Agriculture Organization

MO – Matéria Orgânica

MS – Matéria Seca

N-ADF – Azoto ligado à fibra

ND – Não Detetado

NDF – Fibra Detergente Neutro

N-NH₃ – Azoto Amoniacal

PB – Proteína Bruta

UE – União Europeia

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

WSC – Hidratos de carbono solúveis em água

1 - INTRODUÇÃO

O futuro demográfico será caracterizado pelo crescimento contínuo da população mundial que atingirá, até 2050, 9,1 mil milhões de pessoas (FAO, 2009). O aumento da produção de proteína vegetal apresenta-se como um fator determinante para o futuro da cadeia alimentar, na medida em que não é expectável que a produção animal seja capaz de acompanhar em pleno as necessidades que advirão deste crescimento. Stehfest et al. (2009) referem que uma transição global em direção a dietas com menor participação de proteína animal poderá contribuir para a redução dos custos relacionados com a mitigação das alterações climáticas em 50%, até 2050. Do mesmo modo, de acordo com Aiking (2011) e Gerbens-Leenes et al. (2010), uma das principais medidas sugeridas pelos países do Ocidente por forma a promover a sustentabilidade da indústria da produção animal para consumo humano é, de facto, a substituição parcial de proteína animal por proteína vegetal. Desta forma, em relatório publicado pela Comissão da Agricultura e do Desenvolvimento Rural relativamente ao défice de proteínas na UE, o Parlamento Europeu aponta uma série de medidas para que seja possível garantir um aumento da produção europeia de proteína vegetal de alto valor nutricional até níveis que permitam diminuir a sua importação e aumentar a competitividade da agricultura europeia.

Associado ao aumento do cultivo de proteaginosas em grande escala, verificar-se-á, inevitavelmente, um aumento da produção de subprodutos. Estes correspondem aos resíduos da sua fileira de produção, que poderão vir a ser utilizados diretamente noutros processos tendo-se, como exemplos, as palhas, os farelos e as vagens.

A possibilidade de valorização de subprodutos de culturas vegetais tem vindo a ser investigada na tentativa de aferir de que formas se poderá aumentar o seu valor nutritivo e em que condições poderão integrar a alimentação de herbívoros. Uma das hipóteses passa pela adição de matérias-primas provenientes da produção frutícola que aumentem o seu valor nutritivo e possibilitem a sua conservação através do processo de ensilagem.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o valor nutritivo e estabilidade aeróbia de silagens de palha de feijão-frade (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e maçã de baixo calibre, procurando avaliar o efeito de diferentes proporções destas matérias-primas durante períodos de conservação de diferente duração.

2 – ATUALIDADE E TENDÊNCIAS DOS MERCADOS NACIONAL E INTERNACIONAL DE PROTEÍNA VEGETAL

2.1. DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE LEGUMINOSAS

As leguminosas são espécies vegetais pertencentes à família *Fabaceae* caracterizadas pelos seus frutos em forma de vagem e pela sua capacidade de estabelecer, ao nível das raízes, uma relação simbiótica com bactérias fixadoras de azoto atmosférico. Estas bactérias, *Rhizobium leguminosarum*, conferem às leguminosas a capacidade de prosperarem em solos onde o azoto é um fator limitante no suporte do desenvolvimento de outras espécies, necessitando apenas de quantidades reduzidas desse elemento.

Dentro das leguminosas encontram-se as leguminosas para grão. Estas correspondem às 13800 espécies pertencentes à subfamília *Faboideae* (Lewis, 2005) e são caracterizadas pelo elevado teor proteico dos seus grãos secos (Quadro 1) sendo, por isso mesmo, também denominadas de proteaginosas.

Quadro 1- Composição proteica média do grão de diferentes espécies de proteaginosas

ESPÉCIE	PB (%MS)	REFERÊNCIAS
Ervilha (<i>Pisum sativum</i>)	24,10	a, b
Fava (<i>Vicia faba</i> L. spp)	29,46	c, d, e
Feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	26,80	b*, f**
Grão-de-bico (<i>Cicer arietinum</i>)	22,91	a, b, d
Lentilha (<i>Lens culinaris</i>)	27,30	b, c
Feijão-frade (<i>Vicia unguiculata</i> L. Walp)	25,14	i***, j****, k, l

^aDentinho et al., 2010; ^bWang e Daun, 2004; ^cBhatty e Christison, 1984; ^dHove et al., 1978; ^eMortuza et al., 2009; ^fMesquita et al., 2007; ^gDuarte e Calado, 2014; ^hErskine et al., 2009; ⁱSingh et al., 2002; ^jSilva et al., 2002; ^kFrota et al., 2008; ^lPinheiro 2013

* Com base em 11 variedades; ** Com base em 21 variedades; *** Com base em 52 variedades; **** Com base em 45 variedades

2.2. PANORAMA INTERNACIONAL DA PRODUÇÃO DE PROTEAGINOSAS

De acordo com o projeto de relatório publicado pelo Parlamento Europeu (2010) relativamente ao défice de proteínas na UE, a produção total de proteaginosas na UE ocupa, atualmente, 3% dos seus terrenos cultiváveis, contribuindo com apenas 30% das proteaginosas consumidas sob forma de alimento para animais. Mais ainda, devido à necessidade de importação de 45 milhões de toneladas de proteaginosas (equivalente a 20 milhões de hectares cultivados fora da UE), provenientes sobretudo do Brasil, Argentina e Estados Unidos, o sector pecuário da UE encontra-se extremamente vulnerável relativamente

à volatilidade dos preços e às distorções comerciais. O mesmo relatório afirma que o déficit observado na produção de proteaginosas remonta a acordos de comércio internacionais, anteriormente celebrados, que permitiram à UE proteger a sua produção cerealífera, autorizando, em troca, importações para a UE de oleaginosas e proteaginosas isentas de direitos. A produção de proteaginosas da UE foi, pois, confrontada com uma grave desvantagem competitiva, tendo sofrido uma quebra drástica (Figura 1).

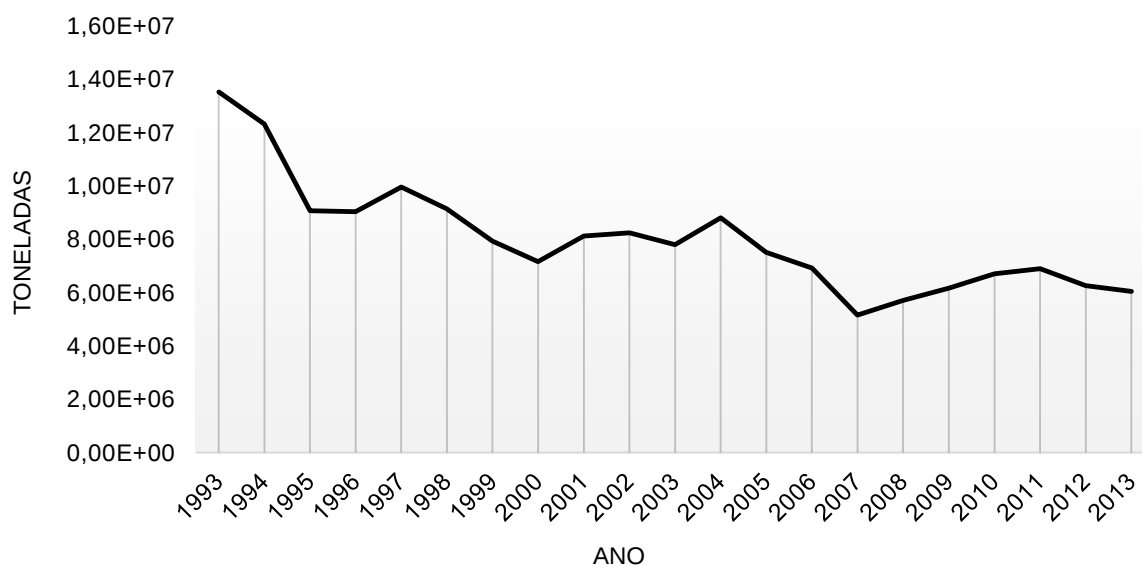


Figura 1 - Evolução da produção anual de proteaginosas na UE entre 1993 e 2013 (FAO, 2015)

Como consequência da pequena percentagem de proteaginosas produzidas na UE, a investigação e o desenvolvimento, a formação e a aquisição de experiência prática na produção interna dessas culturas foram negligenciados, o que, por seu turno, conduziu a um baixo nível de inovação e de produção de sementes adaptadas às condições observadas a nível regional na UE. Confrontados com este panorama, a Comissão Europeia e os Estados-Membros assinalaram as vantagens de um fornecimento e consumo mais equilibrados de proteaginosas produzidas na UE como parte de uma estratégia integrada de resposta aos novos desafios suscitados, nomeadamente, pelas alterações climáticas, pela perda da biodiversidade agrícola, pela exaustão dos solos e pela poluição dos aquíferos, bem como pela volatilidade dos preços dos produtos agrícolas no mercado mundial.

Neste sentido, verifica-se atualmente, a existência de vários projetos europeus destinados à promoção do cultivo destas leguminosas por forma a aumentar a performance competitiva da agricultura europeia a nível económico e ambiental e a garantir fontes proteicas de alto valor nutritivo para alimentação animal e humana.

De um modo geral, é expectável que o consumo de proteaginosas cresça em 10% durante próxima década e em 23% até 2030, sendo África e Ásia os continentes em que se espera um crescimento mais acelerado (Aiking et al., 2006).

2.3. PRODUÇÃO DE PROTEAGINOSAS EM PORTUGAL

Em Portugal, a produção interna de proteaginosas representa uma percentagem mínima em relação ao total das necessidades internas seja para alimentação humana ou animal havendo necessidade de importar cerca de 90% de provisões internacionais (Duarte e Calado, 2014). Mais ainda, de acordo com dados publicados pela FAO (2015), a produção de proteaginosas em Portugal tem vindo a decrescer substancialmente nas duas últimas décadas (Figura 2), tendo-se verificado, em 2013, a produção de, aproximadamente, 23000 toneladas, quando em 1993 foi de 35000 toneladas.

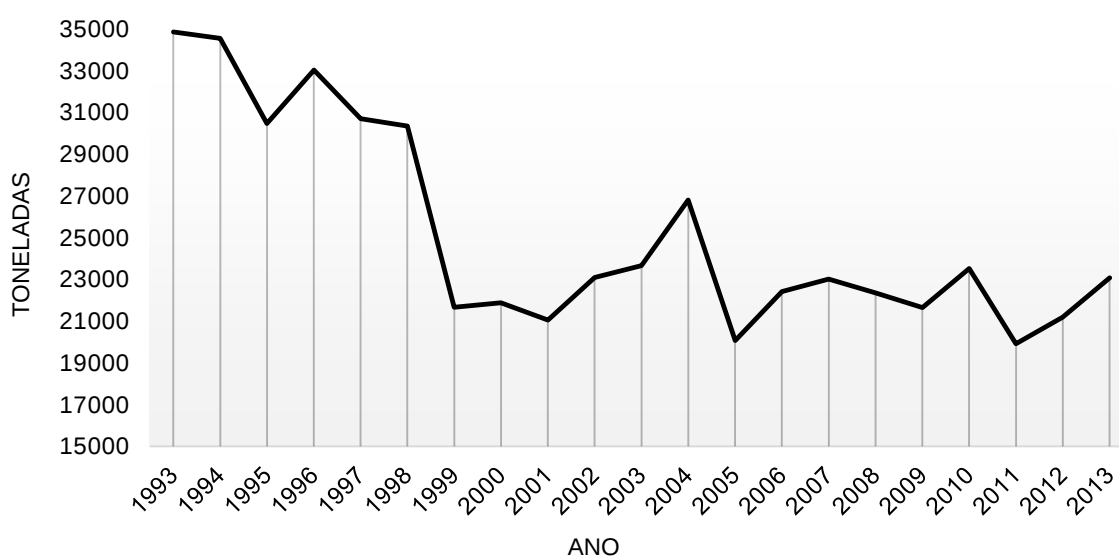


Figura 2- Evolução da produção anual de proteaginosas em Portugal entre 1993 e 2013 (FAO, 2015)

Segundo o Observatório dos Mercados e das Importações Agroalimentares, apostar na criação e dinamização de um consórcio que habilite a produção, a indústria e a investigação no desenvolvimento das proteaginosas será benéfico não só para o equilíbrio da balança comercial, mas também para uma melhoria dos hábitos alimentares dos portugueses.

Deste modo, em alguns dos vários projetos europeus destinados a esse mesmo desenvolvimento, Portugal está envolvido em várias vertentes, nomeadamente na identificação de fontes de resistência a pragas e doenças de várias culturas de proteaginosas, na caracterização da sua qualidade nutricional e organolética, e na identificação das características de qualidade mais valorizadas pelos consumidores.

3 – PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE SUBPRODUTOS AGROALIMENTARES UTILIZADOS EM ALIMENTAÇÃO ANIMAL

3.1. DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE SUBPRODUTOS

De acordo com o artigo 44º-A do Decreto-Lei nº73/2011 de 17 de Junho, publicado pelo Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território, o conceito de subproduto é aplicável a substâncias ou objetos que resultam de um processo produtivo cujo principal objetivo não seja a sua produção, e que são utilizados diretamente, sem qualquer outro processamento, que não seja o da prática industrial normal.

Considerando que, em consequência da necessidade de acompanhar a evolução demográfica, nos aproximamos do esgotamento de fontes naturais utilizadas como matéria-prima para a produção de alimentos para consumo humano e que, anualmente, um terço desta produção é perdida (Gustavsson et al., 2011), a valorização de subprodutos agroalimentares apresenta-se, hoje em dia, não só como uma necessidade, mas como uma oportunidade para obtenção de novos produtos de valor acrescentado (Pintado, 2015).

Relativamente à indústria agroalimentar, os subprodutos enquadram-se em diferentes categorias dependendo do tipo de produtos e processos que lhes deram origem (Quadro 2).

Quadro 2- Classificação de subprodutos de acordo com a indústria de origem (Adaptado de Azevêdo, 2009; Duarte et al., 2007; Cortez et al., 1992; Junior et al., 2005; Costa, 2012; Rodrigues, 2003)

SETOR/INDÚSTRIA	EXEMPLOS DE SUBPRODUTOS
Açucareira	Bagaço de cana-de-açúcar, Torta de filtro, Melaços
Vinícola	Borras, Bagaço de Vinho, Farinha de grainhas de uva
Hortofrutícola	Polpas, Cascas, Sumos
Café	Cascas, Borras, Pele de Prata
Cervejeira	Dreches, Leveduras, Malte
Azeite	Bagaço de azeitona
Cultura e processamento de cereais e leguminosas	Sêmeas, Farelos, Palhas, Vagens
Biodiesel	Tortas, Farelos, Bagaços

3.2. UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS EM ALIMENTAÇÃO ANIMAL

Independentemente da categoria em que se encontrem, os subprodutos originários da indústria agroalimentar são sempre passíveis de evidenciar desequilíbrios nutricionais devido à sua baixa digestibilidade densidade nutricional e, eventualmente, presença de substâncias anti nutricionais (Rodrigues, 2003). Não obstante, apesar de, por essas mesmas razões, estes apresentarem valor económico nulo ou extremamente diminuído no que diz respeito ao consumo humano, têm vindo a ser explorados como possível fonte de nutrientes e energia para suportar a produção animal (Mirzaei-aghsaghali e Maheri-sis, 2008) permitindo assim reduzir os custos relacionados com a sua alimentação e potenciar uma maior otimização dos recursos.

Atualmente verifica-se a existência de um conjunto extremamente diversificado de estudos relacionados com esta temática (Quadro 3). Ainda que, de uma forma geral, seja possível constatar uma maior incidência de estudos relacionados com ruminantes, as produções de outras espécies animais apresentam, ainda assim, e de um modo geral, uma amostragem significativa de trabalhos realizados.

Quadro 3- Referências de utilização de subprodutos na alimentação de diferentes espécies animais nos últimos 10 anos

	TIPO DE SUBPRODUTOS E METODOLOGIAS UTILIZADAS	REFERÊNCIA
RUMINANTES	Consumo e digestibilidade de subprodutos do processamento de frutas em ovinos	(Junior et al., 2005)
	Revisão sobre o valor nutritivo de diferentes subprodutos agroindustriais para alimentação de ruminantes	(Mirzaei-aghsaghali e Maheri-sis, 2008)
	Avaliação de subprodutos agrícolas e agroindustriais na alimentação de bovinos	(Azevêdo, 2009)
	Revisão sobre a utilização de palha de arroz sob diferentes tratamentos como forma de aumentar o seu valor nutricional para alimentação de ruminantes	(Sarnklong et al., 2010)
	Avaliação nutricional de subprodutos das indústrias hortícola e frutícola para alimentação de vacas lactantes	(Angulo et al., 2012)
	Utilização de palha de feijão-frade (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp) como alimento exclusivo para cabras anãs	(Harcourt, 2015)
LEPORÍDEOS	Efeito da fibra de subprodutos agroindustriais e sua avaliação nutricional para coelhos	(Retore et al., 2010)
	Fontes de fibra de subprodutos agroindustriais proteicos para coelhos em crescimento	(Retore et al., 2010)
	Bagaço de uva como ingrediente alternativo no arração de coelhos em crescimento	(Klinger et al., 2013)

SUÍNOS	Avaliação de subprodutos das indústrias hortofrutícola e do pescado como fontes de alimento alternativas em dietas para porcos	(Angulo et al., 2012)
	Performance de porcos em crescimento alimentados à base de subprodutos do processamento de milho e trigo	(Mwesigwa et al., 2013)
	Análise da substituição parcial de milho por subprodutos da indústria hortofrutícola em dietas de engorda para porcos e seu efeito ao nível da carcaça	(Cilev et al., 2014)
AVES	Avaliação da incorporação de diferentes níveis de subprodutos do processamento do arroz em dietas de galinhas poedeiras e seu efeito na performance produtiva, qualidade do ovo e retorno económico	(Maina et al., 2013)

3.2.1. Caracterização e valorização de palhas para alimentação de ruminantes

As particularidades da utilização digestiva dos alimentos pelos herbívoros favorecem o desenvolvimento de estratégias nutritivas específicas, conferindo-lhes a capacidade de satisfazer as suas necessidades energéticas e proteicas a partir de alimentos fibrosos e de fontes azotadas não proteicas, de escasso ou nulo valor alimentar para outras espécies. Por essa mesma razão, as palhas resultantes do processamento de culturas vegetais correspondem, atualmente, ao subproduto de maior relevância no que diz respeito ao estudo da sua utilização na alimentação destas espécies. Segundo a FAO (2011), estima-se que a produção mundial de palhas, em 2007, tenha atingido 2 a 3 mil milhões de toneladas. Relativamente às palhas de cereais, o avançado grau de lenhificação das paredes celulares, aliado ao baixo teor em azoto, implica sérias limitações à sua utilização digestiva e, por conseguinte, à sua ingestão pelos ruminantes (Rodrigues, 2003). No caso particular das palhas de arroz, o elevado nível de lenhificação e silicificação, a degradação ruminal lenta e limitada de hidratos de carbono e o conteúdo reduzido em azoto constituem as suas principais deficiências (Sarnklong et al., 2010). Já as palhas de leguminosas, ainda que, de um modo geral, comparativamente às palhas de cereais, apresentem uma maior percentagem de PB (10 vs 4% MS), e tenham menos NDF (54 vs 74% MS), tendem, em contrapartida a ser mais lenhificadas (10% vs 6,5% MS) (Héuze et al., 2015).

No caso específico da palha de feijão-frade, a sua composição química não é facilmente comparável com as restantes devido à escassez de trabalhos publicado sobre este subproduto. Não obstante, de acordo com o Quadro 4, é possível verificar que, relativamente ao seu valor nutricional, esta é caracterizada por valores mais elevados de PB (144 g/kg MS), o que poderá tornar atrativa a sua utilização na alimentação de ruminantes.

Quadro 4 – Composição química da palha de feijão-frade (H. Trindade, dados não publicados)

MS	MO	NDF	ADF	ADL	PB	Açúcares
g/100g	-----g/ kg MS-----					
930	912	618	544	117	144	67

Acresce ainda o facto de os dados de produção de feijão-frade aquando da sua partição nos diferentes componentes (Figura 3) indicarem um potencial produtivo de MS elevado, na medida em que a parte aérea remanescente após colheita, que constitui o material que originará as palhas, representa a proporção mais elevada (46%).

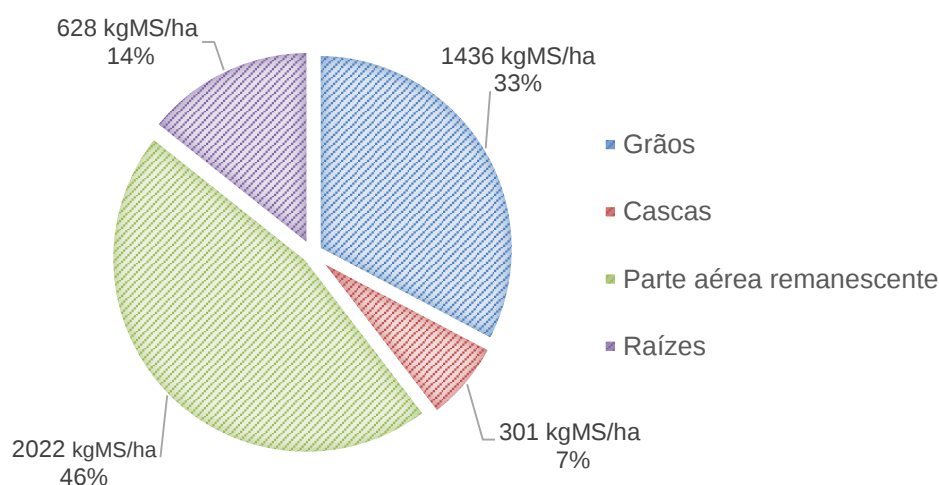


Figura 3 – Rendimento produtivo dos diferentes componentes de feijão-frade (H. Trindade, dados não publicados)

Ao longo dos últimos 30 anos, tem-se verificado um crescimento considerável do número de estudos dedicados à avaliação da possibilidade de valorização nutricional de palhas através da aplicação de diferentes tipos de tratamentos (Morrison, 1983; Pickard et al., 2010; Rahal et al., 1997; Saadullah e Dolberg, 1981; Selim et al., 2004; Smith et al., 1981). Existem diferentes tipos de tratamento passíveis de serem utilizados com este objetivo. De entre estes, os principais podem ser agrupados em tratamentos químicos, físicos ou biológicos.

Os tratamentos químicos destinam-se, principalmente, a facilitar o acesso dos microrganismos do rúmen à celulose e hemicelulose presentes nas paredes celulares das células vegetais através da degradação da lenhina (Héuze et al., 2015) e aumentar a quantidade de azoto presente nas palhas.

Ainda que sejam vários os estudos que, ao longo dos últimos 40 anos, se dedicaram à avaliação do efeito de diferentes tipos de tratamentos químicos em vários tipos de palhas (Waagepetersen e Thomsen, 1977; Kernan e Spurr, 1978; Saadullah et al., 1981; Jayasuryia et al., 1982; Sundstol, 1983/84; Sundstol e Coxworth, 1984; Dias-da-Silva, 1985; Dias-da-Silva

e Sundstol, 1986; Dias-da-Silva e Guedes, 1990), o tratamento através da utilização de ureia é aquele que apresenta maior representatividade. Neste tratamento, a ureia, após hidrólise, é utilizada como fonte de amoníaco que, por sua vez, para além de contribuir diretamente para o aumento da composição azotada das palhas, permite uma maior degradação da hemicelulose e um aumento da turgidez do material vegetal, levando a que o acesso aos conteúdos celulares por parte dos microrganismos celulolíticos presentes no rúmen seja mais eficaz.

Os tratamentos físicos consistem na redução do tamanho de partícula da palha através de corte ou moagem com o objetivo de promover, tal como no tratamento químico, o acesso aos conteúdos da parede celular. Ainda que por vezes permita uma diminuição nas perdas devido ao facto de o animal ser incapaz de efetuar seleção (Chander, 2010) e seja capaz de aumentar a ingestão voluntária devido a uma maior taxa de passagem (Göhl, 1981), este processo é, geralmente, incapaz de compensar o decréscimo de digestibilidade da fibra no rúmen, resultando assim numa diminuição da digestibilidade global (Rodrigues, 2003).

A utilização de fungos linholíticos e o tratamento enzimático são dois tipos de processos biológicos que têm vindo, nos últimos anos, a ser utilizados em diversos estudos por forma a, respetivamente, aumentar a degradabilidade da lenhina presente nas paredes celulares das células vegetais (Hatakka, 1983; Karunanandaa et al., 1996; Agosin e Odier, 1985; Dinis et al., 2009; Dias et al., 2010) e potenciar a conversão dos seus polissacarídeos em açúcares fermentescíveis (Hatakka, 1983; Singh e Das, 2004). Durante os próximos anos é expectável que este tipo de procedimentos passem a constituir a abordagem mais comum para a valorização de palhas e outros substratos agrícolas na medida em que apresentam uma maior eficácia em termos de custos e um menor impacto ambiental (Héuze et al., 2015).

Mais ainda, uma outra forma de obter alimentos de valor acrescentado a partir de matérias-primas de valor nutricional baixo, como é o caso das palhas, consiste na sua combinação com outro tipo de subprodutos sob a forma de ensilagem por forma a promover, para além do eventual aumento do valor nutricional, a sua conservação.

3.2.2. Tratamento sob a forma de silagem

A ensilagem corresponde a um processo de conservação de material vegetal por via húmida em que a fermentação dos hidratos de carbono, que ocorrem naturalmente na forragem fresca, favorece condições ideais de anaerobiose e meio ácido, influenciando a evolução fermentativa de todo o processo. Este processo pode ser dividido em quatro fases: aeróbica, anaeróbica, estável e de utilização. De um modo geral, após a redução do volume de ar na massa armazenada, o oxigénio residual é consumido na respiração da forragem ensilada. Com a anaerobiose obtida tão rapidamente quanto possível criam-se condições para

uma fermentação láctica (preferencialmente levada a cabo por BAL homofermentativas), a qual reduz o pH do material ensilado para valores que permitem a sua conservação (Moreira, 2002).

As características do material vegetal que mais influenciam a sua ensilabilidade são o seu teor em MS, CT e açúcares solúveis. Relativamente à MS, a ensilabilidade é favorecida com teores que podem variar entre 25 e 40% de MS (Merry et al., 2000), dependendo da composição química do material original. De um modo geral, teores médios de MS mais próximos do limite superior são considerados determinantes do processo de conservação uma vez que poderão reduzir a quantidade de ácido láctico necessário para diminuir o pH do material, levando a que a estabilidade se consiga atingir a valor de pH mais elevados.

A CT, que se traduz precisamente no equivalente em ácido necessário para que ocorra esta descida de pH, depende, para além do teor em MS do material, da sua composição em ácidos orgânicos, constituintes minerais e proteína. Quanto mais elevados forem estes teores, maior será a CT do material a ensilar, pelo que maior será a quantidade de ácido necessário para a redução do pH.

Também a composição do material em açúcares solúveis influencia o processo uma vez que permite que a fermentação láctica seja mais rápida e eficiente. A adição de substâncias ricas em açúcares solúveis, em geral subprodutos das indústrias alimentares, interessa considerar quando, no material a ensilar, como é o caso das palhas, os seus conteúdos são reduzidos (Moreira, 2002). Os valores de WSC considerados mínimos para uma boa fermentação são de 25-30 g/kg MV (O'Kiely e Muck, 1998)

A ensilagem constitui, assim, um processo através do qual é possível atingir combinações de diferentes tipos de matérias-primas que se complementam em termos de composição nutricional e de capacidade de conservação. Neste âmbito, a adição de subprodutos da indústria frutícola a diferentes tipos de palhas tem vindo a ser investigada como uma possibilidade de obtenção de produtos de valor acrescentado para alimentação de ruminantes. São alguns exemplos os trabalhos apresentados por Pirmohammadi et al. (2006), Okine (2007), Arbabi et al. (2008), Moselhy et al. (2015) e Ke et al. (2015). Pirmohammadi et al. (2006) reportaram características fermentativas positivas aquando do estudo de silagens de trigo e bagaço de maçã. Os resultados apontaram para valores inferiores de pH, ácido acético e ácido butírico e valores superiores de ácido láctico quando comparados com os valores médios observados em silagens de milho. Ke et al. (2015) apresentam conclusões semelhantes quando compararam as características fermentativas de silagens de alfafa com e sem adição de bagaços de maçã e uva. De acordo com os autores, a adição de qualquer um dos bagaços contribuiu para a diminuição da proteólise e para a melhoria da composição da silagem em AGV de trigo (5 e 10%) em silagens de bagaço de tomate, e verificaram que a

incorporação de 10% de palha resultou na obtenção de silagens de melhor qualidade. No mesmo sentido, Moselhy et al. (2015) observaram uma melhoria das características fermentativas (baixo pH, perdas mínimas de MS, ausência de ácido butírico, baixas concentrações em N-NH₃) e valor nutritivo de silagens de *Hedychium gardnerianum* com a adição de melaços. Resultados similares foram obtidos por Okine (2007) em silagens de rabanete com incorporação de palha de trigo após um período de ensilagem de 30 dias. Para além disso, o autor concluiu que a adição de palha de trigo favoreceu a capacidade de retenção de água do material ensilado, contribuindo, assim, para a diminuição das perdas por efluentes. Arbabi et al. (2008) compararam a utilização de três aditivos (i.e. palha de trigo, polpa de beringela desidratada e polpa de citrinos desidratado) no processo de ensilagem de casca de laranja. Os resultados permitiram concluir que a palha contribuiu de uma forma mais significativa para a redução da degradação da MS do material ensilado.

Atendendo aos valores de produção global anual do feijão-frade, da quantidade de subproduto resultante e o seu valor praticamente nulo para a indústria alimentar, a sua composição química, e considerando as potencialidades dos tratamentos de palhas sob forma de silagem, entendemos que esta é uma espécie que reúne todas as condições para que seja avaliada a possibilidade da sua valorização após combinação com matérias-primas ricas em açúcares hidrossolúveis, como é o caso da maçã. Assim, este trabalho teve como objetivo a análise do valor nutritivo de silagens de palha de feijão-frade e maçã de baixo calibre. Procurou-se avaliar o efeito da incorporação de diferentes proporções destas matérias-primas no valor nutritivo das silagens obtidas e na sua estabilidade aeróbia.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1. PREPARAÇÃO DO MATERIAL

Os trabalhos experimentais realizados neste estudo decorreram durante os meses de Junho e Julho de 2015 no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia, da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, em Vila Real, Portugal.

Para este trabalho, foi utilizada maçã de variedade Golden e categoria II (Anexo I, parte B do Regulamento de Execução (UE) n.º 543/2011), com origem em Portugal. As maçãs foram moídas inteiras até se atingir uma polpa de consistência uniforme, tendo-se utilizado, para tal, uma misturadora.

A palha de feijão-frade (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) utilizada neste estudo foi obtida na empresa Frescura Sublime Unipessoal Lda. (Guimarães, Portugal). No sentido de facilitar o processo de mistura com a maçã, a palha foi previamente moída num moinho de martelos com um crivo circular de 4 cm de diâmetro.



Figura 4 – Maçã em processo de trituração (esquerda) e junção das matérias-primas (direita). (Fonte: Própria, 2015)

Estas matérias-primas foram misturadas manualmente, com o objetivo de se obterem dois níveis de incorporação de palha de feijão-frade: P15 (15% palha e 85% de maçã) e P30 (30% palha e 70% de maçã). A cada uma das misturas foi adicionado ácido propiónico a um nível de incorporação de 0,2%, com o objetivo de se limitar o desenvolvimento excessivo de leveduras.

Após o final deste processo, foram recolhidas duas amostras de cada mistura para posterior análise química. No Quadro 5 são apresentados os dados relativos à composição química das matérias-primas.



Figura 5 – Uniformização das misturas (esquerda) e comparação entre P15 e P30 (direita). (Fonte: Própria, 2015)

Quadro 5 – Composição química das matérias-primas utilizadas no trabalho experimental

	MS	Cinzas	aNDF	ADF	ADL	PB	WSC	Amido
	g/kg	-----g/kg MS-----						
<i>Material original</i>								
Maçã	120	20	139	113	41	28	802	56
Palha de feijão-frade	930	88	619	544	117	144	7	113

4.2. PREPARAÇÃO DAS SILAGENS

Neste estudo foram avaliados 2 períodos de ensilagem (45 e 60 dias) para cada uma das misturas (P15 e P30), realizados em triplicado, perfazendo um total de 12 silos laboratoriais. Assim, cada uma das misturas foi dividida em 6 porções de 3 kg, acondicionadas em 3 sacos plásticos sobrepostos, e colocadas em baldes plásticos de 5 L de capacidade.



Figura 6 – Pesagem do material a ensilar (esquerda) e seu acondicionamento (direita). (Fonte: Própria, 2015)

De seguida, o material foi compactado para uma densidade de 950 kg/m³, fechado e armazenado à temperatura ambiente (temperatura ambiente média de 26°C durante 60 dias). Aquando da abertura dos silos foram recolhidas e congeladas amostras de 200 g por silo laboratorial para posterior análise química. Note-se o horário de abertura dos silos foi idêntico (9h) em ambos os períodos de ensilagem.

4.3. ANÁLISES QUÍMICAS

As amostras das misturas originais e das silagens obtidas foram imediatamente sujeitas a secagem em estufa, com circulação forçada de ar a 50°C, durante 72 horas, tendo sido posteriormente moídas num moinho de martelos com crivo de malha circular com 1mm de diâmetro. Após a moagem, as amostras foram armazenadas em frascos de plástico hermeticamente fechados para análise química.

Para a determinação das variáveis MS, MO, cinzas e PB pelo método de Kjeldahl, foram seguidos os procedimentos recomendados pela AOAC (1990). A determinação dos constituintes da parede celular - fibra do detergente neutro (NDF), fibra do detergente ácido (ADF) e lenhina do detergente ácido (ADL) - foi efetuada com base nos métodos propostos por Robertson e Van Soest (1981) e nas modificações introduzidas por Mascarenhas-Ferreira et al. (1983). Adicionalmente, foi avaliado o teor em N ligado à fibra (N-ADF) utilizando as metodologias propostas por Goering e Van Soest (1970).

O conteúdo em açúcares solúveis em água e amido foi determinado pelo método da antrona (Hansen e Moller, 1975; Irigoyen et al., 1992). As curvas padrão foram preparadas com soluções de glucose de concentração conhecida. Para extração dos açúcares solúveis foram utilizadas 100 mg de cada amostra. Posteriormente, cada amostra foi submetida a uma extração com etanol a 80%. O amido foi extraído com recurso a ácido perclórico (HClO₄) a 30%. De seguida, foram adicionados 3 mL de solução de antrona a 200 µL de extrato e procedeu-se ao seu aquecimento em banho-maria a 100 °C. A leitura das soluções foi realizada por espectrofotometria a 625 nm (Shimadzu UVmini 1240, Kyoto, Japão).

A CT das misturas a ensilar foi avaliada em duplicado de acordo com a metodologia proposta por Moharrery (2007) e definida como a sua resistência à variação de pH de 7 para 5. Assim, foram utilizadas 0,5g de amostra previamente desidratada, sendo posteriormente misturadas com 30 mL de água destilada e desionizada. De seguida, a mistura, mantida sob homogeneização contínua, foi titulada com HCl 1N, sendo registado o volume necessário para que o seu pH atingisse o valor de 5. De igual modo, numa subamostra distinta e utilizando o mesmo procedimento, procedeu-se à titulação da mistura com NaOH 1N, registando-se o volume necessário para que o pH da mistura atingisse o valor de 7. Para este processo de

titulação foi utilizado um potenciômetro (pH-Burette 24, CRISON INSTRUMENTS S.A.). Para a conversão da CT em miliequivalentes por L foi utilizada a seguinte fórmula

$$CT = \frac{(mL \text{ de } HCl \text{ } 1N) + (mL \text{ de } NaOH \text{ } 1N)}{30} \times 10^3$$

em que mL HCl 1N representa a quantidade de HCl 1N necessária para que o pH desça até 5, e mL de NaOH 1N a quantidade de NaOH 1N necessária para que o pH subisse até 7.

Para a determinação do pH, etanol, AGV e ácido láctico nas silagens obtidas, foram recolhidas amostras de 25g de cada silo experimental, sendo posteriormente misturadas em 225ml de água destilada. As misturas foram de seguida homogeneizadas, utilizando uma misturadora (Moulinex DD 3011). A solução obtida foi de seguida filtrada através de papel de filtro Whatman CAT 1004-150 (Whatman International Ltd, Maidstone, Inglaterra). O pH foi determinado diretamente no extrato obtido utilizando um potenciômetro (pH-Burette 24, Crison Instruments S.A.).

Para a determinação do etanol, AGV e do ácido láctico, os extratos foram previamente centrifugados a 4°C a 10 000 RPM durante 15 minutos utilizando uma ultracentrifuga (Modelo Sigma 2K15), sendo utilizado o sobrenadante recolhido para as determinações. As concentrações em etanol e AGV foram avaliadas por cromatografia gasosa (Shimadzu GC-141 B, Kyoto, Japão) utilizando o ácido píválico como padrão interno de acordo com a metodologia proposta por Czerkawski (1976). A separação dos compostos foi realizada com uma coluna capilar (Supelco Nukol, 0,25mm i.d. x 30 m x 0,25 µm) utilizando o He como gás de arrasto. As temperaturas utilizadas durante a análise cromatográfica foram as seguintes: injetor a 210°C, coluna a 135°C e detetor FID mantido a 180°C.

A determinação do ácido láctico foi realizada por espectrofotometria (Shimadzu UV Mini-1240) utilizando um *kit* enzimático (Megazyme, K-DLATE 07/14, Irlanda). A leitura foi realizada em cuvetes de plástico a 25°C e com um comprimento de onda de 340nm.



Figura 7 – Comparação entre silagens P15 e P30 (esquerda) e processo de filtração para análises químicas (direita) (Fonte: Própria, 2015)

4.4. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Por forma a determinar o grau de desenvolvimento de fungos, leveduras, enterobactérias e BAL nas silagens, foram recolhidas amostras de 20 g (uma por silo laboratorial a cada 4 dias até 12 dias após a sua abertura) das quais se recolheram 10 g para homogeneização em Stomacher (STAR Blender LB400, VWR) com 90 mL de soro e posterior diluição sequencial.

As análises foram realizadas utilizando as metodologias padrão para enumeração de bactérias do ácido láctico (BAL) mesofílicas (ISO-15214:1998), *Enterobacteriaceae* (ISO-21528-2:2004) e fungos e leveduras (ISO-21527-1:2008) de preparações, suspensões e diluições de amostras de alimentos para animais.

Para a enumeração de fungos e leveduras, foi preparado o meio de cultura Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) (Liofilchem, Itália), tendo-se realizado a cultura em placa de Petri de 0,1 mL de solução por esfregaço. As BAL e enterobactérias foram enumeradas após placagem de 1 mL de solução por incorporação em meio MRS (Man, Rogosa, Sharpe) Agar (Liofilchem, Itália) e Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG) (Liofilchem, Itália), respetivamente. Os meios DRBC e VRDBA foram placados com diluições de 10^{-2} a 10^{-5} e MRS com diluições de 10^{-2} a 10^{-6} , contabilizando um total de 26 placas por silo (2 placas por diluição). O meio DRBC foi incubado em estufa a 25°C durante 72h, VRDBA a 37°C durante 24h e MRS a 30°C durante 72h tendo-se, de seguida, procedido à contagem das colónias.



Figura 8 – Cultura em placa de Petri para análise microbiológica (esquerda) e exemplo de placa após contagem de BAL (direita) (Fonte: Própria, 2015)

4.5. ESTABILIDADE AERÓBIA

Por forma a avaliar a estabilidade aeróbia das silagens obtidas, foi registada a variação da sua temperatura e pH.

A temperatura das silagens foi avaliada diretamente nos silos experimentais três vezes por dia (9h, 13h e 17h), a partir do momento em que os silos foram abertos e durante um período de 12 dias, utilizando um termómetro digital (K-Type Thermocouple Thermometer HI935005, HANNA INSTRUMENTS, Roménia). Foi estabelecido que a silagem seria aerobicamente estável até ao momento em que o seu valor médio diário de temperatura ultrapassasse a média de temperatura ambiente diária em 2°C (O'Kiely et al., 2001). A temperatura ambiente foi registada ao longo dos dias, em simultâneo com o registo da temperatura das silagens, com recurso a termómetros de mercúrio.



Figura 9 – Silo laboratorial em situação de aerobiose (esquerda) e material para determinação de pH (direita) (Fonte: Própria, 2015)

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram efetuadas com recurso ao programa estatístico JMP 9.0 (2015). Os efeitos do nível de incorporação de palha de feijão-frade (P15 e P30), período de ensilagem (45 e 60 dias) e sua interação nas variáveis estudadas foram avaliados através da análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi utilizado para comparação múltipla de médias, tendo as diferenças entre médias com um valor de P inferior a 0,05 sido consideradas significativas.

5 – RESULTADOS

5.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E VALOR NUTRITIVO DAS SILAGENS

No Quadro 6 é apresentada a composição química das misturas antes do processo de ensilagem. Como esperado, observaram-se diferenças ($P < 0,05$) entre misturas (P15 e P30) para algumas das variáveis analisadas (i.e. aNDF e WSC), como consequência dos diferentes níveis de incorporação das matérias-primas. De facto, a mistura com maior incorporação de palha (P30) apresentou teores mais elevados em MS ($P < 0,01$; 353 vs. 243 g/100g), aNDF ($P < 0,01$; 492 vs. 394 g/kg MS) e ADF ($P < 0,01$; 340 vs. 262 g/kg MS). Pelo contrário, esta mistura apresentou uma menor concentração em WSC ($P < 0,05$) (213 vs. 432 g/kg MS). De salientar ainda que o diferente nível de incorporação de palha de feijão-frade não teve efeito ($P > 0,05$) no teor em PB e na CT das misturas pré-ensilagem.

A composição química das misturas após os distintos períodos de ensilagem é apresentada no Quadro 7. Os resultados obtidos indicam que o nível de incorporação de palha de feijão-frade afetou a composição química das silagens obtidas, apresentando a silagem P30 os teores mais elevados em MS ($P < 0,01$; 314 vs. 199 g/100g), aNDF ($P < 0,01$; 567 vs. 525 g/kg MS) e ADF ($P < 0,05$; 410 vs. 373 g/kg MS) e valores de WSC inferiores (21 vs. 33 g/kg MS). Adicionalmente, o nível de incorporação influenciou ($P < 0,01$) os teores em proteína das silagens, tendo a silagem P30 apresentado uma concentração superior ($P < 0,01$, 134 vs. 121 g/kg MS). De um modo geral, não se observou um efeito do período de ensilagem na composição química das silagens, com exceção dos teores em MS ($P < 0,01$) e ADL, que foram superiores para os 60 dias de ensilagem.

Assim, no Quadro 8 são apresentados os dados relativos à variação da composição química de cada mistura antes do processo de ensilagem e após a abertura dos silos com base apenas no período de ensilagem com 60 dias de duração. Relativamente à evolução das misturas durante a ensilagem, para os dois níveis de incorporação de palha de feijão-frade observou-se uma diminuição da concentração em MS (18 e 13% para as misturas P15 e P30, respetivamente) e WSC (92 e 90% para as misturas P15 e P30, respetivamente). No caso do amido, apenas se observou uma diminuição de 21% no caso da mistura P30. Nas restantes variáveis, como resultado da diminuição da fração MO, verificou-se um aumento proporcional das suas concentrações.

Quadro 6 – Composição química das misturas antes dos períodos de ensilagem

	MS g/kg	Cinzas	aNDF	ADF	ADL	PB	N-ADF	WSC	Amido	CT mEq/L
	-----g/kg MS-----									
Pré-ensilagem										
P15	243	61	394	262	66	102	12	432	86	2,6
P30	353	71	492	340	94	117	14	213	84	1,9
EPM	1,52	0,52	4,66	1,91	6,01	2,57	0,36	17,7	3,56	0,16
Efeito										
Incorporação (I)	0,0004	0,0050	0,0045	0,0012	0,0822	0,0563	0,0476	0,0128	0,8541	0,0839

Quadro 7 – Composição química das misturas após os períodos de ensilagem

	Tempo Dias	MS g/kg	Cinzas	aNDF	ADF	ADL	PB	N-ADF	WSC	Amido
			-----g/kg MS-----							
Silagem										
P15	45	209	74	523	388	106	124	15	31	76
	60	186	75	527	358	95	118	16	35	69
P30	45	325	88	561	413	118	134	15	22	66
	60	303	87	573	409	101	134	16	20	71
EPM	-	4,20	1,15	6,98	15,17	4,41	2,42	0,49	4,7	2,96
Efeitos										
Incorporação (I)	-	<0,001	<0,001	<0,001	0,039	0,078	<0,001	0,919	0,034	0,264
Período (P)	-	0,007	0,717	0,281	0,298	0,013	0,203	0,062	0,862	0,709
I x P	-	0,900	0,542	0,524	0,419	0,567	0,321	0,260	0,510	0,088
Valores médios										
Incorporação										
P15		199	74	525	373	100	121	15	33	72
P30		314	87	567	411	109	134	15	21	69
Período										
45		267	81	542	400	112	129	15	26	71
60		246	81	550	384	98	126	16	27	70

Quadro 8 – Variação da composição química de cada mistura antes da ensilagem e após a abertura dos silos

	MS	Cinzas	aNDF	ADF	ADL	PB	N-ADF	WSC	Amido
	g/kg MS								
P15									
Pré-ensilagem	243	61	394	262	66	102	12	432	86
Silagem	199	78	542	390	106	120	15	25	76
EPM	7,97	1,39	8,34	20,42	5,32	3,72	0,83	12,08	4,94
P value	0,003	<0,001	<0,001	0,003	0,002	0,005	0,015	<0,001	0,058
P30									
Pré-ensilagem	353	71	492	340	94	117	14	213	84
Silagem	307	100	617	468	122	135	20	12	67
EPM	9,40	1,00	7,55	12,54	8,55	2,11	0,46	2,32	2,44
P value	0,011	<0,001	<0,001	0,003	0,177	<0,001	0,139	<0,001	0,001

No Quadro 9 apresenta-se a composição em pH, etanol, AGV e ácido láctico das silagens. O maior nível de incorporação de palha de feijão-frade (P30) resultou num valor de pH mais elevado (4.3 vs. 3.9). Pelo contrário, os níveis de ácido acético, ácido propiónico e ácido láctico foram inferiores comparativamente aos observados com o nível de incorporação P15. De salientar que não foi detetada presença de ácido butírico em nenhuma das silagens. Os resultados obtidos indicam que a duração do processo de ensilagem não influenciou nenhuma das variáveis referidas anteriormente ($P < 0,05$).

5.2. MICROBIOLOGIA

No Quadro 10 é apresentada a carga microbiana das silagens após a abertura dos silos. No momento de abertura dos silos, e independentemente do período de ensilagem, foram detetados valores mais elevados de BAL (8,3 vs. 7,1 log UFC/g), *Enterobacteriaceae* (3,3 vs. 0 log UFC/g) e fungos e leveduras (5,0 vs. 2,4 log UFC/g) na silagem P30.

5.3. ESTABILIDADE AERÓBIA

Como referido anteriormente, a estabilidade aeróbia das silagens após a abertura dos silos experimentais foi medida ao longo de 12 dias (Figura 10), avaliando a evolução da temperatura das silagens relativamente à temperatura ambiente e do pH. Os resultados sugerem que a silagem P15 manteve-se estável durante 168 horas, uma vez que não se registaram alterações ao nível de nenhuma das variáveis supramencionadas. Pelo contrário, a silagem P30 aumentou de temperatura logo após a abertura dos silos, ultrapassando a média de temperatura ambiente diária em 2°C após as 32 horas. Este aumento de temperatura foi constante até às 120 horas com um valor superior à média de temperatura ambiente diária de 13°C. Relativamente ao pH, a silagem P15 não registou alterações ao seu valor de pH aquando da abertura do silo (pH=3,9). Pelo contrário, a silagem P30 registou um aumento substancial do valor de pH após 48 horas, tendo atingido um valor de pH de 9,3 após 240 horas.

Quadro 9 – Composição das misturas em AGV após os períodos de ensilagem

	Tempo	MS	pH	Etanol	Ácido Acético	Ácido Propiónico	Ácido Butírico	Ácido Láctico
	Dias	g/kg		----- g/kg MS -----				
<i>Silagem</i>								
P15	45	209	3,9	14	54	7	ND	72
	60	188	3,7	18	55	8	ND	83
P30	45	325	4,3	18	9	3	ND	69
	60	303	4,3	13	12	2	ND	56
EPM	-	4,26	0,04	1,53	2,51	0,24	-	3,94
<i>Efeitos</i>								
Incorporação (I)	-	<0,001	<0,001	0,862	<0,001	<0,001	-	0,007
Período (P)	-	0,001	0,483	0,752	0,365	0,980	-	0,826
I x P	-	0,967	0,834	0,026	0,571	0,033	-	0,015
<i>Valores médios</i>								
P15		199	3,9	16	55	7	-	77
P30		314	4,3	15	10	2	-	63

Quadro 10 – Populações microbiológicas identificadas nas misturas após o processo de ensilagem.

Silagens	BAL	Enterobacteriaceae	Fungos e Leveduras
	-----log CFU/g-----		
P15	7,1	ND	2,4
P30	8,3	3,3	5,0
SEM	0,48	1,10	0,84
Efeito	0,1130	0.0599	0,0068

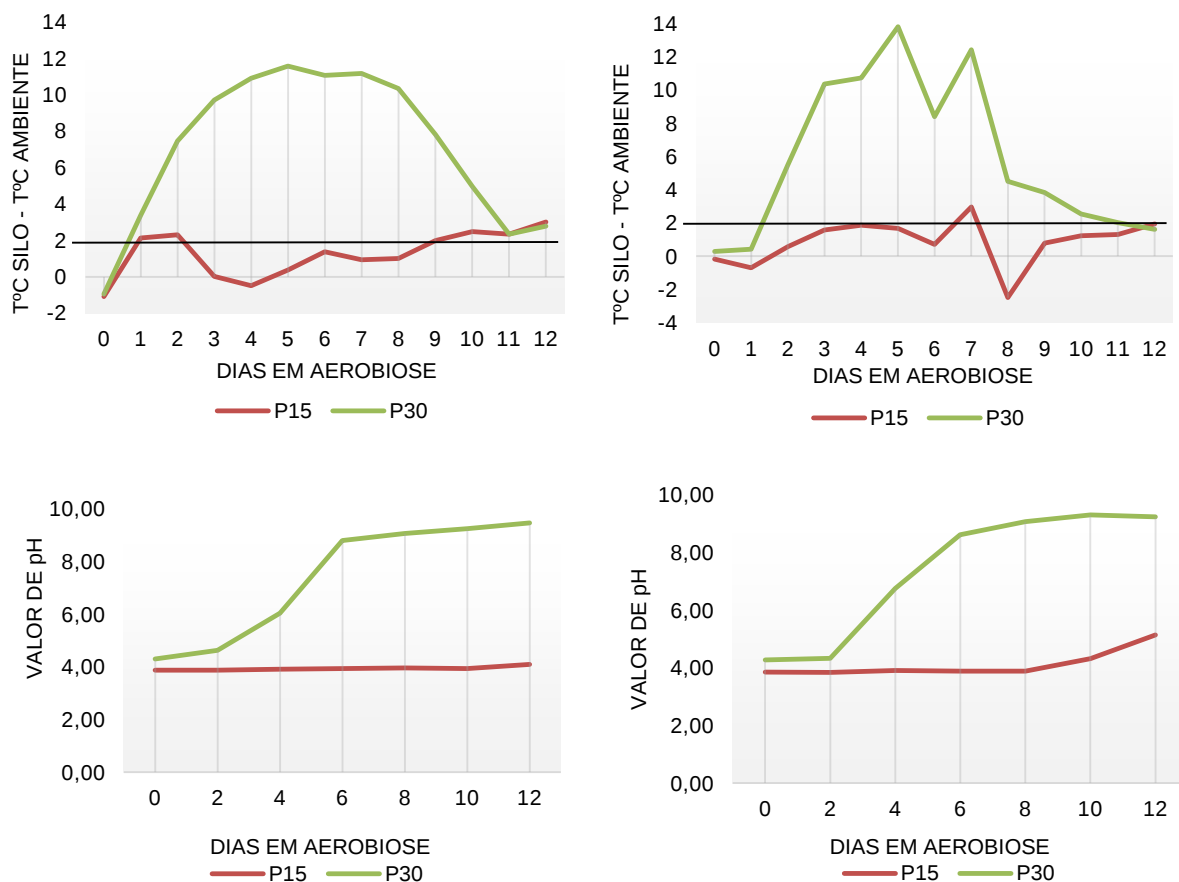


Figura 10 – Evolução da temperatura relativamente à temperatura ambiente e do pH das silagens P15 e P30 abertas aos 45 (esquerda) e 60 dias (direita), durante um período de 12 dias.

6 – DISCUSSÃO

De um modo geral, devido à sua elevada CT e baixa concentração em WSC, as leguminosas apresentam uma baixa ensilabilidade (Owens et al., 1999). Dado que o teor em WSC mínimo para que possa ocorrer uma fermentação adequada se encontra entre 25 e 30 g/kg de alimento (O'Kiely e Muck, 1998) e que as misturas utilizadas neste estudo apresentam valores de WSC que variam entre 75 e 105 g/kg, para P15 e P30, respetivamente, não é de esperar que o processo fermentativo pudesse ter sido limitado devido a este fator. No que diz respeito à CT, as misturas a ensilar apresentaram um valor médio de 2,25 mEq/L. Este valor é inferior aos apresentados por Mohaerry (2007) para silagens de polpa de beterraba e palha de trigo (3,28 a 5,09 mEq/L) e para fenos de leguminosas (5,21 a 5,32 mEq/L). Valores mais próximos são indicados pelos mesmos autores para polpa de beterraba e melaços (1,03 e 2,56 mEq/L, respetivamente).

A variação da composição química das misturas antes de serem sujeitas ao processo de ensilagem acompanhou, de acordo com o que seria expectável, as diferenças ao nível da composição química das matérias-primas originais. A concentração em constituintes da parede celular das misturas, não são comparáveis às obtidas por Rodrigues (2003) em misturas de polpa de maçã e palha de trigo a diferentes níveis de incorporação (aNDF, 503 – 753 g/kg MS, ADF, 317 – 470 g/kg MS, ADL, 46 – 67 g/kg MS). De facto, apesar da composição química das maçãs não apresentar grandes variações, o mesmo não se verifica ao nível das palhas utilizadas nos diferentes estudos. Assim, existem diferenças fundamentais entre leguminosas e gramíneas ao nível dos constituintes da parede celular, sendo normalmente referidos valores superiores para as gramíneas (Van Soest, 1994). É de salientar ainda a importância de considerar as diferenças atribuídas à fase do ciclo vegetativo em que se procedeu ao corte das forragens e respetivos processos de secagem (Moreira, 2002).

O processo de ensilagem resultou, de um modo geral e independentemente da sua duração, em alterações importantes ao nível da composição das misturas em NDF, PB e WSC como anteriormente referido. De facto, verificaram-se aumentos médios de 35 e 17% nas frações NDF e PB, respetivamente, enquanto no caso da fração WSC se observou uma diminuição significativa de 94% relativamente às misturas originais. Esta tendência é normalmente observada e resulta da diminuição proporcional dos WSC, utilizados pela população microbiana durante o processo de ensilagem. No que respeita à composição química das silagens, é possível verificar que noutros trabalhos em que se utiliza a maçã ou subprodutos da agroindústria para valorizar alimentos fibrosos através do processo de ensilagem, os valores obtidos para estas frações são similares. Assim, os valores de NDF reportados por Denek (2006), em silagens de polpa de tomate e palha de trigo, e Pirmohammadi (2006), em silagens de bagaço de maçã e palha de trigo, foram de cerca de 600 g/kg MS. Valores mais baixos são reportados por Ke et al. (2015) em silagens de bagaço de maçã e alfafa desidratada (496 g/kg MS NDF). A mesma tendência é observada para os valores de PB obtidos pelos mesmos autores, variando entre 72 e 168 g de PB/kg MS). No entanto, Rodrigues (2003) apresentam valores de PB inferiores (20 g de PB/kg MS) para silagens de maçã e palha de trigo nas proporções utilizadas neste estudo. No presente estudo, o facto de estarmos a trabalhar com palhas de leguminosas que contêm teores mais elevados de PB justificam estas diferenças.

A maior concentração em AGV para níveis de incorporação de maçã mais elevados é consistente com a reportada por Rodrigues (2003). Uma vez que a maçã é o único material suscetível de ser utilizado pela população microbiana durante o processo de ensilagem, estes resultados eram esperados. No entanto, os níveis de ácido acético e ácido láctico referidos

por estes autores são mais baixos (5,3 e 7,0 g/kg MS, respetivamente) e indiciam uma fermentação acética e láctica limitada, devido à elevada preponderância de leveduras que resultaram em concentrações muito elevadas de etanol (50 g/kg MS). Por este motivo, foi adicionado ácido propiónico às misturas utilizadas no nosso trabalho, o que de acordo com os valores de etanol analisados (15 g/kg MS) terá permitido controlar o desenvolvimento das leveduras.

Os valores de ácido acético obtidos para as diferentes misturas (10,4 e 54,7 g/kg MS, para P30 e P15 respetivamente) sugerem que o processo fermentativo foi distinto. A concentração em ácido acético observada no presente estudo para a silagem P15 é superior à obtida por Pirmohammadi et al. (2006) em silagens de bagaço de maçã com 10% de incorporação de palha de trigo (10 g ácido acético/kg MS). Pelo contrário, níveis semelhantes de ácido acético foram obtidos para o nível de incorporação de 30% de palha de feijão-frade. Estas diferenças poderão ser justificadas pelas diferenças que ocorreram ao nível do processo de ensilagem. De facto, no nosso estudo a fração WSC foi consumida em cerca de 94%, como referido anteriormente, enquanto no trabalho de Pirmohammadi et al. (2006) apenas foram consumidos cerca de 33% de WSC. A concentração mais baixa em ácido acético na silagem P30 sugere uma fase fermentativa acética mais curta e uma entrada na fase fermentativa láctica mais precoce, comparativamente à silagem P15. Pelo contrário, a concentração elevada em ácido acético observada na silagem P15 (55 g ácido acético/kg MS) sugere que a descida do seu pH durante o processo de ensilagem foi lenta. No que respeita aos teores em ácido láctico, observaram-se concentrações mais elevadas na silagem P15 quando comparadas com a silagem P30 o que sugere uma mais intensa atividade das BAL.

A ausência de ácido butírico nas silagens indica que o processo fermentativo ocorreu de tal modo que a fermentação por bactérias do género *Clostridium* foi impedida. Considerando que apenas a silagem P15 atingiu um valor de pH inferior a 4,2, a ausência de ácido butírico em P30 será, muito provavelmente, resultado de uma maior pressão osmótica em consequência de uma maior incorporação de palha. De facto, quando a pressão osmótica é mais elevada, resultado de um teor mais elevado em MS, o pH ao qual se atinge a estabilidade do processo fermentativo pode ser superior (Leibensperger e Pitt, 1987 e Vissers et al., 2007). Kung (2001) refere, para silagens de luzerna com teores em MS de 30-35%, valores de pH ideal a variar entre 4,3 e 4,5. Deste modo, podemos assumir que ambas as silagens se encontravam estáveis aquando do momento da abertura dos silos.

Um dos fatores primordiais que afeta o valor nutritivo das silagens é a sua estabilidade aeróbia após a abertura dos silos. Neste trabalho, a silagem P15 foi a que aparentemente apresentou padrões característicos de um processo de estabilização mais adequado comparativamente a P30 (168 vs. 32 horas, respetivamente, com base no período de

ensilagem com 60 dias de duração). Este facto poderá ficar a dever-se a uma maior concentração de ácido acético na silagem P15. Trabalhos realizados por Muck e O'Kiely (1992), Danner et al. (2003) e Schmidt e Kung (2010) indicam que o ácido acético promove a inibição do crescimento de bolores e leveduras. Obviamente, este efeito será tanto mais eficiente quanto maior for a concentração do material em ácido acético. A carga microbiana de fungos e leveduras observada neste estudo confirmam este pressuposto, dado que as silagens P30 apresentaram valores superiores em cerca de 50% (2,4 logCFU/g em P15 vs 5,0 logCFU/g em P30). Adicionalmente, esta maior carga nestas populações poderá também ter desencadeado um maior consumo de ácido láctico após a abertura dos silos e, assim, condicionado a estabilidade aeróbia da silagem P30, como é possível verificar pelo aumento do valor de pH ao longo do período de medição (Figura 10). Evidências do consumo de ácido láctico por parte das leveduras em condições de aerobiose são referidas por Kung (2001) e Basso (2012).

7 – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a incorporação de maçã favoreceu o processo de ensilagem da palha de feijão-frade uma vez que permitiu que se atingissem teores de MS e WSC que se encontram dentro dos intervalos considerados ideais para que o processo fermentativo pudesse ocorrer.

Foram obtidas silagens estáveis no final dos dois períodos de ensilagem.

Os resultados sugerem que o nível de incorporação de palha de 15% é o mais indicado para a obtenção de silagens estáveis após a abertura dos silos. No entanto, a diminuição dos níveis de hidratos de carbono solúveis foi demasiado elevada em ambas as misturas, pelo que se sugere a realização de novos estudos com a incorporação de um aditivo à base de BAL homofermentativas, de modo a promover uma acidificação mais rápida do material a ensilar.

Mais ainda, considera-se que a avaliação da digestibilidade *in vitro* das silagens obtidas será importante em trabalhos futuros para aferir mais detalhadamente acerca da possibilidade de valorização da palha através deste processo.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agosin, E., Odier, E., 1985. Solid-state fermentation, lignin degradation and resulting digestibility of wheat straw fermented by selected white-rot fungi. *Applied Microbiological Biotechnology* (21): 397-403.

Aiking, H., 2011. Future Protein Supply. *Trend in Food Science & Technology* (22): 112-120.

Aiking, H., de Boer, J., Vereijken, J., 2006. Sustainable Protein Production and Consumption: Pigs or Peas? *Environment & Policy* (45): 1-238.

Angulo, J., Mahecha, L., Yepes, S., Yepes, A., Bustamante, G., Jaramillo, H., 2012. Nutritional evaluation of fruit and vegetable waste as feedstuff for diets of lactating Holstein cows. *Journal of Environmental Management* 95 (2012): 210-214.

Arbabi, S., Ghoorchi, T., Naserian, A., 2008. The effect of dried citrus pulp, dried beet sugar pulp and wheat straw as silage additives on by-products of orange silage. *Asian Journal of Animal Sciences* (2): 35-42.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 1990. *Official Methods of Analysis*. 14th Edition, Vol. 1, AOAC, Washington DC, USA, 684 págs.

Azevêdo, J.A.G., 2009. Avaliação de subprodutos agrícolas e agroindustriais na alimentação de bovinos. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, 154 págs.

Basso, F.C., 2012. Fermentation and aerobic stability of high-moisture corn silages inoculated with different levels of *Lactobacillus buchneri*. *Revista Brasileira de Zootecnia* 41 (11): 2369-2373.

Bhatty, R.S., Christison, G.I., 1984. Composition and nutritional quality of pea (*Pisum sativa*), faba bean (*Vicia faba* L. spp. minor) and lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Plant Food for Human Nutrition* (34): 41–51.

Chander, M., 2010. Urea treatment of straw: hugely extolled rarely used. Successes and failures with animal nutrition practices and technologies in developing countries. *FAO Electronic Conference*.

Cilev, G., Gacovski, Z., Petreski, A., Zdraveski, I., Macedonia, R., 2014. Effect of partial maize substitution in fattening pig rations with by-products from vegetable and fruit processing on some carcass traits. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 17 (2): 104 - 110

Cortez, L., Magalhaes, P., Happi, J., 1992. Principais subprodutos da agroindústria canavieira e sua valorização. *Sociedade Brasileira de Planejamento Energético* (2): 1 – 17.

Costa, A.S.G., 2012. Pele de prata do café: desenvolvimento de um método sustentável de extração de compostos bioativos. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, 63 págs.

Czerkawski, J.W., 1976. The use of pivalic acid as a reference substance in measurements of production of volatile fatty acids by rumen micro-organisms in vitro. *British Journal of Nutrition* (36): 311-316.

Danner, H., Holzer, M., Mayrhuber, E., Braun, R., 2003. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Applied Environmental Microbiology* (69): 562-567.

Denek, N., Can, A., 2006. Feeding value of wet tomato pomace ensiled with wheat straw and wheat grain for Awassi sheep. *Small Ruminant Research* 65 (2006): 260-265

Dentinho, M., Batista, J., Jorge, H., Bessa, R., Moreira, O., 2010. Composição química e valor nutritivo de alimentos para animais. Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária. Disponível em: <http://www.inia.pt/gca/index.php?id=1451>

Dias-Da-Silva, A. A., 1985. Valorização alimentar das palhas de cereais usando a ureia como fonte de amoníaco. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia,

Dias-da-silva, A. A., Guedes, C. V. M., 1990. Variability in the nutritive value of straws cultivars of wheat, rye and triticale and reponse to urea treatment. *Animal Feed Science and Technology* (28): 78-89.

Dias-da-silva, A. A., Sundstøl, F., 1986. Urea as a source of ammonia for improving the nutritive value of wheat straw. *Animal Feed Science and Technology* (19): 67-79.

Dinis, M., 2009. Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. Dissertação de Mestrado, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 69 págs.

Duarte, I., Calado, J., 2014. Proteaginosas - o regresso do grão-de-bico. *Vida Rural* 2015 (2): 34–36.

Duarte, L.C., Esteves, M. P., Carvalheiro, F., Vicente, P., Gírio, F.M., 2007. Os subprodutos agro-industriais de natureza lenhocelulósica: caracterização da situação portuguesa. *Engenharia Química* (5): 56-62.

Erskine, W., Muehlbauer, A., Sarker, A., sharma, B., 2009. The Lentil: Botany, Production and Uses. CABI, 457 págs.

Food and Agriculture Organization, 2009. How to Feed the World in 2050. High-level Expert Forum Executive Summary, Roma, 35 págs.

Food and Agriculture Organization, 2011. The State of Food and Agriculture 2010-2011: 65–82

Food and Agriculture Organization, 2015. The State of Food Insecurity in the World - Meeting the 2015 international hunger targets: taking stock of uneven progress, 62 págs.

Frota, K., Soares, R., Arêas, J., 2008. Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L . Walp), cultivar BRS-Milênio. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* (2007): 470–476.

Gerbens-Leenes, P.W., Nonhebel, S., Krol, M.S., 2010. Food Consumption patterns and economic growth. Increasing affluence and the use of natural resources. *Appetite* 55(3):597-608

Goering H.K., Van Soest, E.P.J., 1970. Forage fiber analyses. Apparatus, reagents, procedures, and some applications. *Agriculture Handbook 379*, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, 24 págs.

Göhl, 1981. Tropical Feeds: feed information summaries and nutritive values. *FAO Animal Production and Health* (12), 544 págs.

Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., 2011. Global food losses and food waste. *Interpack2011 International Conference Proceedings*, 38 págs.

Hansen, J., Moller, I., 1975. Percolation of Starch and Soluble Carbohydrates from Plant-Tissue for Quantitative-Determination with Anthrone. *Analytical Biochemistry* (68): 87-94.

Harcourt, P., 2015. Dual-purpose cowpea (*Vigna unguiculata* L Walp.) straw as sole diet for west african dwarf rams. *Animal Production Research Advances* 7(3): 214 – 220.

Hatakka, Â., 1983. Pretreatment of wheat straw by White-Rot Fungi for Enzymic Saccharification of Cellulose. *European Journal of Applied Microbiological Biotechnology* (18): 350-357.

Hove, E.L., King, S., Hill, G.D., 1978. Composition, protein quality, and toxins of seeds of the grain legumes *Glycine max*, *Lupinus spp.*, *Phaseolus spp.* *Pisum sativum* , and *Vicia faba*. *New Zealand Journal of Agricultural Research* (21): 457–462.

Irigoyen, J.J., Emerich, D.W., Sanchezdiaz, M., 1992. Water-Stress Induced Changes in Concentrations of Proline and Total Soluble Sugars in Nodulated Alfalfa (*Medicago Sativa*) Plants. *Physiologia Plantarum* (84): 55-60.

Jayasuriya, M., Wijeyatunge, C., Perera, H., 1982. Rumen and post-rumen fermentation of spent tea leaf protein and other protein sources studied by the nylon bag method. *Animal Feed Science and Technology* (7): 221-224

Junior, J., Neiva, J., Rodriguez, N., Pimentel, J., Lôbo, R., 2005. Consumo e Digestibilidade de Subprodutos do Processamento de Frutas em Ovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia* (34): 659–669.

Karunanandaa, K., Varga, G.A., 1996. Colonization of rice straw by white-rot fungi (*Cyathus stercoreus*): effect on ruminal fermentation pattern, nitrogen metabolism, and fiber utilization during continuous culture. *Animal Feed Science and Technology* (61): 1-16

Ke, W., Yang, F., Undersander, D., Guo, X., 2015. Fermentation characteristics, aerobic stability, proteolysis and lipid composition of alfafasilage ensiled with apple or grape pomace. *Animal Feed Science and Technology* (202): 12-19.

Kernan, J., Spurr, D., 1978. The effect of reaction conditions during ammoniation on the in vitro organic matter digestibility and the crude protein content of Neepawa wheat straw. *Saskatchewan Research Council* 2 (2).

Klinger, A., Toledo, G., Silva, L., Maschke, F., Chimainski, M., Siqueira, L., 2013. Bagaço de uva como ingrediente alternativo no arração de coelhos em crescimento. *Ciência Rural* (43): 1654-1659.

Kung, L., 2001. *Silage Fermentation & Additives*. 2000-2001 Direct-fed Microbial, Enzyme & Forage Additive Compendium, Miller Publishing, 22 págs.

Leibensperger, R.Y., Pitt, R.E., 1987. A model of clostridial dominance in ensilage. *Grass and Forage Science* (42): 297-317

Lewis, G.P., Schrire, B., Machinder, B., Lock, M., 2005. *Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens, Kew, 577 págs.

Maina, J.G., Kamau, W.N., Kabuage, L.W., 2013. Evaluation of high levels of rice milling byproducts in chicken layer diets: effects on layer performance, egg quality and economic returns. *Livestock Research for Rural Development* 25 (7).

Mascarenhas-Ferreira, A., kersten, J., Gast, C.H., 1983. The study of several modifications of the neutral detergent procedure. *Animal. Feed Science and Technology* (9): 19-28.

Merry, R.J., Jones, R., Theodorou, M.K., 2000. The conservation of grass. *Grass: Its Production and Utilization*, Blackwell Science Publishers, 196-228.

Mesquita, F.R., Corrêa, A.D., Abreu, C., Lima, R., Abreu, A., 2007. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. *Ciência e Agrotecnologia* (31): 1114–1121.

Mirzaei-aghsaghali, A., Maheri-sis, N., 2008. Nutritive Value of Some Agro-Industrial By-products for Ruminants - A Review. *World Journal of Zoology* (3): 40–46.

Mohaerry, A., 2007. The determination of buffering capacity of some ruminant's feedstuffs and their cumulative effects on TMR ration. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences* 2 (4): 72-78

Moreira, N., 2002. Agronomia das forragens e pastagens. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 190 págs.

Morrison, I.M., 1983. The effect of physical and chemical treatments on the degradation of wheat and barley straws by rumen liquor-pepsin and pepsin-cellulase systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (34)1: 1323–1329.

Mortuza, G., Hannan, A., Tzen, J., 2009. Chemical composition and functional properties of *Vicia faba* from Bangladesh. *Bangladesh Journal of Botany* (38): 93–97.

Moselhy, M., Borba, J., Borba, A., 2015. Improving the nutritive, in vitro digestibility and aerobic stability of *Hedychum gardenarium* silage through application of additives at ensiling time. *Animal Feed Science and Technology* (206): 8-18.

Muck, R.E., O’Kiely, P., 1992. Aerobic deterioration of Lucerne (*Medicago sativa*) and Maize (*Zea mais*) silages – Effects of fermentation products. *Journal of Science and Food Agriculture* (59): 145-149

Mwesigwa, R., Mutetikka, D., Kugonza, D., 2013. Performance of growing pigs fed diets based on by-products of maize and wheat processing. *Tropical Animal Health and Production* 41 (3).

O’Kiely, P., Clancy, M., Doyle, E.M., 2001. Aerobic stability of grass silage mixed with a range of concentrate feedstuffs at feed-out.

O’Kiely, P., R. E. Muck., 1998. Grass silage. *Grass for Dairy Cattle*: 223-251.

Okine, A., 2007. Improving the preservation quality of high moisture byproducts feedstuffs by ensilage and use of additives. *Dissertação de Doutorado*, Iwate University, 186 págs.

Pickard, D.W., Swan, H., Lamming, G.E., 2010. Studies on the nutrition of ruminants - The use of ground straw of different particle sizes for cattle from twelve weeks of age. *Animal Production* (11): 543–550.

Pinheiro, E.M., 2013. Composição centesimal e efeito do cozimento no genótipo de feijão-caupi pingo de ouro-1-2. *Journal of Chemical Information and Modeling* (53): 1689–1699.

Pintado, M.E., 2015. Obtenção de Ingredientes de Valor Acrescentado. *Boletim de Biotecnologia* 2015, Universidade Católica Portuguesa: 10-12

Pirmohammadi, R., Rouzbehan, Y., Rezayazdi, K., Zahedifar, M., 2006. Chemical composition, digestibility and in situ degradability of dried and ensiled apple pomace and maize silage. *Small ruminant Research* (66): 150-155.

Rahal, A., Singh, A., Singh, M., 1997. Effect of urea treatment and diet composition on, and prediction of nutritive value of rice straw of different cultivars. *Animal Feed Science and Technology* (68):165–182.

Retore, M., Silva, L., Roraima, A., 2010. Efeito das fibras de coprodutos agroindustriais e sua avaliação nutricional. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 62 (5): 1232-1240.

Robertson, J.B., Van Soest, E.P.J., 1981. The detergent system of analysis and its application to human foods. *The Analysis of Dietary Fiber*: 123-158.

Rodrigues, A., 2003. Utilização da maçã de baixo calibre como suplemento energético da palha de trigo. Dissertação de Mestrado, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 67 págs.

Saadulah, M., Haque, M., Dolberg, F., 1982. Supplementation of alkali treated rice straw. *Tropical Animal Production* (7): 187-190

Saadullah, M.H., Dolberg, F., 1981. Effectiveness of ammonification through urea in improving the feeding value of rice straw in ruminants. *Tropical Animal Production* (6): 30–36.

Sarnklong, C, Cone, J.W., Pellikaan, W., Hendriks, W.H., 2010. Utilization of rice straw and different treatments to improve its feed value for ruminants: A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* (23): 680–692.

Selim, A.S., Pan, J., Takano, T., Suzuki, T., Koike, S., Kobayashi, Y., 2004. Effect of ammonia treatment on physical strength of rice straw, distribution of straw particles and particle-associated bacteria in sheep rumen. *Animal Feed Science and Technology* (115): 117–128.

Silva, S.M., Maia, J., Araújo, J., Filho, F., Rodrigues, F., 2002. Composição Química de 45 Genótipos de Feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). Comunicado Técnico 149, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil, 2 págs.

Singh, B.B., Ehlers, J., Sharma, B., Filho, F.R., 2002. Recent progress in cowpea breeding. Challenges and Opportunities for Enhancing Sustainable Cowpea Production: 22-40.

Singh, S., Das, H., 2004. Usefull byproducts from cellulosic wastes of agriculture and food industry – a critical appraisal. *Clinical reviews in food science and nutrition* (44): 77-89.

Smith, T., Broster, W.H., Broster, V.J., Siviter, J.W., 1981. The effects of grinding, either with or without NaOH treatment, on the utilization of straw by yearling dairy cattle. *The Journal of Agricultural Science* (96):159.

Stehfest, E., Bouwman, L., Detlef, P., Vuuren, V., Elzen, M., Eickhout, B., Kabat, P., 2009. Climate benefits of changing diet. *Climate Change* (95): 83-102

Sundstol, F., 1983/84. Ammonia treatment of straw: Methods for treatment and feeding experience in Norway. *Animal Feed Science and Technology* (10): 173-187.

Sundstol, F., Coxworth, E., 1984. Ammonia treatment. Straw and Other Fibrous By-products as Feed. *Developments in Animal Veterinary Sciences* 14: 196-247.

Van Soest, P.J., 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant. Comstock Publishing Associates.

Vissers, M., Driehuis, F., Te Giffel, M., De Jong, P., Lankveld, J., 2007. Concentration of butyric acid bacteria in silage and relationships with aerobic deterioration. *Journal of Dairy Science* (90): 928-936.

Waagepetersen, J., Vestergaard Thomson, K., 1977. Effect on digestibility and nitrogen content of barley straw of different ammonia treatment. *Animal Feed Science and Technology* (2):131–142.

Wang, N., Daun, J., 2004. The Chemical composition and nutritive value of Canadian pulses. Canadian Grain Commission Report, 85 págs.