



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

***Impactos fermentativos e nutricionais na produção de
TMRS ensiladas com adição de monensina e óleos
essenciais***

Ronnie Coêlho de Andrade

Dourados - MS
Março de 2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

***Impactos fermentativos e nutricionais na produção de
TMRS ensiladas com adição de monensina e óleos
essenciais***

Ronnie Coêlho de Andrade

Orientador: Dr. Marco Antonio Previdelli Orrico Junior

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, da Universidade Federal da Grande Dourados, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Zootecnia. Área de concentração: Produção Animal.

Dourados - MS
Março de 2024

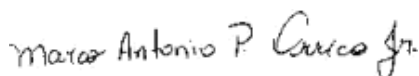
**IMPACTOS FERMENTATIVOS E NUTRICIONAIS NA PRODUÇÃO DE TMRS
ENSILADAS COM ADIÇÃO DE MONENSINA E ÓLEOS ESSENCIAIS**

por

RONNIE COÊLHO DE ANDRADE

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título
de MESTRE(A) EM ZOOTECNIA

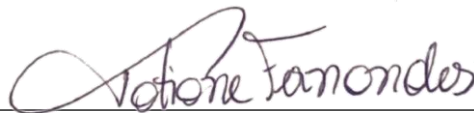
Aprovado em: 12/03/2024



Dr. Marco Antonio Previdelli Orrico Junior
Orientador(a) – UFGD



Dra. Fabiana de Freitas Cardoso
University of Maryland



Dra. Tatiane Fernandes
Virgínia Tech

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

A554i Andrade, Ronnie Coelho De

Impactos fermentativos e nutricionais na produção de TMRS ensiladas com adição de monensina e óleos essenciais [recurso eletrônico] / Ronnie Coelho De Andrade. -- 2024.
Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Marco Antonio Previdelli Orrico Junior.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2024.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Aditivos. 2. Dietas totais. 3. Fermentação. 4. Ionóforo. 5. Limoneno. I. Orrico Junior, Marco Antonio Previdelli . II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

BIOGRAFIA DO AUTOR

O mestrando Ronnie Coêlho de Andrade nasceu na cidade Boa Vista no estado de Roraima em 14/12/1991, filho de Sadiesley Damasceno de Andrade e Herlane Maria da Silva Coelho (servidor público e enfermeira respectivamente). Possui ainda 4 irmãos Sergio Rennes Coelho de Andrade, Rennee Coelho de Andrade, Laura Aline Coêlho de Andrade e Sandy Jhenes Frota Andrade.

Concluiu o ensino médio no Serviço Social do Comércio (SESC) em 2010. Em 2013 ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Federal de Roraima, graduando-se em 2020. No período de pandemia, iniciou dois cursos *Lato sensu*, um sobre Docência para o Ensino Superior pela Universidade da Amazônia (UNAMA) e outro referente à Nutrição Animal, pela Faculdade Unyleya, ambos concluídos em 2023.

Em 2022 ingressou no Programa de Pós-graduação em Zootecnia (PPGZOO), pela Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), na área de Produção Animal, voltada para Conservação de Forrageiras.

DEDICATÓRIA

Primeiramente à Deus pela Fé, coragem e saúde, por sempre me dar forças nas horas mais difíceis, pela oportunidade de abrir as portas para realizar o meu sonho e por me desviar dos caminhos maliciosos.

Para meu pai Sadisley Damasceno de Andrade, mãe Herlane Maria da Silva Coelho e irmãos Sergio Rennes Coelho de Andrade, Rennee Coelho de Andrade, Laura Aline Coêlho de Andrade e Sandy Jhenes Figueredo Frota, que me ajudaram a superar a solidão de estar longe de casa, pelas palavras de força e carinho.

Aos membros de minha família que não mediram esforços, para que o meu sonho de conseguir o título de mestre pudesse tornar realidade, sempre me apoiaram nos momentos difíceis com gestos e palavras incentivadoras. Espero um dia poder retribuir tudo o que já fizeram e fazem por mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus, por iluminar minha trajetória durante todo percurso do mestrado.

A minha família, por sempre estarem ao meu lado me apoiando mesmo estando longe. Meu pai e meu irmão foram muito importantes nessa caminhada tanto pelo incentivo quanto financeiramente. Eu não possuo palavras para descrever todo o sentimento que sinto por eles, são tudo que tenho na vida, pessoas que fizeram muito esforço para que eu concluísse essa caminhada, só tenho a agradecer tudo que vocês fizeram e fazem por mim, amo vocês.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal da Grande Dourados pela oportunidade de ingressar em seu meio acadêmico.

Aos meus amigos que fiz durante minha pós-graduação, em especial a minha amiga Cássia Teodoro pelas caronas oferecidas, Yara América e a Mariany Felex de Oliveira que me ajudaram durante as análises laboratoriais.

Aos professores que tive durante a pós-graduação da Universidade Federal da Grande Dourados por passarem os ensinamentos necessários para a minha formação, em especial ao meu orientador Professor Dr. Marco Antonio Previdelli Orrico Junior e a Professora Dr^a Ana Carolina Amorim Orrico por me orientarem durante essa jornada.

Aos membros do laboratório de Manejo de Forragens e Resíduos.

À Embrapa Agropecuária Oeste, pelo apoio na condução do primeiro ensaio deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGVs – ácidos graxos voláteis;
BAL – bactérias ácido lácticas;
CNF – carboidrato não fibroso;
CO₂ – molécula de gás carbônico;
DIVMS – digestibilidade *in vitro* da matéria seca;
EE – extrato etéreo;
EPM – erro padrão da média;
FDA – fibra em detergente ácido;
FDN – fibra em detergente neutro;
MM – matéria mineral;
MN – matéria natural;
MON – monensina;
MS – matéria seca;
MV – massa verde;
OE - óleo essencial;
OEL - óleo essencial Limoneno;
PB – proteína bruta;
PD – proteína digestível;
PE – perda por efluente;
PG – perda por gases;
pH – potencial hidrogênico;
PIDA – proteína insolúvel em detergente ácido;
PIDN - proteína insolúvel em detergente neutro;
PS - proteína solúvel;
RMS – recuperação de matéria seca;
TMR – ração mista total;

LISTA DE SÍMBOLOS

$>$ - maior;

$<$ - menor;

cm – centímetro;

g – grama;

kg – quilograma;

m – metros;

m^3 – metro cúbico;

mg – miligrama;

t – tonelada;

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	13
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	16
CAPÍTULO 1 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
1 Ração Mista Total ou Ração de Dietas Totais (TMR)	18
1.1 Definição e Histórico	18
1.2 Ensilagem da TMR	19
1.3 Produção e comercialização de TMR no Brasil	20
1.4 Ionóforos	22
1.5 Óleos Essenciais (OEs)	24
1.6 Óleo Essencial Limoneno.....	27
2. OBJETIVOS.....	30
2.1 Geral	30
2.2 Específicos	30
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
CAPÍTULO 2. EFEITOS DA MONENSINA E ÓLEO ESSENCIAL LIMONENO SOBRE A QUALIDADE FERMENTATIVA E NUTRICIONAL DE SILAGENS DE TMR FORMULADAS PARA ATENDER AS EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DE CORDEIROS CONFINADOS E VACAS EM LACTAÇÃO.....	38
1. INTRODUÇÃO.....	40
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3. RESULTADOS	45
4. DISCUSSÃO	49
5. CONCLUSÃO.....	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
CAPITULO 3. INFLUÊNCIA DA MONENSINA SÓDICA E DO ÓLEO ESSENCIAL LIMONENO SOBRE PROCESSO FERMENTATIVO E A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE SILAGENS DE TMR COM DIFERENTES TEORES DE UMIDADE	56
1. INTRODUÇÃO	58
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
3. RESULTADOS	63

4. DISCUSSÃO	68
5. CONCLUSÃO.....	72
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perspectiva de comercialização de TMR ensilada.....	21
Figura 2. Possibilidade do uso de silagem de TMR em fazendas	22
Figura 3. Modelo hipotético.....	24
Figura 4. Esquema dos mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana.....	26
Figura 5. Formas estruturais dos compostos terpenos	28
Figura 6. Biossíntese de limoneno por <i>Yarrowia lipolytica</i>	28
Figura 7 (A). Recuperação de matéria seca (RMS) das silagens de TMR com diferentes teores de umidade e doses de MON e OEL	63
Figura 7 (B). Potencial hidrogeniônico (pH) das silagens de TMR com diferentes teores de umidade e doses de MON e OEL.....	63
Figura 7 (C). Estabilidade aeróbia (EA) das silagens de TMR com diferentes teores de umidade e doses de MON e OEL	63
Figura 8 (A). Teores de ácido láctico das silagens de TMR com diferentes teores de umidade e doses de MON e OEL	65
Figura 8 (B). Teores de ácido acético das silagens de TMR com diferentes teores de umidade e doses de MON e OEL	65
Figura 8 (C). Relação ácido láctico: acético (Lact:Ac) das silagens de TMR com diferentes teores de umidade e doses de MON e OEL	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Países onde silagens de TMR vem sendo produzidas e pesquisadas.....	18
Tabela 2. Proporção dos ingredientes e composição química das TMR formuladas para cordeiros (ensaio 1) e para vacas leiteiras (ensaio 2) em cada um dos ensaios experimentais	42
Tabela 3. Valores de perdas fermentativas, pH, estabilidade aeróbia e perfil fermentativo das silagens de TMR para cordeiros (ensaio 1) submetidas à diferentes doses de MON e OEL	45
Tabela 4. Composição química-bromatológica das silagens de TMR para cordeiros (ensaio 1) submetidas à diferentes doses de MON e OEL.....	47
Tabela 5. Perdas fermentativas, pH, estabilidade aeróbia e perfil fermentativo das silagens de TMR para vacas lactantes (ensaio 2) submetidas à diferentes doses de MON e OEL	48
Tabela 6. Composição química-bromatológica das silagens de TMR para vacas lactantes (ensaio 2) submetidas à diferentes doses de MON e OEL	49
Tabela 7. Proporção dos ingredientes e composição química das silagens de TMR submetidas a alta umidade para vacas leiteiras em cada um dos ensaios experimentais.....	60
Tabela 8. Perdas fermentativas, pH, estabilidade aeróbia e perfil fermentativo das silagens de TMR com diferentes teores de umidade e doses de MON e OEL	61
Tabela 9. Composição química-bromatológica das silagens de TMR com diferentes doses de MON e OEL e submetidas a alta e baixa umidade	67

IMPACTOS FERMENTATIVOS E NUTRICIONAIS NA PRODUÇÃO DE TMR ENSILADAS COM ADIÇÃO DE MONENSINA E ÓLEOS ESSENCIAIS

RESUMO

O uso de aditivos na silagem é uma prática comum para melhorar sua conservação e qualidade nutricional em silagens de rações mistas totais (TMR). Desta forma, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar a influência da adição da monensina sódica (MON) e do óleo essencial limoneno (OEL) na qualidade fermentativa e nutricional das silagens de TMR. Foram avaliados dois ensaios diferentes, sendo o primeiro para avaliar a silagem de TMR para cordeiros em fase crescimento (ensaio 1) com 65% de matéria seca (MS) e outra para vacas lactantes (ensaio 2) com duas condições de umidade (30% e 40% de MS). Para os dois ensaios, foram usando os seguintes tratamentos: controle (sem aditivo), MON35 (35 mg de monensina/kg de MS), MON45 (45 mg de monensina/kg de MS), OEL300 (300 mg de óleo essencial/kg de MS) e OEL600 (600 mg de óleo essencial/kg de MS). Entre os parâmetros avaliados as perdas fermentativas, perfil de ácidos graxos de cadeia curta, estabilidade aeróbica, composição químico-bromatológica e digestibilidade in vitro da MS (DIVMS) das silagens foram analisadas. No ensaio 1, os tratamentos com OEL apresentaram os menores valores de pH e as maiores concentrações de ácido láctico, com o tratamento OEL600 levando à maior estabilidade aeróbica (297,88 h). Em relação à composição nutricional, os aditivos MON e OEL reduziram os teores de MS e carboidratos não fibrosos e apenas os teores de amido dos tratamentos com OEL foram menores que os demais. No ensaio 2, as silagens mais úmidas (30% MS) e com OEL600 e MON35 foram as que tiveram as maiores perdas por gases (2,72 e 2,13% MS respectivamente). As silagens com maiores teores de umidade (30% MS) e com OEL600 apresentaram os menores valores de recuperação de MS (92,66% MS), ácido láctico (5,59% MS) e maior pH (4,17) quando comparadas com silagens com menores teores de umidade (40% MS). As maiores relações ácido láctico:ácido foram observadas nas silagens com maior umidade adicionada com MON45 e MON35 (8,94 e 8,4 respectivamente). O teor de ácido acético foi maior na silagem mais úmida e com OEL600 (1,54% MS). O uso de MON e OEL aumentou a estabilidade aeróbica, com os maiores valores observados para OEL600 (92,35 horas) e MON35 (91,56 horas). Os tratamentos com MON e OEL resultaram em silagens com menores teores de fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido e maiores teores de extrato etéreo e amido quando comparados ao controle. Os aditivos MON e OEL proporcionaram melhores DIVMS, sendo o tratamento com MON35 o que teve a melhor digestibilidade (77,56% MS). Conclui-se que monensina sódica e óleo essencial limoneno podem melhorar a qualidade fermentativa da silagem de TMR sem grandes alterações na composição nutricional. No entanto, OEL deve ser usado em doses menores em silagens mais úmidas para evitar fermentações indesejadas.

Palavras-chave: dietas totais; ionóforo; limoneno; umidade; vacas leiteiras.

FERMENTATIVE AND NUTRITIONAL IMPACTS ON THE PRODUCTION OF TMR ENSEILED WITH ADDITION OF MONENSIN AND ESSENTIAL OILS

ABSTRACT

The use of additives in silage is a common practice to improve its conservation and nutritional quality in total mixed ration (TMR) silages. Thus, the objective of this research was to evaluate the influence of the addition of sodium monensin (MON) and limonene essential oil (OEL) on the fermentative and nutritional quality of TMR silages. Two different trials were evaluated, the first to evaluate TMR silage for growing lambs (trial 1) with 65% dry matter (DM) and the other for lactating cows (trial 2) with two moisture conditions (30% and 40% DM). For both trials, the following treatments were used: control (no additive), MON35 (35 mg of monensin/kg DM), MON45 (45 mg of monensin/kg DM), OEL300 (300 mg of essential oil/kg DM) and OEL600 (600 mg of essential oil/kg DM). Among the parameters evaluated, fermentation losses, short chain fatty acid profile, aerobic stability, chemical bromatological composition and in vitro DM digestibility (IVDMD) of the silages were analyzed. In trial 1, the treatments with OEL presented the lowest pH values and the highest lactic acid concentrations, with the OEL600 treatment leading to the greatest aerobic stability (297.88 h). Regarding the nutritional composition, the additives MON and OEL reduced the DM and non fibrous carbohydrate contents and only the starch contents of the treatments with OEL were lower than the others. In trial 2, the wetter silages (30% DM) and with OEL600 and MON35 were those th at presented the greatest gas losses (2.72and 2.13% DM respectively). Silages with higher moisture contents (30% DM) and with OEL600 showed the lowest DM recovery values(92.66% DM), lactic acid (5.59% DM) and higher pH (4.17) when compared to silages with lower moisture contents (40% DM). The highest lactic acid:acid ratios were observed in silages with higher moisture added with MON45 and MON35 (8.94 and 8.4 respectively). The acetic acid content was higher in the wetter silage and with OEL600 (1.54% DM). The use of MON and OEL increased aerobic stability, with the highest values observed for OEL600 (92.35 hours) and MON35 (91.56 hours). Treatments with MON and OEL resulted in silages with lower neutral detergent fiber and acid detergent fiber conten ts and higher ether extract and starch contents when compared to the control. The additives MON and OEL provided better IVDMD, with the treatment with MON35 having the best digestibility (77.56% DM). It is concluded that sodium monensin and limonene essent ial oil can improve the fermentation quality of TMR silage without major changes in the nutritional composition. However, OEL should be used in lower doses in wetter silages to avoid undesirable fermentations.

Keywords: total diets; ionophore; limonene; moisture; dairy cows.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A ensilagem é umas das práticas de conservação de forragem mais utilizada e difundida no mundo. Essa técnica consiste em submeter a forragem á condições de anaerobiose, permitindo a produção de ácidos orgânicos que são essenciais para que haja a queda do pH e consequentemente promover a conservação do material ensilado por longos períodos.

Embora seja uma técnica muito utilizada para a conservação de forrageiras (apenas alimentos volumosos), também é possível aplicar essa técnica para a conservação de dietas completas (concentrados misturados aos volumosos). De acordo com Bueno et al. (2020) as principais vantagens de ensilar ração mista total (TMR, do inglês: total mixed ration) são: redução da necessidade de mão de obra e de maquinário especializado na fazenda (terceirização do processo), dietas mais uniformes e nutritivas (maior digestibilidade do amido), menor intensidade de seleção de partículas por parte dos animais, elevada estabilidade da dieta no cocho e a possibilidade de uso de diversos coprodutos industriais úmidos (redução dos custos com a alimentação). Outros aspectos favoráveis de ensilar dietas completas, é a inclusão de ingredientes com baixa palatabilidade, maior eficiência do uso de energia e proteína no retículo-rúmen (Teixeira et al., 2019), redução de perdas de nutrientes devido à maior estabilidade aeróbia (Nishino et al., 2003; Nishino et al., 2007) possibilidade de comercialização (Weinberg et al., 2011; Schmidt, Restelatto E Zopollatto, 2017) e estratégia de conservação de forragens com alta umidade (Gusmão et al., 2018). Os fatores limitantes associados a silagens de TMR são: perdas parciais de vitamina A e proteína verdadeira durante o processo fermentativo (Liu, Wu E Shao, (2019); Tian et al., (2020), formulações inadequadas podem causar fermentação indesejável durante a ensilagem (Wang E Nishino, 2013), por ser específico, não pode ser ofertada para outra categoria animal.

Por ser uma dieta completa, as TMR são elaboradas com diversos ingredientes, entre eles: concentrados, forrageiras, coprodutos da agroindústria, aditivos, vitaminas e minerais. Dentre os inúmeros aditivos que podem estar presentes nas TMR, os moduladores de fermentação ruminal vêm ganhando uma atenção especial na última década, em decorrência da melhora dos índices produtivos.

Dentre os compostos que agem melhorando o desempenho dos ruminantes, destacam-se os ionóforos. Os ionóforos são aditivos que atuam como moduladores da fermentação ruminal, pois agem de forma seletiva sob determinados microrganismos, com a finalidade de reduzi-los ou de inibir seu meio de atuação. A monensina é o ionóforo mais conhecido quanto aos seus efeitos sobre

o padrão de fermentação ruminal e na produção animal. No entanto, o uso da monensina foi proibida na União europeia em decorrência a resistência bacteriana.

Diante desse cenário, o uso de fontes naturais que atuam como agentes antimicrobianos, tem se destacado frente aos ionóforos. Nesta perspectiva, tem-se a oportunidade para o desenvolvimento e exploração dos chamados óleos essenciais (OE). Os OEs podem ser definidos como compostos voláteis que estão presentes em determinadas estruturas das plantas. Geralmente são caracterizados por apresentar um forte aroma, sendo derivados do metabolismo secundário dos vegetais. São misturas complexas, uma vez que a composição química da maioria dos OEs é constituída de inúmeros compostos, entre eles os terpenoides e fenilpropanoides. Pesquisas têm demonstrado que os OE possuem ação seletiva sobre os microrganismos ruminais, muito parecida com a monensina (MON) (Matos et al., 2021), mas com a vantagem de serem parcialmente metabolizados pelos animais e excretados em menores quantidades nas fezes.

Outro ponto, que também merece investigação, está relacionado aos possíveis efeitos negativos da inclusão destes moduladores de fermentação (MON ou OE) na produção das silagens de TMR. A princípio, tanto a MON quanto os OE, atuariam como inibidores do crescimento de bactérias do gênero *Lactobacillus spp* (Gram positivo), o que prejudicaria a produção de ácido láctico e, conseqüentemente, a qualidade fermentativa da silagem de TMR. Na literatura não existem, até o momento, trabalhos que comparam a qualidade fermentativa de TMR ensiladas com a presença e ausências de moduladores de fermentação ruminal.

Em função da demanda crescente pela prática da ensilagem de TMR, são necessários estudos que avaliem as possíveis interferências do uso da MON e do OE sobre o processo fermentativo e a qualidade nutricional de silagens de TMR.

CAPÍTULO 1- REVISÃO DE LITERATURA

1. Ração Mista Total ou Ração de Dieta Total (TMR).

1.1 Definição e Histórico

A produção de silagens convencionais à base de forrageiras (milho e sorgo principalmente), ainda é muito adotada pelos produtores. Todavia, o preparo diário para misturar os demais ingredientes da ração requer tempo e mão de obra o que contribui para o aumento nos custos de produção. Como alternativa, silagens de TMR vem com o objetivo de otimizar tempo e baratear os custos com mão de obra.

Silagem de TMR pode ser definida como uma mistura homogenia dos ingredientes que compõem as rações dos ruminantes (Xie et al., 2022). Entre os insumos que entram na confecção das TMR podemos citar as forragens, coprodutos da agroindústria, concentrados, aditivos, minerais e vitaminas, balanceados para fornecer nutrientes suficientes para atender as necessidades de uma determinada categoria animal. A partir da compilação de 32 trabalhos da literatura, Neri et al. (2019) observaram que em média são utilizados 9 ingredientes diferentes na formulação das dietas TMR, porém há casos em que maior número de ingredientes são utilizados (até 18 ingredientes).

Segundo Bueno et al (2020), a silagem de TMR não é uma prática recente, sendo os primeiros estudos datados da década de 60 nos Estados Unidos. Essa prática vem ganhando bastante espaço em diversos países orientais e ocidentais (Tabela 1).

Tabela 1 Países onde silagens de TMR vem sendo produzidas e pesquisadas.

Autores	País	Ano
Owen e Howard	Estados Unidos	1965
Wang e Nishino	Japão	2008
Abdollahzadeh et al.	Irã	2010
Weinberg et al.	Israel	2011
Seppälä et al.	Finlândia	2012
Hu, Hao, Wang	China	2015
Schmdit, Restelatto, Zopollatto	Itália, África do Sul, Argentina, Brasil, Coréia do Sul e Vietnã	2017
Gusmão et al.	Brasil	2018
Restelatto et al.	Brasil	2019
Tian et al., Bueno et al.	China, Brasil	2020
Lazari et al.	Brasil	2021

Do ponto de vista de produção, as silagens de TMR podem não apenas facilitar o fornecimento de alimento de qualidade durante todo o ano e melhorar a eficiência de produção, mas também podem reduzir a pressão em sistemas de pastejos mais intensivos (Chen et al., 2016). Já no ponto de vista ambiental, os coprodutos provenientes das agroindústrias, podem ser usadas para a confecção das TMR, pois quando fermentados podem alterar a sua palatabilidade, tornando-os mais atrativos para os ruminantes (Chen et al., 2016).

1.2 Ensilagem da TMR

Semelhante a ensilagem de forrageiras, o processo fermentativo de dietas totais, consiste na quebra de açúcares disponíveis por bactérias e posteriormente convertidos em ácidos orgânicos (principalmente ácido lático), que por sua vez reduzem o pH do material ensilado (Jobim E Nussio, 2013). Segundo esses autores, os principais fatores que influenciam na qualidade da fermentação são os teores de MS, carboidratos solúveis, capacidade tampão, além dos microrganismos epífitas presentes nas plantas.

Neri et al., (2019) ressalta que dietas totais possuem cerca de 50 a 60% de MS. No entanto, dietas totais com elevados teores de MS, tendem a restringir o crescimento microrganismos (Jobim E Nussio, 2013) e posteriormente reduzem as concentrações de ácidos orgânicos. Cunha et al., (2020), argumentam que teor elevado de MS promove redução da intensidade de fermentação, resultando em pH final mais elevado. Segundo Silva, (2001), são necessários 6 - 8% de carboidratos solúveis para que o processo fermentativo ocorra de forma desejável. A capacidade tampão em silagens de TMR, pode ser afetada pelo teor de proteína bruta, minerais e pela inclusão de tampões (Andrade, 2021). No entanto, por mais que a capacidade tampão interfira na redução do pH, ela possibilita um incremento na produção de ácido lático (Jobim E Nussio, 2013).

A presença de microrganismos epífitas na ensilagem de forrageiras influenciam diretamente o curso da fermentação. Bactérias que proporcionam fermentações homoláticas e heteroláticas são desejáveis, pois além de reduzirem o pH da silagem com perdas reduzidas de MS, também retardam a deterioração aeróbia. Por outro lado, fermentações por enterobactérias e clostrídios são indesejáveis, pois promovem perdas de MS, tornam a silagem menos palatável e podem impactar na saúde do animal (Andrade, 2021).

Durante o processo de fermentação das silagens de TMR, ocorre a produção de ácidos orgânicos, compostos nitrogenados, álcoois, aldeídos, ésteres e cetonas (Bueno et al., 2020).

Dentre os ácidos orgânicos produzidos, o ácido láctico é o de maior importância, pois diminui o pH, preserva a MS e a energia da dieta. Os ácidos acético e propiônico também desempenham funções favoráveis no controle de fungos e na estabilidade aeróbia após a abertura do silo (Neri et al., 2019).

1.3 Produção e comercialização de TMR no Brasil

Assim como outras, as silagens de TMR apresentam capacidade de comercialização. A compra de silagem de TMR em sacos ou fardos pode ser uma estratégia viável para pequenos produtores que não possuem recursos financeiros para investir em maquinário e estruturas de armazenamento de ração (Bueno et al. 2020).

Os mesmos autores descrevem que a confecção dessas silagens a níveis industriais, normalmente é feita a partir da mistura dos ingredientes em vagões misturadores estacionários e posteriormente armazenamento em bags ou enfardamento com compactadoras agrícolas. Os fardos de TMR resultantes têm aproximadamente 1000 kg de matéria fresca (Restelatto, et al., 2019), e alta densidade (324 a 499 kg de MS/m³) (Borreani, Ferrero E Tabacco, 2019), o que tem sido associado à baixa perda de nutrientes durante o armazenamento, mesmo quando o filme plástico sofre algum tipo de injúria (Restelatto, et al., 2019). No entanto Os mesmos autores ainda ressaltam que a desvantagem desta estratégia está relacionada ao manuseio inadequado dos fardos durante o transporte e armazenamento na fazenda (principalmente devido ao seu peso) que pode levar ao aparecimento de alguns danos no filme plástico que podem facilitar a penetração do ar na massa ensilada.

Ainda segundo Bueno et al. (2020), quando a silagem de TMR é produzida na própria fazenda, ela pode ser armazenada em diferentes tipos de silos. Os autores ainda recomendam que para pequenos rebanhos, estruturas como sacos agrícolas, bolsas, tambores e fardos são mais aconselháveis do que silos trincheira ou superfície, pois reduzem o risco de deterioração aeróbica durante a alimentação.

Restelatto, (2018), através de um questionário online aberto para todas as regiões do Brasil, reuniu informações de fazendeiros (n =175) a respeito da comercialização de silagens de TMR (Figura 1). Dos 175 fazendeiros que responderam, 47% nunca ouviram falar a respeito da comercialização de silagens de TMR, sendo 22% que já ouviram falar sobre a silagem de TMR, mas que não tinham certeza e apenas 31% que possuíam informações sobre a venda de silagens de TMR. Esta pesquisa demonstrou que a comercialização de silagens de TMR é bastante

desconhecida para muitos produtores, provavelmente por ser um nicho de mercado relativamente novo.

Possibilidade de Comercialização de TMR Ensilada

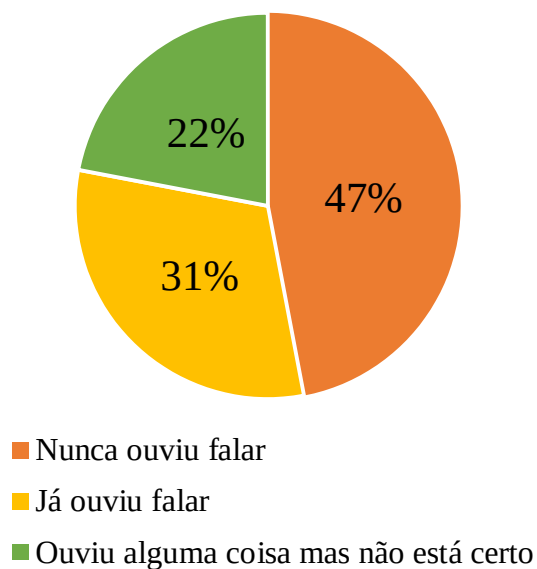


Figura 1 Perspectiva de comercialização de TMR ensilada adaptado de Restelatto, (2018).

Outra pergunta respondida pelos fazendeiros foi a respeito das silagens de TMR serem adotadas em suas fazendas (Figura 2). Segundo a pesquisa, 51% dos entrevistados demonstraram interesse sobre essa técnica de ensilagem e que poderiam adota-la em suas fazendas, enquanto que 39% ficaram indecisos e 10% preferiram não utiliza-las em suas fazendas.

Silagem de TMR poderia vir a ser usada em sua fazenda ?

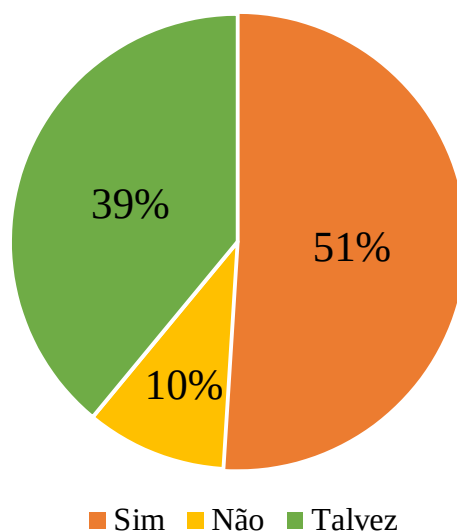


Figura 2 Possibilidade do uso de silagem de TMR em fazendas adaptado de Restelatto, (2018).

Independente da indecisão ou da recusa, por parte dos produtores, os autores consideraram os resultados da pesquisa satisfatórios, além de indicarem um grEe potencial de crescimento deste tipo de tecnologia.

1.4 Ionóforos

Nos últimos anos, técnicas de melhoramento genético, nutrição e manejo, contribuíram significativamente para o aumento de índices zootécnicos nas fazendas. Salman, (2006), relata que um desenvolvimento relevante para a produção de animais de interesse zootécnico, foram os chamados aditivos promotores de crescimento e entre eles destacam-se os ionóforos.

Os ionóforos são poliésteres carboxílicos, classificados como antibióticos e produzidos a partir de linhagens de *Streptomyces* (Russel E Strobel, 1989). São capazes ainda de transportar íons através da membrana celular, o que permite sua passagem pela membrana lipídica e interferindo no equilíbrio Na/K (Paula, 2021). Dentre os vários tipos de ionóforos existentes, a monensina sódica é a mais utilizada.

A monensina sódica é um poliéster monovalente produzida através da cepa de bactéria *Streptomyces cinnamomensis*, e era utilizada originalmente para tratar casos de coccidiose em aves,

mas passou-se a ser mais empregada na bovinocultura devido aos seus efeitos desejados na nutrição de ruminantes.

Segundo Russell E Strobel (1989), a monensina atua inibindo a formação de compostos produzidos pelas bactérias Gram-positivas (hidrogênio, formato e amônia) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (acetato e butirato), dessa forma a um aumento do teor de propionato e declínio dos teores de acetato e butirato que resultam na melhoria do metabolismo energético e do nitrogênio. Posteriormente a mudança que ocorre nos teores dos AGCC promove a diminuição da produção do metano devido ao declínio de seus precursores (H_2 e formato). McGuffey, Richardson E Wilkinson (2001), relatam que a monensina reduz a degradação de peptídeos e de aminoácidos no rúmen, proporcionando um aumento de proteína dietética no trato gastrointestinal. González et al., (2012), citam que a monensina proporciona alteração no mecanismo de saciedade do animal e consequentemente reduzindo a quantidade de alimento ingerido e aumento das frequências das refeições. Além disso, a monensina atua prevenindo distúrbios metabólicos e variações de pH (Burrin E Britton, 1986).

O mecanismo de ação dos ionóforos sobre as bactérias está associada com fatores de resistência da parede celular, sendo a bomba iônica responsável por regular o balanço químico entre o meio interno e externo da célula. Quando o ionóforo liga-se ao cátion de maior afinidade, movimentam-se através da membrana celular para dentro das bactérias, desencadeando a saída de K^+ e entrada de H^+ , levando ao acúmulo de H^+ no citoplasma e consequentemente reduzindo o pH citoplasmático. Em resposta, as bactérias utilizam o transporte ativo (com gasto de energia) para dissipar o acúmulo de H^+ , o que leva a uma redução da divisão celular das bactérias (McGuffey, Richardson E Wilkinson, 2001). Dessa forma, a bomba iônica não consegue compensar o gasto energético desencadeado pelos ionóforos e consequentemente levando a morte das bactérias (Russell E Strobel, 1989). Russell E Strobel (1989) desenvolveram um esquema (Figura 3), explicando a atuação da monensina sódica inibindo o desenvolvimento do *Streptococcus bovis* (bactéria Gram-positiva) no rúmen.

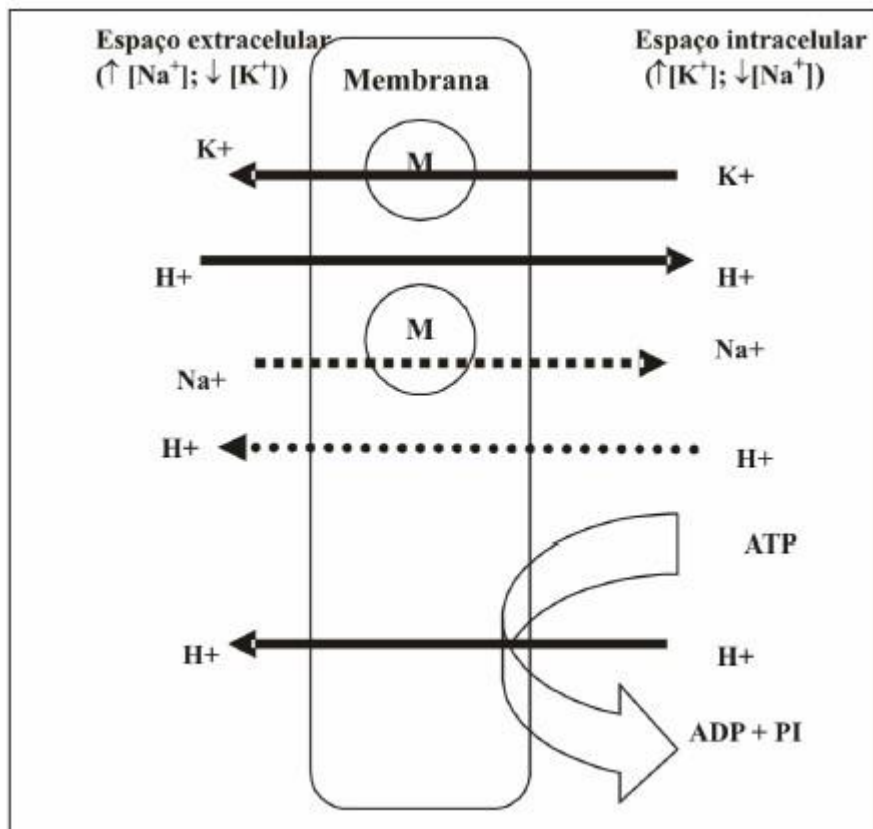


Figura 3 Modelo hipotético desenvolvido por Russell E Strobel (1989).

Na figura 3 o Na^+ é o cátion de maior concentração no meio extracelular em relação ao K^+ . Inicialmente ocorre a saída de K^+ do meio intracelular e entrada de H^+ no meio intracelular, provocando mudança do gradiente iônico devido a maior concentração de K^+ . O H^+ que se acumula no meio intracelular promove a diminuição do pH. A célula em resposta a esta queda no pH, começa a exportar H^+ para o meio extracelular e permitindo a entrada de Na^+ no meio intracelular. Esse ciclo se repete várias vezes e a célula na tentativa de manter o pH citoplasmático e o equilíbrio iônico passa a consumir energia e posteriormente sendo incapaz de manter seu metabolismo energético, reduz sua capacidade de crescimento e reprodução e morre.

1.5 Óleos Essenciais (OEs)

Nas últimas décadas, agentes antimicrobianos naturais, como os OEs, têm chamado atenção em virtude de suas propriedades físico-químicas e diversas atividades biológicas (Asbahani et al., 2015). Segundo Hyldgaard, Mygind E Meyer (2012), os OEs constituem numa importante ferramenta na preservação de alimentos devido às suas propriedades antimicrobianas

naturais. Entretanto é necessário mais esclarecimentos dos componentes individuais dos OE, de suas propriedades antibacterianas, mecanismo de ação e dos organismos alvo para apoiar a implementação dos OE como conservantes de alimentos (Angane et al., 2022).

Os OEs são compostos líquidos, bioativos, voláteis, com odor e cor característicos. São formados a partir de metabólitos secundários de plantas, presentes em todos os órgãos tais como brotos, flores, cascas, sementes, raízes (Brah et al., 2023), folhas, caules, galhos e frutas (Bouabdallah et al., 2022; Brah et al., 2023). Esses compostos se formam no citoplasma e geralmente existem como pequenas gotículas comprimidas entre as células (Angane et al., 2022). Hyldgaard, Mygind E Meyer (2012) classificaram os compostos ativos dos OEs em quatro grupos: terpenos (limoneno, p-cimeno, terpineno, sabineno e pineno), terpenóides (timol, carvacrol, linalol, acetato de linalila, citronelal, piperitona, mentol e geraniol), fenilpropenos (eugenol, o isoeugenol, a vanilina, o safrol e o cinamaldeído) e outros (alicina e o isotiocianato de alila).

A atividade antibacteriana dos OEs não depende apenas de um modo de ação específico, isto é, os OEs podem atacar vários alvos da célula para inativar a bactéria (Hyldgaard, Mygind E Meyer 2012). Devido à complexidade de compostos químicos, das condições ambientais e das estruturas das bactérias alvo (bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas) dos OEs (Swamy, Akhtar E Sinniah, 2016) se torna difícil detectar qual mecanismo de ação foi mais eficiente em cessar as atividades microbianas. Burt, (2004); Cho et al., (2020) relatam os possíveis mecanismos de ações dos OEs em bactérias, sendo eles: a desintegração da membrana externa ou da bicamada fosfolipídica, alteração da composição de ácidos graxos, aumento na fluidez da membrana resultando em vazamento de íons e prótons de potássio, interferência com captação de glicose e inibição da atividade enzimática ou lise celular (Figura 4).

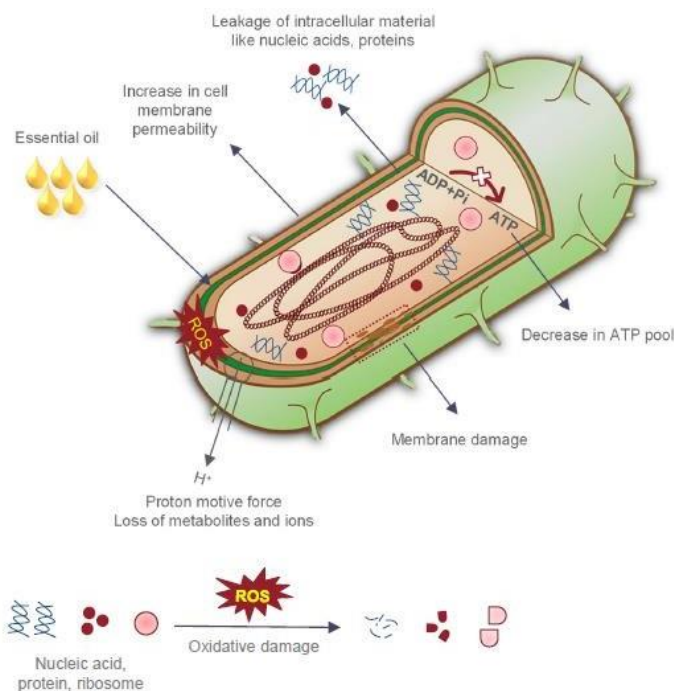


Figura 4 Esquema dos mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana por Angane et al., (2022).

Segundo Fisher E Phillips, (2008) compostos terpênicos podem desestabilizar a estrutura lipídica das bactérias, levando à um quadro de desintegração da membrana celular, desnaturação das proteínas celulares, vazamento de material citoplasmático, e posteriormente causando lise e morte celular. Cristani et al. (2007) relataram que a atividade antimicrobiana está relacionada com a capacidade dos terpenos em causar danos não apenas a permeabilidade, mas também em estruturas das membranas celulares. Esses compostos podem atravessar as membranas celulares, penetrando assim no interior da célula e interagindo com substâncias intracelulares críticas.

Segundo Fisher E Phillips, (2008) os terpenos possuem a capacidade de romper e penetrar as estruturas lipídicas da parede celular das bactérias, levando à desnaturação das proteínas e destruição da membrana celular e consequentemente levando a um extravasamento do citoplasma, lise celular e eventualmente morte celular. Griffin et al., (1999), sugeriram que compostos terpenos e terpenóides podem impactar na fosforilação oxidativa ou na captação de oxigênio nas células microbianas, inibindo assim o crescimento microbiano. Posteriormente essa sugestão sustentada por Zengin E Baysal, (2014) onde os autores observaram que compostos terpênicos como linalol, α -terpineol e eucaliptol danificam a membrana celular e alteram a estrutura morfológica. Ademais, Togashi et al., (2010) complementa que compostos terpênicos interagem com as proteínas da membrana e os fosfolipídios, levando à inibição da cadeia respiratória celular, à interrupção da fosforilação oxidativa, à interrupção da síntese de ácidos nucleicos e à perda de metabólitos.

Para Hyldgaard, Mygind E Meyer (2012), alguns compostos antimicrobianos que interagem com a membrana podem causar despolarização ou aumento da permeabilidade através de vários mecanismos como: peptídeos antimicrobianos que formam poros (Fantner et al., 2010) enquanto outros compostos possuem um efeito fluidez na membrana (Cristani et al., 2007).

Ademais, a comissão europeia e a Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA) consideram certos compostos aromáticos de óleos essenciais como linalol, timol, eugenol, carvona, cinamaldeído, vanilina, carvacrol, citral, limoneno, cravo, orégano, tomilho, noz-moscada, manjerição, mostarda e canela, geralmente reconhecidas como seguras (GRAS) e não apresentam risco à saúde (Hyldgaard, Mygind E Meyer, 2012).

1.6 Óleo Essencial Limoneno (OEL)

O limoneno é um monoterpeno cíclico, presentes em mais de 300 espécies de plantas (Ren et al., 2020; Mahato et al., 2019) e são encontradas nas formas de dois isômeros ópticos D e L limoneno (Klimek-Szczykutowicz, Szopa E Ekiert, 2020). O limoneno é o composto majoritário em frutas cítricas (Guo et al., 2018; Ambrosio et al., 2019) e que participa na atividade antimicrobiana (Gupta, 2022).

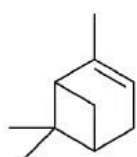
Segundo Hyldgaard, Mygind E Meyer (2012), o OE pertence ao grupos dos terpenos junto com o p-cimeno, terpineno, sabineno e pineno (Figura 5). Embora os grupos terpenos e terpenóides constituem uma classe significativa de compostos em OEs (Angane et al., 2022), os terpenos não representam um grupo de constituintes com elevada atividade antimicrobiana inerente (Hyldgaard, Mygind E Meyer, 2012).

Ambrosio et al., (2019) argumentam que os teores de limoneno são diferentes para cada tipo de frutas cítricas. Bourgou et al., (2012), mensurou concentrações variadas de limoneno, sendo a laranja amarga (*Citrus aurantium*) com 67,90–90,95% de limoneno, limão (*Citrus limon*) 37,63–69,71% de limoneno, laranja maltase (*Citrus sinensis*) com 81,52–86,43% de limoneno, e tangerina (*Citrus reticulate*) com 51,81–69,0% de limoneno.

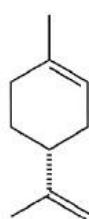
O OEL é bastante empregado em múltiplos setores da indústria, variando como aditivo de sabor e fragrância em alimentos (Ciriminna et al., 2014), produtos cosméticos (Jongedijk et al., 2016), na indústria farmacêutica (Anandakumar, Kamaraj E Vanitha, 2021), pesticida ambiental (Ibanez, Sanchez-Ballester E Blazquez, 2020) e como solventes e aditivos em combustíveis de aviação (Zhang E Zhao, 2015).

Terpenes

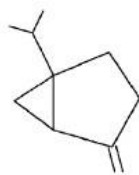
Monoterpenes



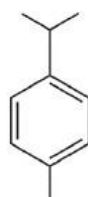
α -Pinene



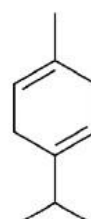
Limonene



Sabinene

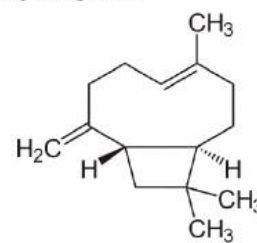


p-Cymene



γ -Terpinene

Sesquiterpenes



β -Caryophyllene

Figura 5 Formas estruturais dos compostos terpenos por Hyldgaard, Mygind E Meyer, (2012).

Recentemente descobriu-se que certas cepas de leveduras como a *Yarrowia lipolytica* (GRAS) são capazes de produzir limoneno através de biossíntese (Li et al., 2022), utilizando precursores como acetil-CoA, ATP, NADH e malonil-CoA (Muhammad et al., 2020) para a síntese de limoneno (Figura 6).

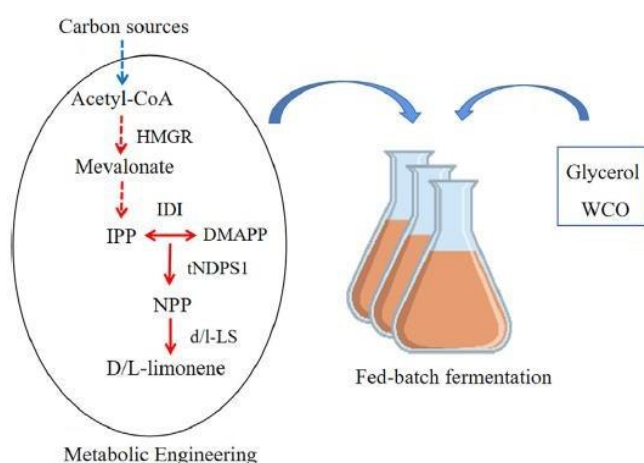


Figura 6 Biossíntese de limoneno por *Yarrowia lipolytica* por LI et al., (2022).

Existem muitas controversas quanto à eficácia antimicrobiana do limoneno em diversas cepas bacterianas. Fancello et al., (2016) relata baixa atividade antimicrobiana do limoneno quando o composto é puro em doze bactérias e quatro leveduras. Rammanee E Hongpattarakere, (2011), ao utilizarem OEL puro, ou citronelal ou citronelol em bactérias *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, os autores observaram que o limoneno puro teve uma atividade antifúngica cinco vezes menos eficiente. Em contrapartida os mesmos também observaram que quando o limoneno puro junto com citronelal e citronelos tiveram efeitos sinérgicos em inibir as atividades de *A. flavus* e *A. parasiticus*.

Abd-Elwahab et al., (2016) relatam que a atividade antibacteriana dos OEs extraídos de cascas de frutas cítricas (laranja, limão, tangerina e toranja), sendo moderada a alta contra

Staphylococcus aureus, *Bacillus subtilis*, *Escherichia faecalis*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Pseudomonas aeruginos*. A presença de cumarina e tetrazeno na casca de limão (Saleem E Saeed, 2020) e citral, limoneno e linalol (Abd-Elwahab et al., 2016) apresentaram uma maior atividade antimicrobiana contra essas bactérias.

Han, Sun E Chen, (2020) avaliou o mecanismo antibacteriano do limoneno em *Listeria monocytogenes*. Os autores relataram que o limoneno distorceu a estrutura da parede celular das bactérias que levou a um vazamento de moléculas intracelulares, como ácidos nucleicos e proteínas, afetou posteriormente a funcionalidade dos complexos da cadeia respiratória e dificultou o processo de síntese de trifosfato de adenosina (ATP). Segundo Saad, Muller E Lobstein, (2013), a atividade antimicrobiana do limoneno é devido à presença do substituinte alquenil e de uma ligação dupla na estrutura molecular que aumenta sua atividade antimicrobiana.

Embora o limoneno esteja sendo aplicado em múltiplas áreas industriais, além de atuarem como agentes antimicrobianos, pouco se sabe sobre o seu desempenho em conservação de forrageiras e seu desempenho na nutrição de ruminantes. Bravo-Martins (2004), ao avaliar a inclusão de extratos vegetais de alecrim (*Rosmarium officinalis*), capim limão (*Cymbopogon citratus*), capuchinha (*Tropaeolum majus*), hortelã (*Menthapiperita*) e sálvia (*Salvia officinalis*) na produção de silagem de cana-de-açúcar, observou efeito inibitório no desenvolvimento de leveduras, surgindo assim como alternativa promissora para preservar a qualidade fermentativa no processo de ensilagem. Chaves et al., (2012), ao avaliar a silagem de cevada com inclusão de OE de eugenol, timol e carvacrol ou limoneno nas concentrações de 37, 5, 75 e 120 mg/kg na MS, observaram uma redução no crescimento de leveduras por até 7 dias quando a silagem era exposta ao ar.

Kung et al., (2008), avaliando forragem fresca de silagens de milho com OE de timol, eugenol, vanilina, limoneno em concentrações de 40 e 80 mg/kg, não observaram efeitos na estabilidade aeróbia e na resistência em diminuir o pH das silagens.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

O objetivo do presente experimento foi determinar os efeitos de doses de monensina sódica (MON) e do óleo essencial Limoneno (OEL) sobre o processo fermentativo e a qualidade nutricional de silagens de TMR.

2.2. ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos da inclusão de MON e OEL sobre a qualidade do processo fermentativo e a composição química de silagens de TMR formuladas para atender as exigências nutricionais de cordeiros confinados e vacas em lactação.

Avaliar os efeitos da inclusão de MON e OEL sobre a qualidade do processo fermentativo e a composição química de silagens de TMR com diferentes teores de umidade

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd-Elwahab, S.M., El-Tanbouly, N.D., Moussa, M.Y., Abdel-Monem, A.R., Fayek, N.M., 2016. Antimicrobial and Antiradical Potential of Four Agro-waste Citrus Peels Cultivars. *J. Essent. Oil-Bear. Plants.* 19, 1932–1942. doi:10.1080/0972060X.2016.1232609.
- Abdollahzadeh, F., Pirmohammadi, R., Fatehi, F., Bernousi, I., 2010. Effect of feeding ensiled mixed tomato and apple pomace on performance of holstein dairy cows. *Slovak J. Anim. Sci.* 43, 31-35. doi:10.4081/ijas.2010.e41.
- Alves, J.P., Galeano Jara, E.S., Orrico Junior, M.A.P., Fernandes, T., Retore, M., Silva, M.S.J., Orrico, A.C.A., Lopes, L.S., 2022. The influence of plant age and microbes-enzymatic additives on fermentation of total mixed ration silages of Capiacu grass (*Pennisetum purpureum*, Schum). *Trop. Anim. Sci. J.* 45, 56–63.
- Ambrosio, C.M.S., Ikeda, N.Y., Miano, A.C., Saldaña, E., Moreno, A.M., Stashenko, E., Contreras-Castillo, C.J., Da Gloria, E.M., 2019. Unraveling the selective antibacterial activity and chemical composition of citrus essential oils. *Sci. Rep.* 9, 17719. doi: 10.1038/s41598-019-54084-3.
- Anandakumar, P., Kamaraj, S., Vanitha, M.K., 2021. D-limonene: a multifunctional compound with potent therapeutic effects. *J. Food Biochem.* 45, e13566. doi: 10.1111/jfbc.13566.
- Andrade, G. R. T. Silagens de dieta total com inclusão de coprodutos submetidas a quatro tempos de estocagem, com e sem aditivo. 2021. 63 f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós - Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária – FAMEV-UFU, Uberlândia, 2021.
- Angane, M, Swift, S, Huang, K, Butts, C.A, Quek S.Y., 2022. Essential Oils and Their Major Components: An Updated Review on Antimicrobial Activities, Mechanism of Action and Their Potential Application in the Food Industry. *Foods.* Feb 4;11(3):464, 2022. doi: 10.3390/foods11030464.
- Asbahani, A.E., Miladi, K.; Badri,W., Sala, M., Addi, E.H.A., Casabianca, H., Mousadik, A.E., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F.N.R., 2015. Essential oils: From extraction to encapsulation. *Int. J. Pharm.* 483, 220–243. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.12.069.
- Borreani, G.; Ferrero, F.; Tabacco, E. Baled silage management. In *Proceedings of the 6th International Symposium on Forage Quality and Conservation*, Piracicaba, Brazil, 7–8 November 2019. Eds.; ESALQ: Piracicaba, Brazil, p. 219–246, 2019.
- Bouabdallah, S., Cianfaglione, K., Azzouz, M., Batiha, G.E., Alkhuriji, A.F., Al-Megrin, W.A.I., Ben-Attia, M., Eldahshan, O.A., 2022. Sustainable extraction, chemical profile, cytotoxic and

- antileishmanial activities in-vitro of some citrus species leaves essential oils. *Pharmaceuticals*. 15, 1163. doi: 10.3390/ph15091163.
- Bourgou, S., Rahali F.Z., Ourghemmi, I., Saïdani Tounsi, M., 2012. Changes of peel essential oil composition of four Tunisian citrus during fruit maturation. *Scientific World Journal*, v.52, p. 85-93. doi: 10.1100/2012/528593.
- Brah, A.S., Armah, F.A., Obuah, C., Akwetey, S.A., Adokoh, C.K., 2023. Toxicity and therapeutic applications of citrus essential oils(CEOs): A review. *Int. J. Food Prop.* 26, 301–326. doi.org/10.1080/10942912.2022.2158864
- Bravo-Martins, E. C. Identificação de leveduras envolvidas no processo de ensilagem de cana-de-açúcar e utilização de extratos vegetais como seus inibidores. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras, 2004.
- Bueno, A.V.I., Lazzari, G., Jobim, C.C., Daniel, J.L.P., 2020. Ensiling total mixed ration for ruminants: A review. *Agronomy* 10. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060879>.
- Burrin, D., Britton, R., 1986. Response to Monensin in Cattle during Subacute. *J. of Anim. Sci.* 63, 888-893. doi: 10.2527/jas1986.633888x.
- Burt, S., 2004. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in food – a review. *Int. J. Food Microbiol*, 94, 233-253, 2004. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
- Chaves, A., Baah, J., Wang, Y., McAllister T.A., Benchaar, C., 2012. Effects of cinnamon leaf, oregano and sweet orange essential oils on fermentation and aerobic stability of barley silage. *J. Sci. Food Agric.* 92, 906-915. doi: 10.1002/jsfa.4669.
- Chen, L., Yuan, X., Li, J., Wang, S., Dong, Z., Shao, T., 2016. Effect of lactic acid bacteria and propionic acid on conservation characteristics, aerobic stability and in vitro gas production kinetics and digestibility of whole-crop corn based total mixed ration silage. *Journal of Integrative Agriculture*. 15(7), 1592–1600. doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61482-X.
- Cho, T., Park, S.M., Yu, H.; Seo, G., Kim, H., Kim, S.A., Rhee, M., 2020. Recent Advances in the Application of Antibacterial Complexes Using Essential Oils. *Molecules*. 25, 1752. doi: 10.3390/molecules25071752.
- Ciriminna, R., Lomeli-Rodriguez, M., Demma Cara, P., Lopez-Sanchez, J.A., Pagliaro, M., 2014. Limonene: a versatile chemical of the bioeconomy. *Chem. Commun.* 50, 15288–15296. doi.org/10.1039/c4cc06147k
- Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M.G., Micieli, D., Venuti, V., Bisignano, G., Saija, A., Trombetta, D., 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *J. Agric. Food Chem.* 55, 6300–6308. doi: 10.1021/jf070094x.

- Cunha, S.S., Orrico Junior, M.A.P., Reis, R.A., Orrico, A.C.A., Schwingel, A.W., Reis, S.D.S., Silva, M.S.J., 2020. Use of crude glycerine and microbial inoculants to improve the fermentation process of Tifton 85 haylages. *Trop. Anim. Health Prod.* 52, 871–879. doi.org/10.1007/s11250-019-02082-y.
- Fancello, F., Petretto, G.L., Zara, S., Sanna, M.L., Addis, R., Maldini, M., Foddai, M., Rourke, J.P., Chessa, M., Pintore, G., 2016. Chemical characterization, antioxidant capacity and antimicrobial activity against food related microorganisms of Citrus limon var. pompia leaf essential oil. *LWT Food Sci. Technol.* 69, 579–585. doi: 10.1016/j.lwt.2016.02.018.
- Fantner, G.E., Barbero, R.J., Gray, D. S., Belcher, A.M., 2010. Kinetics of antimicrobial peptide activity measured on individual bacterial cells using high-speed atomic force microscopy. *Nat.Nanotechnol.* 5, 280–285. doi: 10.1038/nnano.2010.29.
- Fisher, K., Phillips, C., 2008. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: Is citrus the answer? *Trends Food Sci. Technol.* 19, 156–164. doi.org/10.1016/j.tifs.2007.11.006.
- Gonzalez, L., Manteca, X., Calsamiglia, S., Schwartzkopf-Genswein, K., Ferret, A., 2012. Ruminal acidosis in feedlot cattle: Interplay between feed ingredients, rumen function and feeding behavior (A review). *Anim. Feed Sci. Technology.* 172, 66–79. doi 10.1016/j.anifeedsci.2011.12.009.
- Griffin, S.G., Wyllie, S.G., Markham, J.L., Leach, D.N., 1999. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Fragr. J.* 14, 322–332. doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199909/10) 14:5<322:AID-FFJ837>3.0.CO;2-4.
- Guo, Q., Liu, K., Deng, W., Zhong, B., Yang, W., Chun, J., 2018. Chemical composition and antimicrobial activity of Gannan navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Newhall) peel essential oils. *Food Sci. Nutr.* 1431–1437. doi: 10.1002/fsn3.688.
- Gupta C., 2022. Chemical composition of fruit peels essential oil from citrus species and their antimicrobial efficacy as biopreservatives. *Adv Food Technol Nutr Sci Open J.* 8(1): 29-35. doi: 10.17140/AFTNSOJ-8-177.
- Gusmão, J. O., Danés, M. A. C., Casagrande, D. R., Bernardes, T. F., 2018. Total mixed ration silage containing elephant grass for small-scale dairy farms. *Grass E Forage Science.* 73, 717–726. doi.org/10.1111/gfs.12357
- Han, Y., Sun, Z., Chen, W., 2020. Antimicrobial susceptibility and antibacterial mechanism of limonene against *Listeria monocytogenes*. *Molecules.* 25, 33. doi: 10.3390/molecules25010033.

- Hu, X.; Hao, W.; Wang, H., Ning, T., Zheng, M., Xu, C., 2015. Fermentation characteristics and lactic acid bacteria succession of total mixed ration silages formulated with peach pomace. *Asian-Australas J Anim Sci.*28(4), 502-10. doi: 10.5713/ajas.14.0508.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R.L., 2012. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol.* 3, 12. doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012.
- Ibanez, M.D., Sanchez-Ballester, N.M., Blazquez, M.A., 2020. Encapsulated limonene: a pleasant lemon-like aroma with promising application in the agri-food industry. a review. *Molecules.* 25, 2598. doi.org/10.3390/molecules25112598.
- Jobim, C. C.; Nussio, L. G. Princípios básicos da fermentação na ensilagem. In: Reis, R. A., Bernardes, T. F.; Siqueira, G. R. Forragicultura: Ciência, tecnologia e gestão dos recursos forrageiros. Jaboticabal-SP: FUNEP, p. 649-660, 2013.
- Liu, Q. H.; Wu, J. X.; Shao, T. 2019. Roles of microbes and lipolytic enzymes in changing the fatty acid profile, α -tocopherol, E β -carotene of whole-crop oat silages during ensiling and after exposure to air. *Anima. Feed Sci. Technol.* 253, 81-92.
https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.04.004
- Klimek-Szczykutowicz, M., Szopa, A., Ekiert, H., 2020. Citrus limon (Lemon) phenomenon-a review of the chemistry, pharmacological properties, applications in the modern pharmaceutical, food, and cosmetics industries, and biotechnological studies. *Plants (Basel).* 9 (1), 119. doi: 10.3390/plants9010119.
- Kung, L. Williams, P., Schmidt, R.J., Hu, W., 2008. A blend of essential plant oils used as an additive to alter silage fermentation or used as a feed additive for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91, 4793–4800. doi.org/10.3168/jds.2008-1402.
- Lazzari, G., Poppi, A.C.O., Machado, J., Bueno, A.V.I., Gomes, A.L.M., Jobim, C.C., Daniel, J.L.P., 2021. Effects of protein source and lipid supplementation on conservation and feed value of total mixed ration silages for finishing beef cattle. *J. Anim. Sci.* 99, 1–13. doi.org/10.1093/jas/skab032
- Li, S., Rong L., Wanga, S., Liu, S., Lu, Z., Miao, L., Zhao, B., Zhang, C., Xiao, D., Pushpanathan, K., Wong, A., Yu, A., 2022. Enhanced limonene production by metabolically engineered *Yarrowia lipolytica* from cheap carbon sources. *Chemical Engineering Sci.* 249, 117342. doi.org/10.1016/j.ces.2021.117342.
- Mahato, N., Sharma, K., Koteswararao, R., Sinha, M., Baral, A.R., Cho, M.H., 2019. Citrus essential oils: extraction, authentication and application in food preservation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 59 (4), 611–625. doi: 10.1080/10408398.2017.1384716.

- Matos, A. M. et al. In vitro antimicrobial activity of a blend of cashew and castor vegetable oils and clove, eugenol, thymol, and vanillin essential oils against Gram-negative and Gram-positive ruminal bacteria. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 8, p. 1–15, 2021.
doi.org/10.33448/rsd-v10i8.16900
- McGuffey, R. K. F.; Richardson, L. F.; Wilkinson, J. I. D., 2001. Ionophores for dairy cattle: status and outlook. *J. Dairy Sci.* 48, 194-203. doi:10.3168/jds.S0022-0302 (01)70218-4.
- Muhammad, A., Feng, X., Rasool, A., Sun, W., Li, C., 2020. Production of plant natural products through engineered *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Adv.* 43, 107555. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107555.
- Neri, J. et al. Silagem de TMR (total mixed ration) e PMR (partial mixed ration) para vacas leiteiras: desafios e oportunidades. In: Simpósio Internacional de Produção e Nutrição de Gado de Leite, 2019, Uberlândia. *Anais...* Belo Horizonte: FEPMVZ, p. 10-16, 2019.
- Nishino, N., Harada, H., Sakaguchi, E. 2003. Evaluation of fermentation and aerobic stability of wet brewers' grains ensiled alone or in combination of various feeds as a total mixed ration. *J. Sci. Food Agriculture.* 83, 557–563. doi:10.1002/jsfa.1395.
- Nishino, N., Hattori, H., Wada, H., Touno, E., 2007. Biogenic amine production in grass, maize and total mixed ration silages inoculated with *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. *J. Appl. Microbiol.* 103, 325-332. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03244.x.
- Owen, F.; Howard, W., 1965. Effect of ration moisture level on value of alfalfa plus cracked corn as a complete-feed silage for lactating cows. *J. Dairy Sci.* 48, 1310–1314. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(65)88454-5.
- Paula, M. F. F.V. Uso de ionóforos na dieta de bovinos de corte: fermentação ruminal e digestibilidade aparente dos nutrientes. 2021. 67 f. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. Programa de Pós- Graduação em Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2021.
- Rammanee, k., Hongpattarakere, T., 2011. Effects of Tropical Citrus Essential Oils on Growth, Aflatoxin Production, and Ultrastructure Alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food Bioprocess Technol.* 4 (6), 1050–1059. doi:10.1007/s11947-010-0507-1
- Ren, Y., Liu, S., Jin, G., Yang, X., Zhou, Y.J., 2020. Microbial production of limonene and its derivatives: achievements and perspectives. *Biotechnol. Adv.* 44, 107628. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107628.
- Restelatto, R. perfil fermentativo, composição químico-bromatológica e perdas na silagem de ração em mistura total. 2018. 119 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná. Pós-Graduação em Zootecnia em Nutrição e Produção Animal, Curitiba, 2018.

- Restelatto, R., Novinski, C.O., Silva, E.P.A., Pereira, L.M., Volpi, D., Zopollatto, M., Daniel, J.L.P., Schmidt, P., 2019. Effects of holes in plastic film on the storage losses in total mixed ration silage in round bales. *Trans. Anim. Sci.* 3, (4), 1543-1549. doi.org/10.1093/tas/txz132.
- Russell, J. B.; Strobel, H. J., 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(1), 1-6. doi: 10.1128/aem.55.1.1-6.1989.
- Saad, N.Y., Muller, C.D., Lobstein, A., 2013. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour Fragr. J.* 28, 269–279. doi:10.1002/ffj.3165
- Saleem, M., Saeed, M.T., 2020. Potential application of waste fruit peels (orange, yellow lemon and banana) as wide range natural antimicrobial agent. *J. King Saud Univ. Sci.* 32, 805–810. doi.org/10.1016/j.jksus.2019.02.013.
- Salman, A. K. D. Utilização de ionóforos para bovinos de corte. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia (Documentos / Embrapa Rondônia), p. 20, 2006.
- Seppälä, A., Heikkilä, T., Mäki, M., Miettinen, H., Rinne, M., 2013. Controlling aerobic stability of grass silage-based total mixed rations. *Anim. Feed Sci. Technol.* 179. 54-60. doi:10.1016/j.anifeedsci.2012.11.011.
- Schmidt, P.; Restelatto, R.; Zopollatto, M. Ensiling total mixed rations—An innovative procedure. In *Proceedings of the V International Symposium on Forage Quality and Conservation*, Piracicaba, Brazil, p. 7-20, 2017.
- Silva, J. M. Silagem de Forrageiras Tropicais. Campo Grande, MS: EMBRAPA, n. 51, ago. 2001. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD51.html>>. Acesso em: 16 jan. 2024.
- Swamy, M.K., Akhtar, M.S., Sinniah, U.R., 2016. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens E their mode of action: An updated review. *Evid. -Based Complement. Altern. Med.* 3012462–3012483. doi: 10.1155/2016/3012462.
- Teixeira, A. M. et al. Simpósio Internacional de Produção e Nutrição de Gado de Leite. Anais. I Simpósio Internacional de Produção e Nutrição de Gado de Leite, IV Simpósio Nacional de Produção e Nutrição de Gado de Leite, IX Simpósio Mineiro de Nutrição de Gado de Leite, 25 a 27 de setembro de 2019, Belo Horizonte: FEPMVZ, p. 252, 2019.
- Tian, P., Niu, D., Zuo, S., Jiang, D., Li, R., Xu. C., 2020. Vitamin A and E in the total mixed ration as influenced by ensiling and the type of herbage. *Sci Total Environ.* 746 141-239. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141239.
- Togashi, N., Hamashima, H., Shiraishi, A., Inoue, Y., Takano, A., 2010. Antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* of terpene alcohols with aliphatic carbon chains. *J. Essent. Oil Res.* 22, 263–269. doi:10.1080/10412905.2010.9700321.

- Xie, Y., Wang, L., Li, W., Xu, S., Bao, J., Deng, J., Wu, Z., Yu, Z., 2022. Fermentation Quality, In Vitro Digestibility, and Aerobic Stability of Total Mixed Ration Silage in Response to Varying Proportion Alfalfa Silage. *Animals*. 12(8), 10-39, 2022. doi: 10.3390/ani12081039.
- Wang, F., Nishino, N., 2008. Resistance to aerobic deterioration of total mixed ration silage: effect of ration formulation, air infiltration and storage period on fermentation characteristics and aerobic stability. *J. Sci. Food Agriculture*. 88, 133-140. doi:10.1002/jsfa.3057.
- Wang, C.; Nishino, N., 2013. Effects of storage temperature and ensiling period on fermentation products, aerobic stability and microbial communities of total mixed ration silage. *J. Appl. Microbiol*. 114, 1687-1695. doi: 10.1111/jam.12200.
- Weinberg, Z. G., Chen, Y., Miron, D., Raviv, Y., Nahim, E., Bloch, A., Yosef, E., Nikbahat, M., Miron J., 2011. Preservation of total mixed rations for dairy cows in bales wrapped with polyethylene stretch film – A commercial scale experiment. *Anim. Feed Sci. Technol*. 164, 125-129. doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.11.016.
- Zhang, J., Zhao, C., 2015. A new approach for bio-jet fuel generation from palm oil and limonene in the absence of hydrogen. *Chem. Commun. (Camb)*. 51 (97), 17249–17252. doi:10.1039/C5CC06601H.
- Zengin, H., Baysal, A.H., 2014. Antibacterial and Antioxidant Activity of Essential Oil Terpenes against Pathogenic and Spoilage- Forming Bacteria and Cell Structure-Activity Relationships Evaluated by SEM Microscopy. *Molecules*. 19, 17773–17798. doi: 10.3390/molecules191117773.

CAPÍTULO 2 EFEITOS DA MONENSINA E ÓLEO ESSENCIAL LIMONENO SOBRE A QUALIDADE FERMENTATIVA E NUTRICIONAL DE SILAGENS DE TMR FORMULADAS PARA ATENDER AS EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DE CORDEIROS CONFINADOS E VACAS EM LACTAÇÃO

RESUMO

A ensilagem de TMR vem sendo utilizada como forma de maximizar o uso da mão de obra e baratear o custo das dietas em rebanhos de ruminantes. No entanto, o uso de aditivos promotores de crescimento na formulação das TMR pode impedir o crescimento de microrganismos fundamentais para a qualidade do processo fermentativo da silagem. Desta forma, o objetivo da presente pesquisa foi determinar a influência da adição da monensina sódica e do óleo essencial limoneno na qualidade fermentativa e nutricional das silagens de TMR. Os tratamentos testados foram: COM (controle sem uso de aditivo), MON35 (TMR com 35 mg monensina/kg MS), MON45 (TMR com 45 mg monensina/kg MS), OEL300 (TMR com 300 mg OE/ kg MS) e OEL600 (TMR com 600 mg OE/kg MS), que foram aplicados em uma TMR formulada para cordeiros em fase crescimento (ensaio 1) e outra TMR formulada para vacas em lactação (ensaio 2). Os parâmetros avaliados foram as perdas fermentativas, perfil de ácidos graxos de cadeia curta, estabilidade aeróbia, composição químico-bromatológica e a digestibilidade *in vitro* da MS das silagens produzidas. No ensaio 1, menores valores de pH foram observados nos tratamentos que receberam aditivos com OEL300 e OEL600 (4,74 e 4,73 respectivamente), enquanto que no ensaio 2, não se observou diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos avaliados. O tratamento OEL600 proporcionou maior estabilidade aeróbia (297,88 h) no ensaio 1, já no ensaio 2, o uso dos aditivos aumentaram a estabilidade aeróbia. Maiores concentrações de ácido lático foram observadas para os tratamentos que receberam OEL no ensaio 1, enquanto no ensaio 2, foi observada para os tratamentos que receberam MON e OEL. No ensaio 1, menores teores de amido foram encontrados nos tratamentos com OEL, os teores de MS e CNF foram menores nos tratamentos com MON e OEL, já no ensaio 2, os teores de amido, MS e CNF não diferiram entre os tratamentos avaliados. Diante disso, as dosagens de MON e OEL utilizadas no presente estudo influenciaram positivamente na qualidade das TMR ensiladas e não afetou a maiorias dos nutrientes avaliados.

Palavras chave: Aditivos, cordeiros, ensilagem, ionóforos, vacas leiteiras.

CHAPTER 2 EFFECTS OF MONENSIN AND LIMONENE ESSENTIAL OIL ON THE FERMENTATION AND NUTRITIONAL QUALITY OF TMR SILAGES FORMULATED TO MEET THE NUTRITIONAL REQUIREMENTS OF CONFINED LAMBS AND LACTATING COWS

ABSTRACT

TMR silage has been used as a way to maximize the use of labor and reduce the cost of diets in ruminant herds. However, the use of growth-promoting additives in the TMR formulation can prevent the growth of microorganisms that are essential for the quality of the silage fermentation process. Therefore, the objective of the present research was to determine the influence of the addition of sodium monensin and limonene essential oil on the fermentative and nutritional quality of TMR silages. The treatments tested were: CON (control without use of additive), MON35 (TMR with 35 mg monensin/kg DM), MON45 (TMR with 45 mg monensin/kg DM), OEL300 (TMR with 300 mg OE/kg DM) and OEL600 (TMR with 600 mg OE/kg DM), which were applied in a TMR formulated for growing lambs (trial 1) and another TMR formulated for lactating cows (trial 2). The parameters evaluated were fermentative losses, short-chain fatty acid profile, aerobic stability, chemical-bromatological composition and in vitro DM digestibility of the silages produced. In test 1, lower pH values were observed in treatments that received additives with OEL300 and OEL600 (4.74 and 4.73 respectively), while in test 2, no difference ($P > 0.05$) was observed between treatments evaluated. The OEL600 treatment provided greater aerobic stability (297.88 h) in test 1, while in test 2, the use of additives increased aerobic stability. Higher concentrations of lactic acid were observed for treatments that received OEL in test 1, while in test 2, it was observed for treatments that received MON and OEL. In test 1, lower starch levels were found in treatments with OEL, DM and CNF levels were lower in treatments with MON and OEL, while in test 2, starch, DM and CNF levels did not differ between the treatments evaluated. Therefore, the MON and OEL dosages used in the present study positively influenced the quality of the ensiled TMR and did not affect the majority of the nutrients evaluated.

Keywords: Additives, dairy cows, lambs, ionophores silage.

1. INTRODUÇÃO

A silagem de rações mistas totais ou rações de dietas totais (TMR), são dietas completas ensiladas produzidas com a mistura homogênea de diferentes insumos como forrageiras, subprodutos da agroindústria, concentrados proteicos e energéticos, minerais, vitaminas, além de vários tipos de aditivos (Schingoethe, 2017). Bueno et al., (2020) ressaltam que as silagens de TMR devem ser pensadas e formuladas de modo que atendam às exigências nutricionais de uma determinada espécie ou categoria animal. A produção da TMR se torna vantajosa, pois além de reduzir os custos com mão de obra e alimentação, também pode ser ofertada durante todo o ano, contornando os desafios nos períodos de escassez (Miyaji et al., 2017).

Por possuir na maioria das vezes uma proporção considerável de carboidratos solúveis e teores de MS mais elevados, as silagens de TMR apresentam baixas perdas fermentativas, fermentação prioritariamente láctica e elevada estabilidade aeróbia (Bueno et al., 2020). No entanto, a maioria das pesquisas na literatura apenas estudaram os efeitos dos diferentes tipos de ingredientes sobre o processo fermentativo das TMR ensiladas (Alves et al., 2022; Lazzari et al., 2021; Miyaji et al., 2017), não sendo questionada a possível influência dos aditivos (micro ingredientes) no processo de ensilagem.

Muitos são os aditivos que auxiliam na melhoria dos processos fermentativos no rúmen, dentre eles, destacam-se os ionóforos. Dentre os ionóforos mais estudados, a monensina sódica é a mais utilizada (Muller et al., 2015). Porém, seu uso foi proibido na União Europeia devido à possibilidade de conter resíduos na carne e resistência bacteriana (Žižek et al., 2014). Desta forma, a busca por produtos naturais que desempenhem papel semelhante e que possam substituir os ionóforos estão sendo cada vez mais pesquisados.

Os OE são substâncias aromáticas e voláteis extraídas de algumas espécies de plantas (Susanto et al., 2023). Muitos dos compostos químicos contidos nos OE são metabólitos secundários, que desempenham um papel importante na defesa das plantas, pois possuem propriedades antimicrobianas (Hyldgaard et al., 2012). Calsamiglia et al., (2007) argumentam que esse efeito é semelhante ao exercido pela monensina e podem ser utilizados como aromatizantes, conservantes e até moduladores da flora microbiana ruminal. Todavia, poucos são as pesquisas relacionadas aos processos fermentativos de silagens envolvendo OE em dietas totais.

Com base no exposto, a presente pesquisa foi baseada nas seguintes hipóteses: 1) O uso da monensina e OEL atuam inibindo o crescimento de microrganismos da silagem, levando a diminuição da concentração dos ácidos orgânicos nas silagens; 2) As maiores doses dos aditivos

levarão a menores perdas fermentativas e nutricionais das silagens de TMR, além de proporcionar maior de estabilidade aeróbia. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da monensina sódica e do OEL sobre os processos fermentativos e na qualidade nutricional de silagens de TMR.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A presente pesquisa foi realizada em dois anos consecutivos, sendo o primeiro no mês de abril de 2022 (ensaio 1), na Embrapa Agropecuária Oeste (22°16' 44" S 54°49'10" W), localizada no município de Dourados, MS-Brasil. Outra parte da pesquisa foi desenvolvida em março de 2023 (ensaio 2), na Fazenda Experimental de Ciências Agrárias (FAECA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) (22° 13' 52,44' 95" S 54° 59' 10, 53' 72" W), localizada no município de Dourados, MS-Brasil (22 ° 11'55" S, 54°56'7 " W e 452 m de altitude). O clima da região é o Cwa (mesotérmico úmido, com verão chuvoso), de acordo com a classificação de Köppen (Fietz E Fisch, 2008).

Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos: CON (controle sem uso de aditivo), MON35 (TMR com 35 mg monensina/kg MS), MON45 (TMR com 45 mg monensina/kg MS), OEL300 (TMR com 300 mg OE/ kg MS) e OEL600 (TMR com 600 mg OE/kg MS). Foram realizadas quatro repetições por tratamento, totalizando 20 silos experimentais em cada um dos ensaios. Como silos experimentais, foram utilizados tubos de PVC (10 cm de diâmetro e 50 cm de altura) com volume útil de 3,8 L. O material foi compactado manualmente com auxílio de bastões de madeira para obtenção da densidade média de 630,5 kg MV/m³. No fundo de cada silo, havia uma camada de aproximadamente 4,5 cm de areia (300 g) para a drenagem dos efluentes. Utilizou-se uma malha fina de tecido de algodão para evitar o contato da forragem com a areia. Após o enchimento, os silos foram lacrados com lona plástica dupla-face (preta e branca) e fita adesiva e armazenados em laboratório à temperatura ambiente (média de 25,21 °C) por 90 dias.

A TMR foi formulada para atender as exigências nutricionais de cordeiros (ensaio 1) com 20 kg de peso corporal, ganho de peso médio diário de 300g/dia e um consumo de 0,7 kg MS/dia (NRC, 2007). No ensaio 2, a TMR foi formulada para atender as exigências nutricionais de vacas lactantes, com produção estimada de 15 kg de leite/dia, peso médio de 500 kg e consumo médio de 14 kg MS/dia (NASSEN, 2021). A proporção dos ingredientes utilizados para atender as exigências nutricionais dos animais e a composição química da dieta estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Proporção dos ingredientes e composição química das TMR formuladas para cordeiros (ensaio 1) e para vacas leiteiras (ensaio 2) em cada um dos ensaios experimentais.

Ingredientes	Ensaio 1	Ensaio 2
	% da MS	% da MS
Sorgo Forrageiro	35,00	46,56
Milho grão triturado	41,74	28,67
Farelo de Soja	21,76	22,46
Calcário Calcítico	0,93	1,18
Fosfato Bicálcico	0,56	1,11
Sal comum	0,01	0,02
Total	100,00	100,00
MS, % MN	62,45	42,00
PB, % MS	18,10	16,42
FDN, % MS	30,54	39,53
Amido, % MS	27,05	16,71
EE, % MS	2,21	2,38
MM, % MS	8,18	6,33
Lignina, % MS	2,80	4,04
CNF, % MS	42,28	36,08
CT, meqg NaOH/100g MS	24,23	29,32

MN = matéria natural; MS = matéria seca; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; EE = extrato etéreo; MM = matéria mineral; CNF = carboidrato não fibroso; CT = capacidade tampão.

Foi utilizado o sorgo biomassa BRS 716 como fonte de volumoso. Para o concentrado, foram utilizados os seguintes ingredientes: milho moído, farelo de soja, fosfato bicálcico, calcário calcítico e sal comum. Posteriormente, misturou-se o concentrado com o volumoso para a formulação da TMR. Os aditivos (MON e OEL) a serem testados e suas respectivas doses foram previamente incorporados ao concentrado, sendo as doses do OEL borrifados e para as doses de MON distribuída de forma uniforme no concentrado para facilitar a mistura e garantir uma distribuição mais homogênea em toda massa a ser ensilada. A homogeneização dos ingredientes da TMR foi realizada de forma manual, sendo as trocadas as lonas para cada tratamento. Após a homogeneização do material foi realizado o enchimento dos silos experimentais.

Durante o enchimento dos silos foram coletadas duas amostras da TMR de cada tratamento: a primeira amostra, de aproximadamente 300 g, foi utilizada para determinar a composição química e os coeficientes de digestibilidade in vitro da MS, e a segunda, de aproximadamente 70 g, foi congelada para posterior processamento e determinação dos valores de pH e de capacidade tampão.

Para o cálculo das perdas fermentativas, todos os componentes dos silos (silo, areia e pano), bem como a massa de TMR ensilada, foram pesados antes e depois da ensilagem. A recuperação de MS (g/kg de MS ensilada), a perda por gases (g/kg de MS ensilada) e a produção de efluente (g/kg de forragem ensilada) foram calculadas de acordo com as equações de (Jobim et al., 2007). A recuperação de MS foi calculada pela fórmula:

$$RMS = 100 - \left(\frac{MSI - MSF}{MSI} \times 100 \right)$$

Onde: RMS = recuperação de matéria seca (% da massa seca inicial); MSI = massa seca inicial (kg MS colocada nos silos); MSF = massa seca final (kg MS retirada dos silos).

As perdas por gases foram calculadas pela fórmula:

$$PG = \frac{PSI - PSF}{MSI} \times 100$$

Onde: PG = Perdas por gases durante o armazenamento (% da massa seca inicial); PSI = peso do silo fechado no início (kg), PSF = peso do silo fechado na abertura (kg); e MSI = massa seca inicial (kg MS colocada nos silos).

As produções de efluentes foram calculadas pela fórmula:

$$PE = \frac{Pf - Pi}{MSI} \times 1000$$

Onde: PE = produção de efluente (kg/t de massa seca); Pf = peso final conjunto (silo + areia + pano) em kg; Pi = peso inicial do conjunto (silo + areia + pano) em kg; MSI = massa seca inicial (kg MS colocada nos silos).

Após a abertura, todo o material contido em cada silo experimental foi retirado e homogeneizado para a coleta de amostras. Uma amostra de aproximadamente 300 g de cada silo experimental foi enviada ao laboratório para análise da composição química. Outra amostra foi congelada para posterior análise de pH e do perfil de ácidos orgânicos de cadeia curta. A composição química das TMR foi determinada em espectrofotômetro modelo Foss 5000 (Eden Prairie, MN, USA) utilizando a calibração (WinISI version 4.6.11, FOSS Analytical A/S, Denmark) para determinar as concentrações de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína

bruta (PB), proteína solúvel (PS), proteína digestível (PD), proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN); proteína insolúvel em detergente ácido (PIDA); fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), lignina, extrato etéreo (EE), carboidratos não fibrosos (CNF) e amido.

Parte das amostras congeladas foram processadas para a produção de um extrato aquoso, o qual foi utilizado para avaliar o pH (antes e depois da ensilagem), o poder tampão (apenas antes da ensilagem) e o perfil de ácidos orgânicos de cadeia curta. Para obtenção do extrato aquoso, foram diluídos 25 g da TMR em 225 mL de água destilada e homogeneizados manualmente por aproximadamente 20 min. O pH do extrato foi determinado usando um potenciômetro digital (mPA210 MS Tecnozon) e a capacidade tampão foi determinada de acordo com Playne E McDonald, (1966). Uma porção deste extrato foi filtrada através de filtro de papel, centrifugada por 15 min a 10.000 rpm e o sobrenadante foi congelado a -20 ° C para posterior análise de ácidos orgânicos voláteis. Os ácidos orgânicos foram determinados por cromatografia gasosa com detector de massa (GCMS QP 2010 Plus, Shimadzu, Kyoto, Japão) usando uma coluna capilar (Stabilwax, Restek, Bellefonte, EUA, 60 m, 0,25 mm Ø, 0,25 µm de polietileno cross bond carbowax glicol). A concentração de ácido láctico foi determinada pelo método colorimétrico proposto por Pryce, (1969). A concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃), foi determinada pelo método Kjeldahl (AOAC, 2005) (método número 007/2). A digestibilidade *in vitro* da MS foi determinada de acordo com Tilley E Terry, (1963) sendo as amostras colocadas em jarros por 72 horas.

A estabilidade aeróbica foi determinada em todas as silagens após a abertura do silo. Amostras (2 ± 0,005 kg) de cada repetição de cada tratamento foram colocadas livremente nos silos experimentais limpos. Sensores térmicos foram colocados no centro geométrico das silagens e uma dupla camada de gaze foi colocada sobre cada silo experimental para evitar o ressecamento e a contaminação, mas permitindo a penetração do ar. A temperatura ambiente, bem como a temperatura de cada silagem, foi registrada a cada minuto e calculada a média a cada 20 minutos por um datalogger (RC-4, Elitech®). A estabilidade aeróbia foi definida como o número de horas necessárias para que a temperatura da silagem atingisse um valor de 2°C acima da temperatura do ambiente (Kung Jr et al., 2018).

Os dados foram analisados por meio do programa estatístico Sisvar 5.8 (Biuld 92, 2018). No caso de interação significativa, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott Knott com nível de significância de 5%. Os dados relativos à silagem foram analisados de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ik} = \mu + A_i + \epsilon_{ik}$$

onde Y_{ik} = variável dependente, μ = média geral, A_i = efeito de diferentes aditivos (efeito fixo; i = Controle, MON35, MON45, OEL300 e OEL600) e ε_{ik} = erro aleatório associado a cada observação. Cada unidade experimental foi composta por um silo. Foram realizadas quatro observações por tratamento (k), totalizando 20 unidades experimentais.

3 RESULTADOS

Não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos testados para as perdas de gases, efluentes e recuperação de matéria seca (Tabela 3). No ensaio 1, os valores de perdas de gases variaram de 2,03 a 2,88% da MS ensilada, produções médias de efluentes de 5,1 kg/ton MS e taxas de recuperação da MS acima dos 97%.

Tabela 3 Valores de perdas fermentativas, pH final, recuperação de MS, estabilidade aeróbia e perfil fermentativo das silagens de TMR para cordeiros (ensaio 1) submetidas à diferentes doses de MON e OEL.

Parâmetros	Tratamento					EPM	P-valor
	CON	MON35	MON45	OEL300	OEL600		
PG, % MS	2,88	2,03	2,27	2,18	2,28	0,35	0,50
PE, kg/t MS	6,27	4,14	5,78	5,89	3,38	1,40	0,53
RMS, %	97,38	98,18	97,92	97,95	98,16	0,26	0,23
pH final	4,75 a	4,75 a	4,76 a	4,74 b	4,73 b	0,01	0,01
EA, horas	213,65 c	259,28 b	242,92 b	245,63 b	297,88 a	18,2	0,00
N-NH ₃ , % do NT	10,48 a	8,85 b	8,12 b	8,29 b	7,75 c	0,19	<0,001
Ác. Lático, % MS	3,61 b	3,79 b	4,19 b	5,06 a	4,84 a	0,26	0,00
Etanol, % MS	0,16 b	0,14 b	0,16 b	0,21 a	0,13 b	0,01	0,03
Ác. Acético, % MS	0,76 b	0,97 a	1,05 a	1,12 a	1,08 a	0,05	0,00
Ác. Propiônico, mg/kg MS	26,33 e	45,09 d	61,52 c	74,84 b	88,78 a	3,19	<0,001
Ác. Butírico, mg/kg MS	7,45	9,12	7,90	8,01	8,83	1,14	0,83
Ác. Iso-butírico, mg/kg MS	3,10	2,05	1,90	2,93	2,07	0,52	0,36
Ác. Iso-valérico, mg/kg MS	3,37 c	4,72 b	4,56 b	5,22 a	6,20 a	0,39	0,00
Ác. Valérico, mg/kg MS	1,06	1,35	1,37	1,22	1,17	0,14	0,55

TMR sem uso de aditivo (CON); TMR com 35 mg MON/kg MS (MON35); TMR com 45 mg MON/kg MS (MON45); TMR com 300 mg OEL/kg MS (OEL300); TMR com 600 mg OEL/kg MS (OEL600); PG = perdas de gases; PE = perdas por efluentes; RMS = Recuperação de matéria seca; EA = estabilidade aeróbia; N-NH₃ = nitrogênio amoniacal; NT = nitrogênio total; Ác. = ácido. Médias seguidas por diferentes letras diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. EPM = Erro padrão da média; P = valor de P.

Os menores ($P < 0,05$) valores de pH final foram observados para os tratamentos OEL600 e OEL300, não havendo diferenças ($P > 0,05$) nos valores de pH entre o tratamento controle e os

tratamentos que tiveram adição de monensina (Tabela 3) (ensaio 1). A estabilidade aeróbia foi afetada pela inclusão dos aditivos testados (Tabela 3). No ensaio 1, a silagem que recebeu o tratamento OEL600 apresentou o maior ($P < 0,05$) valor de estabilidade aeróbia (média de 297,88 horas), seguido dos tratamentos OEL300, MON35 e MON45. O tratamento controle foi o que apresentou a menor estabilidade aeróbia (231,65 horas) (Tabela 3).

Os teores de $N-NH_3$ foram menores para os tratamentos que receberam algum tipo de aditivo (Tabela 3). No ensaio 1, o tratamento CON apresentou o maior valor de $N-NH_3$, com média de 10,48 % do NT. Já o OEL 600 foi o aditivo que apresentou o menor valor de $N-NH_3$. A maior produção de etanol foi observada para o tratamento OEL300 (0,21 % MS), enquanto os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 3) (ensaio 1).

As concentrações de ácido acético no ensaio 1 foram maiores ($P < 0,05$) para todas as silagens que receberam os aditivos testados em comparação com a silagem CON (Tabela 3). Na média, as silagens que receberam os aditivos MON ou OEL apresentaram teores de ácido acético 38,8% maiores em comparação com o tratamento CON. As concentrações de ácido propiônico no ensaio 1 aumentaram gradativamente nos tratamentos, sendo a menor concentração para o tratamento CON, seguido do tratamento MON35, MON, OEL 300 e OEL 600, respectivamente (Tabela 3).

As silagens que receberam os aditivos OEL300 e OEL600 no ensaio 1 apresentaram as maiores concentrações ($P < 0,05$) de ácido láctico (média de 4,95 % da MS). Não foram observadas diferenças significativas nos teores de ácido láctico das silagens provenientes dos tratamentos MON35, MON45 e CON (Tabela 3). Durante o ensaio 1, não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos testados para os teores de ácido butírico, ácido iso-butírico e ácido valérico, os quais apresentaram médias 8,2 mg/kg MS, 2,41 mg/kg MS e 1,23 mg/kg MS, respectivamente. Já as concentrações de ácido iso-valérico foram maiores ($P < 0,05$) para as silagens com OEL300 e OEL600 com média de 5,71 mg/kg MS.

Durante o ensaio 1 foram observadas diferenças ($P < 0,05$) apenas para os teores de MS, amido e CNF entre os tratamentos testados (Tabela 4). O uso dos aditivos (MON e OEL) proporcionaram silagens com menores teores de MS em comparação com o tratamento CON. Os teores de amido (ensaio 1) foram inferiores ($P < 0,05$) para os tratamentos OEL300 e OEL600 (média de 24,88 % da MS) em comparação com MON 35, MON 45 e CON (média 28,52 % da MS) que não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) entre si (Tabela 5). Os teores de CNF foram inferiores ($P < 0,01$) nas silagens que receberam algum tipo de aditivo (MON ou OEL) independente da dose utilizada (ensaio 1).

Tabela 4 Composição química-bromatológica das silagens de TMR para cordeiros (ensaio 1) submetidas à diferentes doses de MON e OEL.

Parâmetros	Tratamento					EPM	P-valor
	CON	MON35	MON45	OEL300	OEL600		
MS, % MN	63,78 a	61,94 b	62,51 b	62,14 b	61,90 b	0,22	<0,01
PB, % MS	16,58	18,00	17,60	19,16	19,18	0,74	0,11
PS, % PB	25,00	33,60	28,00	40,40	38,60	4,15	0,07
PD, %PB	57,20	61,00	56,60	64,40	65,00	2,65	0,09
PIDN, % MS	4,60	4,62	4,58	4,66	4,46	0,19	0,96
PIDA, % MS	1,04	1,02	1,12	0,98	1,10	0,09	0,84
FDN, % MS	28,20	30,86	29,56	31,66	32,42	1,21	0,14
Amido, % MS	30,12 a	27,18 a	28,26 a	25,01 b	24,76 b	1,31	0,04
EE, % MS	2,32	2,10	2,18	2,34	2,14	0,14	0,68
MM, % MS	8,00	8,24	8,04	8,30	8,36	0,14	0,31
Lignina, % MS	2,38	2,70	2,72	3,00	3,22	0,22	0,13
CNF, % MS	46,32 a	42,31 b	43,14 b	40,11 b	39,54 b	1,56	0,03
DIVMS %	85,47	84,26	83,23	83,96	85,05	3,21	0,98

TMR sem uso de aditivo (CON); TMR com 35 mg MON/kg MS (MON35); TMR com 45 mg MON/kg MS (MON45); TMR com 300 mg OEL/kg MS (OEL300); TMR com 600 mg OEL/kg MS (OEL600); MN = matéria natural; MS = matéria seca; PB = proteína bruta; PS = proteína solúvel; PD = proteína degradável; PIDN = proteína insolúvel em detergente neutro; PIDA = proteína insolúvel em detergente ácido; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; EE = extrato etéreo; MM = matéria mineral; CNF = carboidratos não fibrosos; DIVMS = digestibilidade in vitro da matéria seca; Médias seguidas por diferentes letras diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. EPM = Erro padrão da média; P = valor de P.

Não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos testados para as perdas de gases, efluentes e recuperação de matéria seca (Tabela 5). No ensaio 2, os valores de perdas de gases que variaram de 0,77 a 1,23% da MS ensilada, produções médias de efluentes de 3,24 kg/ton MS e taxas de recuperação da MS acima dos 97%.

Não se observou diferença ($P > 0,05$) de pH para o ensaio 2, onde os valores de pH variaram de 3,94 a 4,14 entre os tratamentos avaliados (Tabela 5). No ensaio 2, todos os aditivos utilizados (MON e OEL) apresentaram estabilidade aeróbica semelhantes ($P > 0,05$), diferindo apenas do tratamento CON que apresentou a menor estabilidade entre as silagens avaliadas (média de 78,24 horas) (Tabela 5).

As silagens que receberam os aditivos (MON e OEL) tiveram os menores valores de $N-NH_3$ (Tabela 5). No ensaio 2, o tratamento CON apresentou o maior valor de $N-NH_3$, com média de 9,27 % do NT. Já o OEL 600 foi o aditivo que apresentou o menor valor de $N-NH_3$. No ensaio 2, as maiores produções de etanol foram observadas nos tratamentos com MON e OEL, mas não

se diferenciaram entre si ($P > 0,05$) em comparação ao tratamento CON. Menor concentração de etanol foi observado para o tratamento CON (0,12 % MS) (Tabela 5).

Tabela 5 Perdas fermentativas, pH final, recuperação de MS, estabilidade aeróbia e perfil fermentativo das silagens de TMR para vacas lactantes (ensaio 2) submetidas à diferentes doses de MON e OEL.

Parâmetros	Tratamento					EPM	P- valor
	CON	MON35	MON45	OEL300	OEL600		
PG, % MS	1,23	1,16	0,97	1,21	0,77	0,12	0,09
PE, kg/t MS	2,8	3,47	5,22	3,02	1,70	1,12	0,06
RMS, %	97,72	97,77	97,12	97,81	97,60	0,21	0,23
pH final	4,14	4,09	4,02	3,98	3,94	0,05	0,09
EA, horas	78,24 b	91,23 a	89,19 a	91,87 a	92,07 a	0,84	<0,001
N-NH ₃ , % do NT	9,27 a	8,00 b	8,40 b	8,32 b	8,40 b	0,26	0,04
Ác. Lático, % MS	4,91 b	6,1 a	6,21 a	6,48 a	6,77 a	0,18	<0,001
Etanol, % MS	0,12 b	0,20 a	0,22 a	0,23 a	0,24 a	0,01	<0,01
Ác. Acético, % MS	1,03	0,83	0,83	0,88	0,97	0,06	0,15
Ác. Propiônico, mg/kg MS	280,5 a	123,75 d	96,00 e	133,75 c	221,00 b	0	<0,001
Ác. Butírico, mg/kg MS	73,00 a	45,25 b	18,25 c	22,50 c	21,25 c	7,07	<0,01
Ác. Iso-butírico, mg/kg MS	46,75 b	52,25 b	80,00 a	53,00 b	70,50 a	4,53	<0,01
Ác. Iso-valérico, mg/kg MS	62,50 a	12,50 b	9,25 b	10,50 b	9,50 b	6,58	<0,01
Ác. Valérico, mg/kg MS	67,25 a	10,75 b	6,25 b	7,00 b	5,50 b	7,37	<0,01

TMR sem uso de aditivo (CON); TMR com 35 mg MON/kg MS (MON35); TMR com 45 mg MON/kg MS (MON45); TMR com 300 mg OEL/kg MS (OEL300); TMR com 600 mg OEL/kg MS (OEL600); PG = perdas de gases; PE = perdas por efluentes; RMS = Recuperação de matéria seca; EA = estabilidade aeróbia; N-NH₃ = nitrogênio amoniacal; NT = nitrogênio total; Ác. = ácido. Médias seguidas por diferentes letras diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. EPM = Erro padrão da média; P = valor de P.

As concentrações de ácido acético do ensaio 2 não diferiram entre si ($P > 0,05$), sendo o tratamento CON que teve a maior concentração (1,03%) (Tabela 5). As concentrações de ácido propiônico no ensaio 2 diferiram entre si ($P > 0,05$) entre os tratamentos testados, sendo a maior concentração observada para o tratamento CON, seguidos pelas silagens com doses de OEL e MON respectivamente (Tabela 5).

As concentrações de ácido lático no ensaio 2, foram superiores ($P < 0,05$) nas silagens que receberam os aditivos MON e OEL em comparação com a silagem CON (Tabela 5). As silagens que receberam os aditivos MON e OEL, apresentaram teores médios de ácido lático de 6,15% MS e 6,62% MS respectivamente. No ensaio 2, as produções de ácido butírico, valérico e iso-valérico foram superiores para o tratamento CON, apenas o iso-butírico foi maior para MON45 e OEL600 (Tabela 5).

Foram observados diferença ($P < 0,05$) apenas para os teores de EE (ensaio 2) entre os tratamentos testados, onde o uso do aditivo MON apresentou maiores valores de EE (2,55 e 2,52 respectivamente) quando comparada com o aditivo com OEL e tratamento CON (Tabela 6).

Tabela 6 Composição química-bromatológica das silagens de TMR para vacas lactantes (ensaio 2) submetidas à diferentes doses de MON e OEL.

Parâmetros	Tratamento					EPM	P-valor
	CON	MON35	MON45	OEL300	OEL600		
MS, % MN	43,15	42,47	41,17	41,82	41,42	0,83	0,08
PB, % MS	15,20	16,10	17,07	17,25	16,95	0,59	0,13
PS, % PB	45,25	43,50	46,25	44,75	44,50	2,07	0,91
PD, %PB	74,50	70,50	72,00	73,25	73,50	2,04	0,69
PIDN, % MS	1,59	1,53	1,59	1,65	1,63	0,09	0,91
PIDA, % MS	0,47	0,52	0,55	0,54	0,56	0,04	0,66
FDN, % MS	42,22	39,80	38,70	39,32	37,62	1,34	0,21
FDA, % MS	27,47	25,90	24,90	25,57	24,50	0,86	0,18
Amido, % MS	15,27	17,75	17,67	15,95	16,95	0,74	0,13
EE, % MS	2,27 b	2,55 a	2,52 a	2,30 b	2,30 b	0,07	0,03
MM, % MS	6,15	6,75	6,52	6,45	5,82	0,30	0,30
Lignina, % MS	4,52	4,07	3,80	4,07	3,75	0,29	0,38
CNF, % MS	34,35	36,22	36,30	35,72	37,82	0,97	0,21
DIVMS %	73,28	74,87	71,06	73,56	71,17	1,00	0,07

TMR sem uso de aditivo (CON); TMR com 35 mg MON/kg MS (MON35); TMR com 45 mg MON/kg MS (MON45); TMR com 300 mg OEL/kg MS (OEL300); TMR com 600 mg OEL/kg MS (OEL600); MN = matéria natural; MS = matéria seca; PB = proteína bruta; PS = proteína solúvel; PD = proteína degradável; PIDN = proteína insolúvel em detergente neutro; PIDA = proteína insolúvel em detergente ácido; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; EE = extrato etéreo; MM = matéria mineral; CNF = carboidratos não fibrosos; DIVMS = digestibilidade in vitro da matéria seca; Médias seguidas por diferentes letras diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. EPM = Erro padrão da média; P = valor de P.

4 DISCUSSÃO

Os valores observados para perdas de gases ficaram abaixo dos 3% da MS ensilada para ambos os ensaios o que configura silagens com boa qualidade fermentativa com a prevalência da fermentação láctica o que pode ser constatado na presente pesquisa (Borreani et al., 2018). As produção de efluentes foram muito baixas em ambos os ensaios, que é uma característica da ensilagem de TMR, pois a presença do concentrado contribui para elevar os teores de MS da mistura (Barmaki et al., 2018; Lazzari et al., 2021). Além disso, como não houve diferenças muito elevadas nos teores de MS e nas densidades de compactação entre os tratamentos testados

(comparando os tratamentos dentro de cada ensaio), já eram esperadas produções semelhantes de efluentes.

Na presente pesquisa, os valores de recuperação de MS ficaram acima dos 97% em ambos os ensaios testados. Os teores médios de MS em torno de 62% e 41% para os ensaios 1 e 2, respectivamente, associados com as baixas perdas por gases e efluentes encontrados explicam a maior taxa de recuperação de MS. Segundo Bueno et al., (2020) os elevados teores de MS (acima de 40% MS) das silagens de TMR contribuem na conservação do material e eleva a porcentagem de recuperação de MS.

O pH é um parâmetro importante para avaliar a qualidade fermentativa de uma silagem, pois está diretamente relacionado com o total dos ácidos orgânicos produzidos (Kung Junior et al., 2003; Muck, 2010). Os valores de pH finais nos ensaios 1 e 2 apresentaram médias de 4,74 e 4,03 respectivamente, sendo considerados pertinentes pois ajudam a cessar as atividades de microrganismos indesejáveis. Portanto é esperado que valores de pH entre 4,0 e 5,0 sejam capazes de inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis em materiais com mais de 40% MS (Alves et al., 2022; Miyaji E Nonaka, 2018; Zhang et al., 2020). Além disso, silagens com teores mais elevados de MS resultam em pH finais mais elevados devido há menor intensidade de fermentação (Cunha et al., 2020) o que explica os maiores valores de pH observados no ensaio 1.

Na meta análise de Susanto et al., (2023) os OE atuam inibindo o crescimento de microrganismos patogênicos (principalmente fungos, leveduras e alguns tipos de bactérias) melhorando a EA. Isso corresponde aos resultados obtidos nesta pesquisa, onde os maiores valores de EA foram observados nos tratamentos com OEL para ambos os ensaios. De maneira menos intensa, a MON também melhorou EA da silagem em comparação ao tratamento CON. Lazzari et al., (2021) observaram que silagens de TMR com 35 mg MON/kg MS apresentaram valores de estabilidade aeróbia acima de 240 horas, o que corrobora com os dados obtidos nesta pesquisa para o ensaio 1. Outro fator que possivelmente exerceu influencia no aumento da EA em ambos os ensaios foi a ação do calcário utilizado na formulação da TMR da presente pesquisa que elevaram os teores de ácido láctico e acético (Niu et al., 2018)

Os tratamentos com a inclusão de OEL600 no ensaio 1 e com MON e OEL em ambas as doses no ensaio 2, promoveram redução dos teores de N-NH₃ durante a ensilagem. Na pesquisa de Akinci E Soykan Önenç, (2021) com OE de cominho em silagem de aveia, os autores observaram redução dos teores de N-NH₃. Segundo esses autores, o OE de cominho atuou diminuindo o fracionamento da proteína (proteólise). Possivelmente os tratamentos com inclusão de MON e OEL em ambos os ensaios no presente experimento também atuaram na redução da proteólise.

Os tratamentos com a inclusão de OEL em ambas as doses e em ambos os ensaios, tiveram as maiores concentrações de ácido láctico, o que contradiz a maioria dos dados encontrados na literatura em meta análise realizada por Susanto et al., (2023). No entanto, Turan E Önenç, (2018) observaram que a adição de 300mg/kg de óleo de comino apresentou efeito antimicrobiano seletivo, diminuindo o número de microrganismos prejudiciais (leveduras e bolores) e aumentando o número de microrganismos benéficos (bactérias ácido lácticas). Esta situação levou à maiores produções de ácido láctico e menores valores de pH, o que colabora com os dados obtidos na presente pesquisa.

Na presente pesquisa ficou evidente que as maiores produções de ácido butírico observadas no tratamento CON levaram também aos maiores teores de N-NH₃, indicando que os aditivos testados ajudaram a inibir as fermentações indesejáveis. No entanto, os valores de ácido butírico e do N-NH₃ estão de acordo com limite tolerado (1g ácido butírico/kg de MS e 10% do NT) para uma silagem de boa qualidade nutricional e sanitária (Borreani et al., 2018; Kung Junior et al., 2003; Muck, 2010), o que configura uma silagem com baixa atividade de bactérias do gênero *Clostridium* sp. De maneira geral todos os ácidos orgânicos produzidos durante o processo fermentativo contribuem para a redução do pH da silagem, no entanto o ácido láctico é o que exerce maior importância nesse processo (Wilkinson E Rinne, 2018).

Segundo Muck, (2010), algumas bactérias heterofermentativas também podem produzir etanol a partir de produtos da fermentação ou dos substratos presentes no meio, o que explica os maiores teores de etanol nos tratamentos que receberam MON e OEL. Apesar disso, os valores de etanol obtidos nos dois ensaios podem ser considerados baixos e não impactam negativamente a qualidade do processo fermentativo (Cantoia Júnior et al., 2020).

O uso dos aditivos (OEL e MON) promoveram uma pequena redução ($P < 0,05$) dos teores de MS das silagens no ensaio 1 e valores numericamente inferiores ($P = 0,08$) no ensaio 2. Sabe-se que ao determinar a MS em estufa de circulação forçada há a perda de parte dos ácidos graxos voláteis produzidos durante a ensilagem, assim, é comum observar menores valores de MS em silagens que apresentam maiores teores de ácidos orgânicos (Brahmakshatriya E Donker, 1971). Isso pode ajudar a explicar o porquê as silagens que receberam OEL e MON apresentaram os menores valores de MS.

Na literatura existem algumas pesquisas que também observaram reduções nos teores de amido e de CNF durante a ensilagem de TMR assim como os obtidos no presente estudo para o ensaio 1. Na pesquisa de Miyaji et al., (2017) foram observadas reduções de 5,5% nos teores de amido em TMR a base de milho grão. Segundo os autores, alguns tipos de microrganismos presentes nas silagens são capazes de utilizar o amido como substrato para produção de ácido

lático, ácido acético e etanol sendo comum observar o aumento na concentração destes compostos no produto final. No ensaio 1, as silagens que receberam a inclusão de OEL300 e OEL600 apresentaram as maiores concentrações de ácido lático (37,11% maior do que o tratamento CON) o que corrobora com as afirmações de Miyaji et al., (2017). Os teores de amido presente na TMR do ensaio 2 foi bem menor que do ensaio 1 o que pode ter contribuído para que esse comportamento de redução do teor de amido não tenha sido observado.

Durante o processo de ensilagem não é esperado que os teores de EE se altere expressivamente, uma vez que os ácidos graxos não são combustíveis usuais para fermentação (Bueno et al., 2020). Provavelmente o teor de EE foi maior para os tratamentos com MON35 e MON45 (ensaio 2) pela menor atividade lipolítica que naturalmente ocorre durante a ensilagem (Lazzari et al., 2021).

5 CONCLUSÕES

As doses de MON e OEL utilizadas neste trabalho não comprometeram qualidade fermentativa das silagens produzidas, sendo observado inclusive aumento das produções de ácido lático e maiores valores de estabilidade aeróbia com o uso destes aditivos. Além disso, a presença dos aditivos MON e OEL não afetaram significativamente a maioria dos os teores dos nutrientes mensurados, o que é positivo do ponto de vista nutricional.

Embora as silagens de TMR para cordeiros com dosagens de OEL promoveram uma redução do teor de amido, não afetou o valor nutricional, uma vez que foi utilizado como substrato para a produção de ácido lático.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akinci, Y., Soykan Önenç, S., 2021. The effect of cumin essential oil on the fermentation quality, aerobic stability, and in vitro digestibility of vetch-oat silages. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 58(2), 217-228. <https://doi.org/10.20289/zfdergi.694965>
- Alves, J.P., Galeano Jara, E.S., Orrico Junior, M.A.P., FernEes, T., Retore, M., Silva, M.S.J., Orrico, A.C.A., Lopes, L.S., 2022. The influence of plant age and microbes-enzymatic additives on fermentation of total mixed ration silages of Capiacu grass (*Pennisetum purpureum*, Schum). *Trop. Anim. Sci. J.* 45, 56–63.
- AOAC, 2005. *Official Methods of Analysis*, 18th ed. AOAC international, Arlington, VA.

- Barmaki, S., Alamouti, A.A., Khadem, A.A., Afzalzadeh, A., 2018. Effectiveness of chopped lucerne hay as a moisture absorbent for low dry-matter maize silage: effluent reduction, fermentation quality and intake by sheep. *Grass Forage Sci.* 73, 406–412. <https://doi.org/10.1111/gfs.12343>
- Brahmakshatriya, R. D., Donker, J. D. 1971. Five methods for determination of silage dry matter. *Journal of Dairy Science*, 54(10), 1470–1474. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(71\)86049-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(71)86049-6)
- Borreani, G., Tabacco, E., Schmidt, R.J., Holmes, B.J., Muck, R.E., 2018. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *J. Dairy Sci.* 101, 3952–3979. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13837>
- Bueno, A.V.I., Lazzari, G., Jobim, C.C., Daniel, J.L.P., 2020. Ensiling total mixed ration for ruminants: A review. *Agronomy* 10. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060879>
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L., Ferret, A., 2007. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 90, 2580–2595. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-644>
- Cantoia Júnior, R., Capucho, E., Garcia, T.M., Del Valle, T.A., Campana, M., Zilio, E.M.C., Azevedo, E.B., Morais, J.P.G., 2020. Lemongrass essential oil in sugarcane silage: Fermentative profile, losses, chemical composition, and aerobic stability. *Anim. Feed Sci. Technol.* 260, 114371. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114371>
- Cunha, S.S., Orrico Junior, M.A.P., Reis, R.A., Orrico, A.C.A., Schwingel, A.W., Reis, S.D.S., Silva, M.S.J., 2020. Use of crude glycerine and microbial inoculants to improve the fermentation process of Tifton 85 haylages. *Trop. Anim. Health Prod.* 52, 871–879. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02082-y>
- Fietz, C.R., Fisch, G.F., 2008. O Clima da Região de Dourados, MS. *Embrapa Agropecuária Oeste* 92, 32.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R.L., 2012. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol.* 3, 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>
- Jobim, C.C., Nussio, L.G., Reis, R.A., Schmidt, P., 2007. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada Methodological advances in evaluation. *Rev. Bras. Zootec.* 36, 101–119.
- Kung Jr, L., Shaver, R.D., Grant, R.J., Schmidt, R.J., 2018. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *J. Dairy Sci.* 101, 4020–4033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>

- Kung Junior, L., Stokes, M.R., Lin, C.J., 2003. Silage additives, in: Buxton, D.R., Muck, R.E., Harrison, J.H. (Eds.), *Silage Sci. Technol.* Madison, pp. 305–360.
- Lazzari, G., Poppi, A.C.O., Machado, J., Bueno, A.V.I., Gomes, A.L.M., Jobim, C.C., Daniel, J.L.P., 2021. Effects of protein source and lipid supplementation on conservation and feed value of total mixed ration silages for finishing beef cattle. *J. Anim. Sci.* 99, 1–13. <https://doi.org/10.1093/jas/skab032>
- Miyaji, M., Matsuyama, H., Nonaka, K., 2017. Effect of ensiling process of total mixed ration on fermentation profile, nutrient loss and in situ ruminal degradation characteristics of diet. *Anim. Sci. J.* 88, 134–139. <https://doi.org/10.1111/asj.12610>
- Miyaji, M., Nonaka, K., 2018. Effects of altering total mixed ration conservation method when feeding dry-rolled versus steam-flaked hulled rice on lactation and digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101, 5092–5101. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13802>
- Muck, R.E., 2010. Silage microbiology and its control through additives. *Rev. Bras. Zootec.* 39, 183–191. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982010001300021>
- Muller, L.D., Bargo, F., Ipharraguerre, I.R., 2015. Review : Monensin for Grazing Dairy Cows. *Prof. Anim. Sci.* 22, 115–119.
- Niu, D. Z., Zheng, M. L., Zuo, S. S., Jiang, D., Xu, C. C. 2018. Effects of maize meal and limestone on the fermentation profile and aerobic stability of smooth brome grass (*Bromus inermis* Leyss) silage. *Grass and forage Sci.*, 73, 622–629. doi: 10.1111/gfs.12355
- NASEN, National Academies of Sciences, Engineering and Medicine, 2021. *Book nutritional requirements for dairy cattle*. 8th ed. United States National Academy of Sciences.
- NRC, 2007. *Nutrient requirements of small ruminants : sheep, goats, cervids, and New World camelids*, 2nd ed. National Academies Press, Washington.
- Playne, M.J., McDonald, P.T., 1966. The buffering constituents of herbage E of silage. *J. Sci. Food Agric.* 17, 264–268.
- Pryce, J.D., 1969. A modification of Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. *Analyst* 94, 1151–1152. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/AN9699401151>
- Schingoethe, D.J., 2017. A 100-Year Review: Total mixed ration feeding of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100, 10143–10150. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12967>
- Susanto, I., Rahmadani, M., Wiryawan, K.G., Laconi, E.B., Jayanegara, A., 2023. Evaluation of Essential Oils as Additives during Fermentation of Feed Products: A Meta-Analysis. *Fermentation* 9, 1–14. <https://doi.org/10.3390/fermentation9070583>
- Tilley, J.M.A., Terry, R.A., 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass Forage Sci.* 18, 104–111.

- Turan, A., Önenç, S.S., 2018. Effect of cumin essential oil usage on fermentation quality, aerobic stability and in vitro digestibility of alfalfa silage. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 31, 1252–1258.
- Wilkinson, J.M., Rinne, M., 2018. Highlights of progress in silage conservation and future perspectives. *Grass Forage Sci.* 73, 40–52. <https://doi.org/10.1111/gfs.12327>
- Zhang, G., Fang, X., Feng, G., Li, Y., Zhang, Y., 2020. Silage Fermentation, Bacterial Community, and Aerobic Stability of Total Mixed Ration Containing Wet Corn Gluten Feed and Corn Stover Prepared with Different Additives. *Animals* 10, 1775. <https://doi.org/10.3390/ani10101775>
- Žižek, S., Gombač, M., Švara, T., Pogačnik, M., 2014. Monensin - A review of factors influencing its presence in the environment and recommendations for safe storage and use of monensin-contaminated manure. *Slov. Vet. Res.* 51, 53–63. <https://doi.org/10.13140/2.1.3015.4888>

CAPÍTULO 3: INFLUÊNCIA DA MONENSINA SÓDICA E DO ÓLEO ESSENCIAL LIMONENO SOBRE PROCESSO FERMENTATIVO E A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE SILAGENS DE TMR COM DIFERENTES TEORES DE UMIDADE

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da adição da monensina e do OEL sobre a qualidade do processo fermentativo e a composição química de silagens de TMR com diferentes teores de umidade. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 2, sendo testada cinco formas de inclusão dos aditivos [COM (controle sem aditivo), MON35 (35 mg monensina/kg MS), MON45 (45 mg monensina/kg MS), OEL300 (300 mg OE/ kg MS) e OEL600 (600 mg OE/kg MS)] em TMR mais úmidas (30% de MS) e TMR menos úmidas (40 % de MS). Os parâmetros avaliados foram as perdas fermentativas, perfil de ácidos graxos de cadeia curta, estabilidade aeróbia, composição químico-bromatológica e a digestibilidade *in vitro* da MS das silagens produzidas. As silagens com altos teores de umidade e que possuíam OEL600 apresentaram os menores valores de recuperação de matéria seca (92,66% MS) e ácido lático (5,79% MS) e maior pH (4,17). As maiores relações ácido lático: ácido acético foram obtidas para as silagens com alta umidade acrescidas com MON45 e MON35 (8,94 e 8,4 respectivamente). O uso da MON e OEL proporcionaram os maiores valores de estabilidade aeróbia, sendo os maiores valores observados para OEL600 e MON35 (92,35 e 91,56 horas respectivamente). Os tratamentos com MON e EOL proporcionaram silagens com menores teores de fibra e aumento do amido em comparação com o tratamento controle, enquanto que os tratamentos doses de MON45 e MON35 tiveram maiores teores de extrato etéreo (3,21 e 3,11% MS). Pode-se concluir que MON 35, MON 45 e OEL 300 podem ser utilizados como melhoradores da fermentação de TMR ensiladas, independente da umidade avaliada. Já o uso de OEL600 deve ser evitado em silagens mais úmidas (próximo aos 30% MS), sendo indicado apenas para as silagens mais secas (próximo aos 40% de MS).

Palavras chave: dietas totais; ionóforo; limoneno; umidade, vacas leiteiras.

CHAPTER 3: INFLUENCE OF SODIUM MONENSIN AND LIMONENE ESSENTIAL OIL ON THE FERMENTATION PROCESS AND CHEMICAL COMPOSITION OF TMR SILAGES WITH DIFFERENT MOISTURE CONTENT

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the influence of the addition of monensin and OEL on the quality of the fermentation process and the chemical composition of TMR silages with different moisture contents. A completely randomized design was used in a 5 x 2 factorial scheme, testing five forms of additive inclusion [CON (control without use of additive control), MON35 (35 mg monensin/kg DM), MON45 (45 mg monensin/kg DM), OEL300 (300 mg OE/kg DM) and OEL600 (600 mg OE/kg DM)] in more humid TMR (30% DM) and less humid TMR (40% DM). The parameters evaluated were fermentative losses, short-chain fatty acid profile, aerobic stability, chemical-bromatological composition and in vitro DM digestibility of the silages produced. Silages with high moisture content and which had OEL600 presented the lowest dry matter recovery values (92.66% DM) and lactic acid (5.79% DM) and the highest pH (4.17). The highest lactic acid: acetic acid ratios were obtained for silages with high moisture added with MON45 and MON35 (8.94 and 8.4 respectively). The use of MON and OEL provided the highest values of aerobic stability, with the highest values observed for OEL600 and MON35 (92.35 and 91.56 hours respectively). The treatments with MON and EOL provided silages with lower fiber content and increased starch compared to the control treatment, while the treatments doses of MON45 and MON35 had higher levels of ether extract (3.21 and 3.11% DM). It can be concluded that MON 35, MON 45 and OEL 300 can be used as fermentation improvers for ensiled TMR, regardless of the humidity evaluated. The use of OEL600 should be avoided in more humid silages (close to 30% DM), and is only recommended for drier silages (close to 40% DM).

Keywords: dairy cows, humidity, ionophore, limonene, total diets.

1. INTRODUÇÃO

O uso de misturas totais (TMR) na alimentação de vacas leiteiras é uma prática comum para a maioria dos rebanhos, pois permite o fornecimento de uma dieta nutricionalmente balanceada e com baixa seleção dos alimentos por parte dos animais (Schingoethe, 2017). Segundo os mesmos autores, vacas leiteiras alimentadas com TMR apresentam uma melhor conversão da energia metabolizável da dieta em leite o que proporciona aumento na produção de leite. No entanto, para a produção da TMR é necessária a mistura diária dos ingredientes das dietas o que pode encarecer o processo produtivo (Bueno et al., 2020). Além disso, esse tipo de dieta não impede a utilização de coprodutos úmidos da agroindústria, mas podem dificultar seu armazenamento por longos períodos de tempo.

Submeter a TMR ao processo de ensilagem é uma forma de diminuir os custos com o preparo diário da dieta e permitir a inclusão de coprodutos úmidos nas dietas (Bueno et al., 2020; Miyaji et al., 2017). Segundo Miyaji et al., (2017) a produção da TMR ensiladas se torna vantajosa, pois além de reduzir os custos com mão de obra e alimentação, também podem ser ofertadas durante todo o ano, contornando os desafios nos períodos de escassez. Existem na literatura vários trabalhos sobre os efeitos dos diversos tipos de ingredientes e aditivos microbianos sobre a qualidade fermentativa e nutricional TMR ensiladas (Alves et al., 2022; Bueno et al., 2020; Miyaji E Nonaka, 2018), no entanto, são poucos os trabalhos que avaliaram a influência (positiva ou negativa) do uso dos ionóforos e OE comumente utilizados como promotores de crescimento nas dietas de vacas de leite sobre o processo fermentativo das TMR ensiladas.

Existe um relato de Lazzari et al., (2021) no qual os pesquisadores observaram padrões fermentativos satisfatórios para silagens de TMR que continham a dose de 33mg/kg MS de monensina. No entanto, é válido destacar que todos os tratamentos testado por Lazzari et al., (2021) possuíam a mesma dose de monensina, e a ausência de um tratamento controle impede de concluir se a monensina influencia ou não no processo fermentativo. Outro ponto que merece destaque na pesquisa de Lazzari et al., (2021) foram os baixos teores de umidade nas TMR utilizadas pelos autores (média 60% de MS), pois sabe-se que a atividade de água está diretamente ligada com o crescimento microbiano e a intensidade de fermentação (Borreani et al., 2018). Como a monensina e os óleos essenciais atuam, muitas vezes, desequilibrando as concentrações de íons das células microbianas, supõem-se que quanto maior a atividade de água da silagem (silagens mais úmidas) maior será a ação destes aditivos sobre os microrganismos do meio.

Diante disso, a presente pesquisa se baseou nas seguintes hipóteses: 1) O uso da monensina e OEL na formulação das TMR atuam inibindo o crescimento microbiano de uma maneira geral, afetando negativamente a produção de ácido lático e melhorando a estabilidade aeróbia, sem alterar significativamente o valor nutricional da silagem; 2) A ação da monensina e OEL sobre a fermentação será mais intensa nas silagens com maiores teores de umidade em comparação com as silagens mais secas. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da adição da monensina e do OEL sobre a qualidade do processo fermentativo e a composição química de silagens de TMR com diferentes teores de umidade.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A presente pesquisa, foi desenvolvida em março de 2023, na Fazenda Experimental de Ciências Agrárias (FAECA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) (22° 13' 52,44' 95" S 54° 59' 10, 53' 72" W), localizada no município de Dourados, MS-Brasil (22 ° 11'55" S, 54°56'7 " W e 452 m de altitude). O clima da região é o Cwa (mesotérmico úmido, com verão chuvoso), de acordo com a classificação de Köppen (Fietz E Fisch, 2008).

Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 2, sendo testada cinco formas de inclusão dos aditivos [COM (controle sem aditivo), MON35 (35 mg monensina/kg MS), MON45 (45 mg monensina/kg MS), OEL300 (300 mg OE/ kg MS) e OEL600 (600 mg OE/kg MS)] em TMR mais úmidas (30% de MS) e TMR menos úmidas (40 % de MS). Foram realizadas quatro repetições por tratamento, totalizando 40 silos experimentais. Como silos experimentais, foram utilizados tubos de PVC (10 cm de diâmetro e 50 cm de altura) com volume útil de 3,8 L. O material foi compactado manualmente com auxílio de bastões de madeira. As TMR com alta e baixa umidade apresentaram densidades de compactação de 897 e 702 kg de MV/m³. No fundo de cada silo, havia uma camada de aproximadamente 4,5 cm de areia (300 g) para a drenagem dos efluentes. Utilizou-se uma malha fina de tecido de algodão para evitar o contato da forragem com a areia. Após o enchimento, os silos foram lacrados com lona plástica dupla-face (preta e branca) e fita adesiva e armazenados em laboratório à temperatura ambiente (média de 25,15°C) por 90 dias.

A TMR foi formulada para atender as exigências nutricionais de vacas lactantes, com produção estimada de 15 kg de leite/dia, peso médio de 500 kg e consumo médio de 14 kg MS/dia, seguindo as recomendações do NASEN, (2021). A proporção dos ingredientes utilizados para atender as exigências nutricionais de vacas lactantes e a composição química da dieta estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 Proporção dos ingredientes e composição química das silagens de TMR de alta umidade para vacas leiteiras em cada um dos ensaios experimentais.

Ingredientes	% da MS
Sorgo Forrageiro	46,56
Milho grão triturado	28,67
Farelo de soja	22,46
Calcário calcítico	1,18
Fosfato bicálcico	1,11
Sal comum	0,02
Total	100,00
MS, % MN	30,48
PB, % MS	16,76
FDN, % MS	37,74
Amido, % MS	20,00
EE, % MS	3,59
MM, % MS	7,13
Lignina, % MS	3,77
CNF, % MS	36,18
CT, meqg NaOH/100g MS	29,32
pH	6,3

MN = matéria natural; MS = matéria seca; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; EE = extrato etéreo; MM = matéria mineral; CNF = carboidrato não fibroso; CT = capacidade tampão.

Foi utilizado o sorgo forrageiro (*Sorghum bicolor* L. Moench) como fonte de volumoso. Para o concentrado, foi utilizado os seguintes ingredientes: milho moído, farelo de soja, fosfato bicálcico, calcário calcítico e sal comum. Posteriormente, misturou-se o concentrado com o volumoso para a formulação da TMR. Os aditivos a serem testados e suas respectivas doses foram previamente incorporados ao concentrado para facilitar a mistura e garantir uma distribuição mais homogênea em toda massa a ser ensilada. A mistura do volumoso com o concentrado proporcionou uma TMR com teores médios de MS de 41% muito próximo ao teor de MS formulado (40% de MS), por isso essa TMR foi prontamente utilizada para o enchimento dos silos experimentais. Para obter TMR com teor de MS de 30% foi adicionado 171 mL de água destilada sobre o material que

foi utilizado para o enchimento de cada silo experimental (média de 4,25 kg). Para evitar a formação de efluentes o material foi sendo homogeneizado durante a adição de água destilada.

Durante o enchimento dos silos foram coletadas duas amostras da TMR de cada tratamento: a primeira amostra, de aproximadamente 300 g, foi utilizada para determinar a composição química e a segunda, de aproximadamente 70 g, foi congelada para posterior processamento e determinação dos valores de pH e de capacidade tampão.

Para o cálculo das perdas fermentativas, todos os componentes dos silos (silo, areia e pano), bem como a massa de TMR ensilada, foram pesados antes e depois da ensilagem. A recuperação de MS (g/kg de MS ensilada), a perda por gases (g/kg de MS ensilada) e a produção de efluente (g/kg de forragem ensilada) foram calculadas de acordo com as equações de (Jobim et al., 2007). A recuperação de MS foi calculada pela fórmula:

$$RMS = 100 - \left(\frac{MSI - MSF}{MSI} \times 100 \right)$$

Onde: RMS = recuperação de matéria seca (% da massa seca inicial); MSI = massa seca inicial (kg MS colocada nos silos); MSF = massa seca final (kg MS retirada dos silos).

As perdas por gases foram calculadas pela fórmula:

$$PG = \frac{PSI - PSF}{MSI} \times 100$$

Onde: PG = Perdas por gases durante o armazenamento (% da massa seca inicial); PSI = peso do silo fechado no início (kg), PSF = peso do silo fechado na abertura (kg); e MSI = massa seca inicial (kg MS colocada nos silos).

As produções de efluentes foram calculadas pela fórmula:

$$PE = \frac{Pf - Pi}{MSI} \times 1000$$

Onde: PE = produção de efluente (kg/t de massa seca); Pf = peso final conjunto (silo + areia + pano) em kg; Pi = peso inicial do conjunto (silo + areia + pano) em kg; MSI = massa seca inicial (kg MS colocada nos silos).

Após a abertura, todo o material contido em cada silo experimental foi retirado e homogeneizado para a coleta de amostras. Uma amostra de aproximadamente 300 g de cada silo experimental foi enviada ao laboratório para análise da composição química. Outra amostra foi congelada para posterior análise de pH e do perfil de ácidos orgânicos de cadeia curta. A composição química das TMR foi determinada em espectrofotômetro modelo Foss 5000 (Eden Prairie, MN, USA) utilizando a calibração (WinISI version 4.6.11, FOSS Analytical A/S,

Denmark) para determinar as concentrações de: matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), proteína solúvel (PS), proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN); proteína insolúvel em detergente ácido (PIDA); fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), lignina, extrato etéreo (EE), carboidratos não fibrosos (CNF) e amido.

Parte das amostras congeladas foram processadas para a produção de um extrato aquoso, o qual foi utilizado para avaliar o pH (antes e depois da ensilagem), o poder tampão (apenas antes da ensilagem) e o perfil de ácidos orgânicos de cadeia curta. Para obtenção do extrato aquoso, foram diluídos 25 g da TMR em 225 mL de água destilada e homogeneizados manualmente por aproximadamente 20 min. O pH do extrato foi determinado usando um potenciômetro digital (mPA210 MS Tecnozon) e o poder tampão foi determinado de acordo com Playne E McDonald (1966). Uma porção deste extrato foi filtrada através de filtro de papel, centrifugada por 15 min a 10.000 rpm e o sobrenadante foi congelado a -20 ° C para posterior análise de ácidos orgânicos voláteis. Os ácidos orgânicos foram determinados por cromatografia gasosa com detector de massa (GCMS QP 2010 Plus, Shimadzu, Kyoto, Japão) usando uma coluna capilar (Stabilwax, Restek, Bellefonte, EUA, 60 m, 0,25 mm Ø, 0,25 µm de polietileno cross bond carbowax glicol). A concentração de ácido lático foi determinada pelo método colorimétrico proposto por Pryce (1969). A concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃), foi determinada pelo método Kjeldahl (AOAC, 1990; método número 007/2). A digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) foi determinada de acordo com Tilley E Terry, (1963) sendo as amostras colocadas em jarros por 72 horas.

A estabilidade aeróbica foi determinada em todas as silagens após a abertura do silo. Amostras (2 ± 0,005 kg) de cada repetição de cada tratamento foram colocadas livremente nos silos experimentais limpos. Sensores térmicos foram colocados no centro geométrico das silagens e uma dupla camada de gaze foi colocada sobre cada silo experimental para evitar o ressecamento e a contaminação, mas permitindo a penetração do ar. A temperatura ambiente, bem como a temperatura de cada silagem, foi registrada a cada minuto e calculada a média a cada 20 minutos por um datalogger (RC-4, Elitech®). A estabilidade aeróbia foi definida como o número de horas necessárias para que a temperatura da silagem atingisse um valor de 2°C acima da temperatura do ambiente (Kung Jr et al., 2018).

Os dados foram analisados por meio do programa estatístico Sisvar 5.8 (Biuld 92, 2018). Quando a interação dos fatores foi significativa ($\alpha \leq 0,05$), os mesmos foram lidos separadamente para sua análise. No caso de interação não significativa, os fatores foram analisados por componente principal. As médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott com nível de significância de 5%. Os dados relativos à silagem foram analisados de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + U_j + A * U_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

onde Y_{ijk} = variável dependente, μ = média geral, A_i = efeito de diferentes aditivos (efeito fixo; i = Controle, MON35, MON45, OEL300 e OEL600), U_j = efeito de umidade (efeito fixo; j = A e B), $A * U_{ij}$ = efeito da interação entre os aditivos e umidade, e ϵ_{ijk} = erro aleatório associado a cada observação. Cada unidade experimental foi composta por um silo. Foram realizadas quatro observações por tratamento (k), totalizando 40 unidades experimentais.

3. RESULTADOS

Foram observadas diferenças ($P < 0,05$) entre os aditivos para as perdas de gases (Tabela 8). Os maiores valores de perdas de gases foram obtidos para MON35 e OEL600, sendo estas cerca 77,28% superiores as perdas observadas para os demais tratamentos testados. As silagens com alta úmida apresentaram valores de PG 134,57% maiores quando comparadas as silagens com baixa umidade. Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre os aditivos testados para as produções de efluentes, no entanto as silagens com altos teores de umidade foram as que apresentaram as maiores produções de efluentes (média de 59,2 kg/t MS) (Tabela 8).

Os aditivos testados não influenciaram ($P > 0,05$) nas produções de etanol, apenas foi constatado valores superiores de etanol para as silagens com alta umidade em comparação com as silagens com baixa umidade (Tabela 8). Houve diferença ($P < 0,05$) entre as silagens com alta e baixa umidade para os teores de ácido propiônico e butírico (Tabela 8). As maiores concentrações de ácido butírico (75,66 mg/kg MS) foram observadas para as silagens com alta umidade, sendo observado o comportamento inverso para as concentrações de ácido propiônico e iso-butírico. De maneira geral, o tratamento CON foi o que apresentou as maiores concentrações dos ácidos propiônico, butírico, iso-valérico e valérico, sendo observada uma redução significativa destes ácidos com o uso dos aditivos MON e OEL.

Os teores de $N-NH_3$ das silagens testadas foram influenciados ($P < 0,05$) pelos aditivos e pelos teores de umidade das TMR. De maneira geral, as silagens com alta umidade apresentaram os maiores valores de $N-NH_3$ (9,09% do NT) em comparação as silagens com baixa umidade (8,48% do NT). O tratamento CON, MON35, MON45 e OEL300 apresentaram os menores teores $N-NH_3$, sendo que OEL600 o único tratamento com o maior valor de $N-NH_3$.

Tabela 8 Perdas fermentativas, pH, estabilidade aeróbia e perfil fermentativo das silagens de TMR com diferentes teores de umidade e doses de MON e OEL.

Parâmetros	Aditivos (A)					Umidade (U)		EPM	<i>P-valor</i>		
	CON	MON35	MON45	OEL300	OEL600	Alta	Baixa		A	U	A*U
PG, % MS	1,37b	2,13a	1,32b	1,39b	2,72a	2,51	1,07	0,22	0,03	<0,01	0,05
PE, kg/t MS	28,88	36,24	35,83	37,90	32,85	59,20	4,68	2,45	0,25	<0,01	0,41
RMS, % MS	94,58	95,29	95,95	94,06	92,66	91,45	97,56	0,38	<0,01	<0,01	<0,01
pH final	4,01	4,07	4,05	3,96	4,17	4,06	4,04	0,03	<0,01	0,58	<0,01
EA, horas	83,94	91,56	89,13	88,94	92,35	88,55	89,81	0,607	<0,01	0,02	<0,01
Ác. Lático, % MS	5,50	6,41	6,58	7,19	5,79	6,51	6,08	0,18	<0,01	0,01	<0,01
Ác. Acético, % MS	0,88	0,77	0,76	0,97	1,54	1,05	0,91	0,04	<0,01	<0,01	<0,01
Relação Lat/Ac	6,50	8,4	8,94	7,49	4,77	7,64	6,8	0,4	<0,01	0,02	<0,01
Etanol, % MS	0,23	0,28	0,31	0,26	0,25	0,33	0,20	0,02	0,37	0,01	0,42
Ác. Propiônico, mg/kg MS	243,81a	118,59b	119,77b	67,28b	111,51b	85,39	179,00	28,62	<0,01	<0,01	0,08
Ác. Butírico, mg/kg MS	76,00a	122,89a	44,64b	17,42b	18,33b	75,66	36,07	19,27	<0,01	0,02	0,35
Ác. Iso-butírico, mg/kg MS	38,89c	59,11b	75,54a	49,90c	38,43c	44,27	60,49	3,04	<0,01	<0,01	0,05
Ác. Iso-valérico, mg/kg MS	51,44a	19,49b	10,59b	8,32b	6,26b	17,56	20,89	4,19	<0,01	0,37	0,58
Ác. Valérico, mg/kg MS	55,71a	20,99b	8,72c	5,74c	3,66c	18,72	19,22	4,72	<0,01	0,90	0,05
N-NH ₃ , % do NT	8,46b	8,56b	8,58b	8,58b	9,34a	9,09	8,48	0,21	<0,01	<0,01	0,05

TMR sem uso de aditivo (CON); TMR com 35 mg MON/kg MS (MON35); TMR com 45 mg MON/kg MS (MON45); TMR com 300 mg OEL/kg MS (OEL300); TMR com 600 mg OEL/kg MS (OEL600); PG = perdas de gases; PE= perdas por efluentes; RMS = Recuperação de matéria seca; EA = estabilidade aeróbia; Ác. = ácido; Relação Lat/Ac = relação ácido lático/acético; N-NH₃ = nitrogênio amoniacal; NT = nitrogênio total. Médias seguidas por diferentes letras diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. EPM = Erro padrão da média.

Houve interação significativa entre a umidade das silagens de TMR e os aditivos testados para a RMS (Figura 7 A). De maneira geral, as silagens com altos teores de umidade apresentaram os menores ($P < 0,05$) valores de recuperação de MS, com destaque para a silagem OEL600 que apresentou apenas 88% de recuperação de MS. Dentre as silagens produzidas com altos teores de umidade, os tratamentos que utilizaram MON foram os que apresentaram os maiores valores de recuperação de MS. Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) na recuperação da MS para as silagens com baixos teores de umidade, sendo que todos os valores ficaram acima dos 97%.

Foi observada uma interação ($P < 0,05$) entre os aditivos testados e os teores de umidade das silagens de TMR, onde o uso OEL600 na TMR com alta umidade proporcionou o maior valores de pH (média de 4,31) (Figura 7 B). Os demais tratamentos testados de alta e baixa umidade (inclusive o OEL600 nas silagens de baixa umidade) não diferiram ($P > 0,05$) entre si, apresentando média de 4,02 de pH.

A estabilidade aeróbia foi afetada pela interação ($P < 0,01$) entre os aditivos e os teores de umidade das TMR testadas (Figura 7 C). Independente da umidade testada, os menores valores de EA foram observados para o tratamento CON, tendo como média 83,5 horas para a quebra da estabilidade da silagem. Tanto o OEL600 quanto MON35 apresentaram melhores valores de estabilidades aeróbia (>92 horas) independente da umidade da silagem. As silagens com alta umidade e com dose de OEL300 teve uma redução da EA (média de 85,33 horas) quando compara as silagens com baixa umidade (média de 91,84 horas).

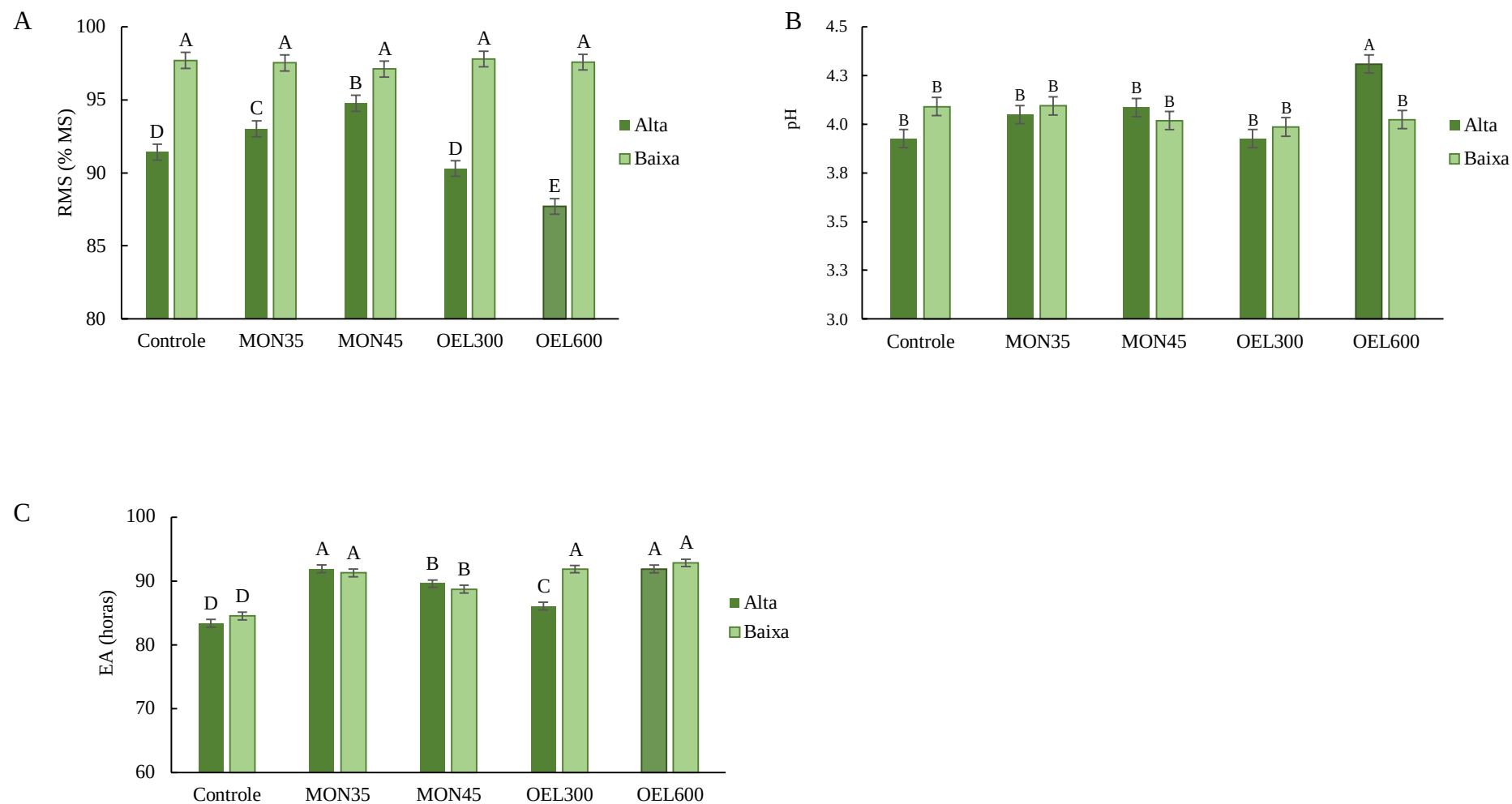


Figura 7 (A) Recuperação de MS (RMS), (B) Potencial hidrogeniônico (pH) e (C) Estabilidade Aeróbia (EA) das silagens de TMR com alta e baixa umidade e doses de MON e OEL.

A silagem que apresentou o maior ($P < 0,05$) teor de ácido láctico (média de 8,1 % da MS) foi a que recebeu OEL300 com alta umidade (Figura 8 A). Apenas o OEL600 apresentou maiores ($P < 0,05$) valores de ácido láctico na silagem de baixa umidade quando comparado com a silagem de mais alta umidade. Para os demais aditivos testados, sempre as silagens com alta umidade tiveram as maiores produções de ácido láctico. As silagens que receberam os aditivos MON e OEL, apresentaram teores médios de ácido láctico de 6,15% MS e 6,62% MS respectivamente.

A concentração de ácido acético foi maior ($P < 0,05$) para a silagem com alta umidade e que recebeu OEL600 (2,11% da MS) (Figura 8 B). Comportamento oposto foi observado para os tratamentos CON, MON35 e MON45 que apresentaram os menores valores de ácido acético para as silagens com alta umidade. Na média, o tratamento OEL600 em silagens com alta umidade produziram em média 2,45 vezes mais ácido acético em comparação com a média dos demais tratamentos testados.

As silagens que apresentaram as maiores ($P < 0,05$) relações ácido láctico: acético foram as que receberam MON com alta umidade (Figura 8 C). Apenas o OEL600 apresentou maior ($P < 0,05$) relação ácido láctico: acético na silagem de baixa umidade quando comparado com a silagem de alta umidade. Para os demais aditivos testados, sempre as silagens com alta umidade tiveram relações ácido láctico: acético maiores ou semelhante as silagens com baixa umidade. As silagens com alta umidade e que receberam OEL600 apresentaram os menores valores para a relação ácido láctico: acético (média de 2,3).

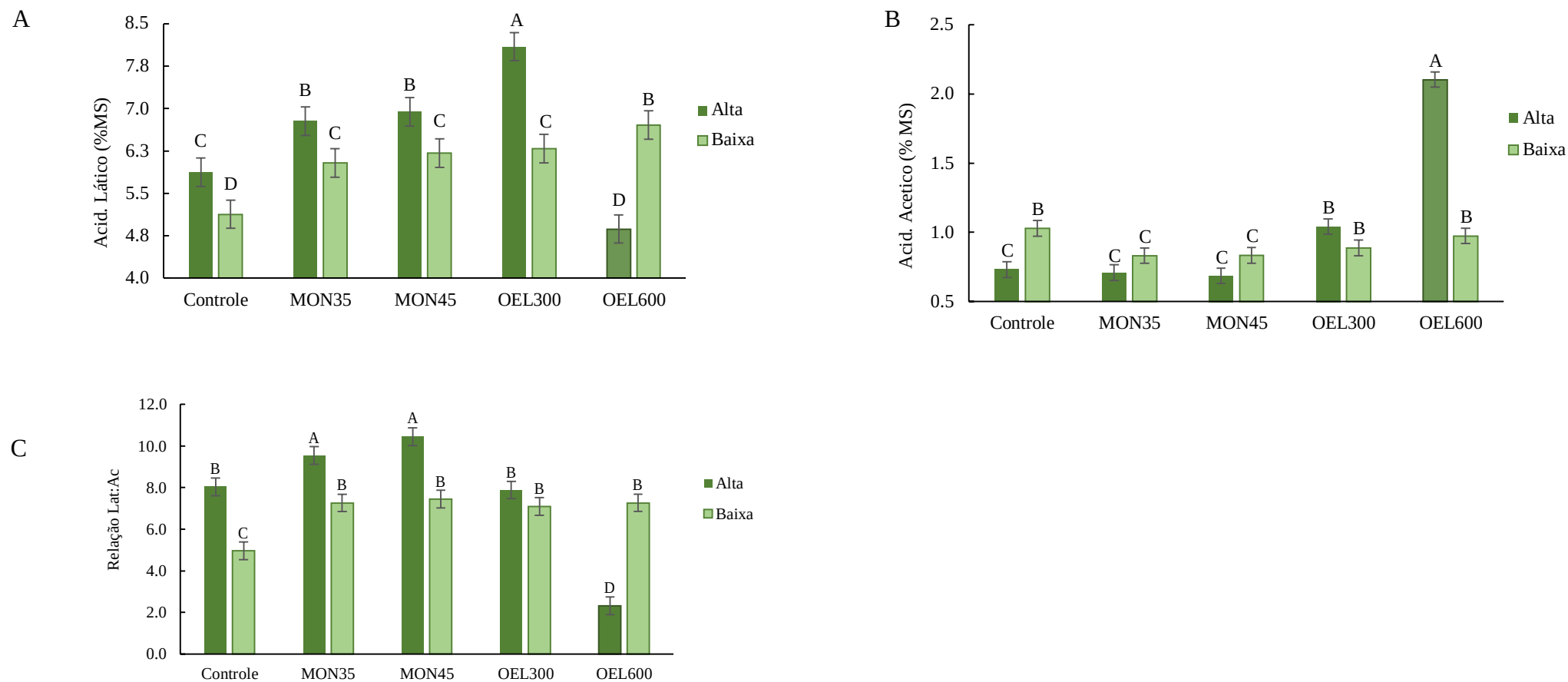


Figura 8 (A) Teores de ácido láctico (Acid. Lático), (B) ácido acético e (C) Relação ácido láctico: acético (Lact:Ac) das silagens de TMR com alta e baixa umidade e doses de MON e OEL

As silagens com baixa umidade apresentaram os maiores ($P < 0,05$) teores de MS, FDN e FDA, em contrapartida as silagens com alta umidade apresentaram os maiores ($P < 0,05$) valores de EE (Tabela 9).

Todos os aditivos testados proporcionaram silagens com menores teores de fibra e maiores teores de amido. Os teores de EE foram maiores para os tratamentos em que a MON foi utilizada como aditivo (Tabela 9). O maior coeficiente de DIVMS (77,56 % da MS) foi observado para as silagens com adição de MON35, seguido dos MON45, OEL300 e OEL600 com valores intermediários e o tratamento CON com o menor valor de DIVMS (71,09%) (Tabela 9).

Tabela 9 Composição química-bromatológica das silagens de TMR com diferentes doses de MON e OEL e submetidas a alta e baixa umidade.

Parâmetro	Aditivos (A)					Umidade (U)		EPM	<i>P-valor</i>		
	CON	MON35	MON45	OEL300	OEL600	Alta	Baixa		A	U	A*U
MS, % MN	36,28	37,05	36,35	35,51	35,55	30,49	41,81	0,54	0,27	<0,01	0,39
MM, % MS	6,43	6,69	6,95	6,73	6,88	7,13	6,34	0,21	0,46	0,06	0,12
PB, % MS	15,62	16,27	16,86	16,97	16,43	16,76	16,52	0,21	0,24	0,43	0,38
PS, % PB	47,38	47,13	49,25	47,25	48,25	50,85	44,85	1,26	0,73	0,62	0,87
PIDN, % MS	19,04	18,53	18,58	18,34	18,73	17,26	20,03	0,81	0,98	0,14	0,64
PIDA, % MS	5,41	6,24	6,05	5,81	5,96	5,12	6,67	0,43	0,73	0,24	0,70
FDN, % MS	41,21a	38,25b	38,01b	37,67b	37,07b	37,75	39,54	0,91	0,02	0,03	0,90
FDA, % MS	26,78a	24,40b	24,80b	24,75b	23,99b	24,62	25,67	0,52	0,01	0,03	0,89
Lignina, % MS	4,16	3,71	3,88	3,84	3,95	3,77	4,05	0,22	0,69	0,17	0,27
Amido, % MS	16,36b	18,55a	18,72a	18,45a	19,72a	20,01	16,72	0,68	0,02	<0,01	0,15
CNF, % MS	34,50	36,06	36,16	36,71	37,23	36,18	36,09	0,72	0,11	0,88	0,61
EE, % MS	2,77b	3,11a	3,21a	2,98b	2,87b	3,59	2,39	0,07	<0,01	<0,01	0,42
DIVMS, % MS	71,09c	77,56a	73,09b	72,73b	72,38b	74,26	72,79	0,86	<0,01	0,06	0,07

TMR sem uso de aditivo (CON); TMR com 35 mg MON/kg MS (MON35); TMR com 45 mg MON/kg MS (MON45); TMR com 300 mg OEL/kg MS (OEL300); TMR com 600 mg OEL/kg MS (OEL600); MN = matéria natural; MS = matéria seca; MM = matéria mineral; PB = proteína bruta; PS = proteína solúvel; PIDN = proteína insolúvel em detergente neutro; PIDA = proteína insolúvel em detergente ácido; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; CNF = carboidratos não fibrosos; EE = extrato etéreo; DIVMS = digestibilidade *in vitro* da matéria seca. Médias seguidas por diferentes letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. EPM = Erro padrão da média

4. DISCUSSÃO

Apesar de maiores, as perdas de gases dos tratamentos MON 35 e OEL600 ficaram abaixo dos 3% da MS ensilada, o que é considerado adequado de acordo com Borreani et al. (2018). Alves et al. (2022) observaram que TMR mais úmidas (23% de MS) em associação com aditivos microbianos heterofermentativos provocaram perdas de gases de 3,7 % da MS, ao passo que silagens de TMR sem inoculantes e mais secas (32% MS) apresentaram perdas de gases de 3,1% da MS, ou seja, valores próximos aos obtidos nesta pesquisa.

Embora os aditivos MON e OEL não promoveram perdas significativas por efluentes, mas foi afetado pelo teor de umidade. Por ser uma silagem com alta úmida (média de 30% MS) já era esperadas maiores produções de efluentes para as TMR. Segundo Borreani et al. (2018) o excesso de efluente é evitado na maioria dos casos quando os teores de MS do material fica acima dos 35%, o que corrobora com os dados obtidos nesta pesquisa.

As silagens com alta umidade tiveram menores recuperação de MS, cerca de 6,11% MS menor quando comparadas as silagens com baixo teor de umidade. As perdas por gases e efluentes observados no presente estudo podem ter impactado negativamente na taxa de recuperação de MS. Outro indicio para a menor recuperação de MS esta associado intensidade da fermentação que ocorre no interior dos silos. Possivelmente a silagem com OEL600 com alta umidade promoveu uma heterofermentação mais intensa, é consequentemente utilizou o ácido láctico como substrato para a produção de outros compostos como o que ácido acético, o que explica os menores valores de recuperação de MS. Segundo Borreani et al. (2018), a fermentação láctica resulta em silagens com perdas mínimas de MS e energia, enquanto as fermentações acética, alcoólica e butírica resultam em silagens com maiores perdas de MS e energia, ou seja, menores valores de recuperação de MS.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a alta umidade interferiu de maneira positiva sobre padrão fermentativo das TMR CON, MON35, MON45 e OEL300, sendo observados aumentos graduais nas concentrações de ácido láctico revelando um efeito promotor no progresso de bactérias do ácido láctico (BAL) e melhorou a fermentação da silagem. No entanto o tratamento OEL600 com alta umidade foi observado redução na concentração do ácido láctico. Possivelmente a dosagem de 600 mg/kg MS associado com alta umidade potencializou a ação antimicrobiana do limoneno e consequentemente afetando as BAL, além de favorecer o crescimento de bactérias heterofermentativas em detrimento das homofermentativas. Na meta análise de Susanto et al. (2023), os autores concluíram que os OE não só inibiu bactérias nocivas

da silagem, mas também o crescimento de bactérias formadoras dos principais ácidos orgânicos. Ainda segundo esses autores o uso de OE em forragens com teores elevados de umidade podem ter uma ação antimicrobiana mais efetiva, principalmente em doses mais elevadas o que corrobora com os dados observados na presente pesquisa.

Na presente pesquisa, as silagens com alto teor de umidade promoveram um perfil heterofermentativos que promoveram aumento nas concentrações de ácido acético em relação as silagens com baixo teor de umidade (Tabela 8). Provavelmente a maior concentração de ácido acético na silagem com OEL600 se deva pela heterofermentação que utilizou o ácido láctico como substrato para produção de ácido acético (Muck, 2010). As maiores relações ácido láctico: acético observadas com o uso da MON permitem concluir que esse aditivo modulou a fermentação das TMR priorizando a homofermentação. De fato, este resultado pode ser considerado positivo, pois permite a utilização de MON na formulação das TMR que serão ensiladas, visando a melhoria do processo fermentativo. Além disso, Lazzari et al. (2021) constataram que MON não sofre degradação microbiana durante o processo de ensilagem, permanecendo ativa para posterior ação a nível ruminal.

As silagens com alta umidade promoveram maiores concentrações de ácido butírico em relação as silagens com baixo teor de umidade (Tabela 8). Possivelmente a ação antimicrobiana do limoneno (Gupta, 2022), associado com a umidade promoveram um efeito sinérgico em reduzir as atividades de bactérias indesejáveis, o que explica os menores valores de ácido butírico nas silagens com doses de OEL300 e OEL600. Diferentes valores de N-NH₃ encontrados na presente pesquisa se devem pela ação de bactérias do gênero *Clostridium* sp que ocorreu durante a ensilagem. Embora detectados suas concentrações (ácido acético e N-NH₃) estão numa faixa tolerável (1g ácido butírico/kg de MS e 10% do NT) para uma silagem de boa qualidade nutricional e sanitária (Borreani et al., 2018; Kung Junior et al., 2003; Muck, 2010), o que configura uma silagem com baixa atividade de bactérias do gênero *Clostridium* sp. No processo fermentativo da silagem há também a formação do ácido propiônico, produzido pelas bactérias do ácido propiônico que convertem glicose e ácido láctico em ácido propiônico e acético (kung jr. et al., 2018). O ácido propiônico age como um importante inibidor do crescimento de leveduras (Filya et al., 2004). A presença do etanol é um indicativo de que houve ação de bactérias heterofermentativas, que utilizaram compostos presentes no meio para sua produção (Muck, 2010), o que explica a presença de etanol nos tratamentos avaliados. Apesar disso, os valores de etanol podem ser considerados baixos e não impactam negativamente a qualidade do processo fermentativo (Cantoia Júnior et al., 2020).

A silagem de alta umidade e com OEL600 apresentou o maior valor de pH. Possivelmente a menor concentração de ácido lático associado com a ação de bactérias heterofermentativas ajudam a explicar o porquê do tratamento com OEL600 teve o maior valor de pH. As silagens com MON35 e OEL600 apresentaram as melhores EA. Possivelmente os ácidos orgânicos produzidos durante a ensilagem (ácido lático, acético e propiônico) promoveram um efeito positivo no controle de fungos e leveduras (Tian et al., 2020). Outro fator que possivelmente exerceu influencia no aumento da EA foi a adição do calcário utilizado na formulação da TMR da presente pesquisa que elevaram os teores de ácido lático e acético. Na pesquisa de Niu et al. (2018), com silagem de *Bromus inermis* Leyss aditivada com farinha de milho com 1,5% de calcário, os autores observaram um aumento no teor de ácido lático e da EA da silagem. Tian et al. (2020) também verificaram inibição de leveduras e bactérias aeróbicas durante a deterioração aeróbica com elevados níveis carbonato de cálcio em silagens mista total com alta umidade (60%).

As reduções nos teores de FDN e FDA com a inclusão da MON e OEL se devem provavelmente a uma maior atividade de enzimas fibrolíticas durante o processo fermentativo. Em um experimento com alfafa e OE de cominho nas dosagens de 300 e 500 mg/ kg MS (Turan E Önenç, 2018) observaram redução nos teores de FDN e FDA em relação ao tratamento controle. Segundo esses autores, as doses utilizadas estimularam atividades enzimáticas promovendo a quebra da parede celular e liberaram sacarose para o meio. Essa maior liberação de sacarose provavelmente foi utilizada como substratos pelas BAL para a produção de ácido lático.

No trabalho com óleo essencial de cominho nas dosagens de 200, 300 e 500 mg/kg em silagens de aveia de Akinci E Soykan Önenç (2021), os autores observaram que o óleo essencial nas dosagens de 200 a 500 mg/kg teve efeito ($P < 0,05$) em reduzir a fração celulolítica mas não teve efeito na fração hemicelulolítica das silagens. Na pesquisa de Kung et al. (1991) com doses de 50 e 150 ppm de vancomicina (antibiótico glicopeptídeo) em silagem de alfafa, os autores constataram que a adição do antibiótico levou a uma redução do teor de FDA.

Bueno et al., (2020) relatam que a quebra parcial da parede celular é provavelmente favorecida em silagens com maior teor de umidade e que os componentes da parede celular podem ser usados como substrato para a fermentação da silagem. Explicando assim, porque no presente experimento, os teores de FDN e FDA foram menores nas silagens com alta umidade, quando comparado as silagens com baixa umidade.

O aumento dos teores de amido nas silagens de TMR com doses de MON e OEL provavelmente está relacionado com a redução da prolamina (camada que protege o amido do grão). Na revisão da ensilagem de TMR para Ruminantes de Bueno et al., (2020), os autores argumentam que a fermentação de silagens de TMR promove um efeito positivo sobre a atividade

das proteases, favorecendo a redução das prolamina e consequentemente aumentando a disponibilidade de amido na silagem. Outro fator que pode ajudar a explicar os maiores teores de amido é o efeito de diluição, pois a queda nos teores de fibra promove o aumento na proporção dos outros nutrientes não fibrosos, como o amido por exemplo.

Os maiores teores de EE observados para tratadas com OE também foram observados em outros trabalhos da literatura (Besharati et al., 2020; Chaves et al., 2012; Susanto et al., 2023). Ao estudar a origem da lipólise em silagens de alfafa, Ding et al. (2013) constataram que a queda nos teores de ácidos graxos totais durante a ensilagem ocorreu principalmente devido à degradação de dos ácidos graxos C18:2n-6 e C18:3n-3. Segundo os mesmos autores, as enzimas vegetais desempenharam um papel importante na lipólise durante a ensilagem da alfafa, no entanto, diversos micróbios epífitos da alfafa contribuíram muito mais para a lipólise durante a ensilagem do que as bactérias ácido lácticas puramente inoculadas. A descoberta de Ding et al. (2013) pode ajudar a explicar porque os tratamentos MON 35 e MON45 preservaram mais os teores de EE (na comparação com a TMR fresca), uma vez que durante a ensilagem das TMR com MON houve um predomínio da fermentações homolática (maiores relações ácido láctico: acético) diminuindo a ação lipolítica de outros grupos bacterianos.

O aumento da DIVMS na silagem de TMR com dose de MON35 pode estar relacionado com os teores de fibras destas silagens. Possivelmente, como houve maior atividade das enzimas fibrolíticas neste tratamento, houve também maiores produções de outros compostos mais digestíveis entre eles o ácido láctico. Seguindo essa premissa, as silagens com doses de MON45, OEL300 e OEL600 também podem ter tido o mesmo estímulo para uma maior degradação da fração fibrosa, entretanto com menor intensidade.

O presente estudo demonstrou que o uso de MON e OEL melhoraram o processo fermentativo e a composição química das TMR ensiladas e que esses fatores são influenciados pela umidade do material. No entanto, o efeito dos mesmos sobre a dinâmica das populações microbianas ao longo do processo de ensilagem ainda necessitam ser avaliados, sendo necessários estudos futuros principalmente relacionando ao uso da MON e OEL.

5. CONCLUSÃO

As dosagens de MON e OEL utilizadas no presente estudo impactaram positivamente na qualidade fermentativa das silagens de TMR com teor de MS acima de 40%, sendo observado aumento das produções de ácido láctico e maiores valores de estabilidade aeróbia. A presença dos aditivos MON e OEL não afetou significativamente a maioria dos nutrientes mensurados em silagens de alta e baixa umidade, o que é positivo do ponto de vista nutricional.

Diante dos resultados obtidos, o uso do óleo essencial limoneno pode ser recomendado para silagens de TMR com teor de MS acima de 40%, com dosagem de 600 mg/kg MS, não sendo recomenda dose acima de 300 mg/kg MS de óleo essencial limoneno para silagens com teores de umidade abaixo dos 30%.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Akinci, Y., Soycan Önenç, S., 2021. The effect of cumin essential oil on the fermentation quality, aerobic stability, and in vitro digestibility of vetch-oat silages. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 58(2), 217-228. <https://doi.org/10.20289/zfdergi.694965>
- Alves, J.P., Galeano Jara, E.S., Orrico Junior, M.A.P., Fernandes, T., Retore, M., Silva, M.S.J., Orrico, A.C.A., Lopes, L.S., 2022. The influence of plant age and microbes-enzymatic additives on fermentation of total mixed ration silages of Capiacu grass (*Pennisetum purpureum*, Schum). *Trop. Anim. Sci. J.* 45, 56–63.
- Besharati, M., Palangi, V., Niazifar, M., Nemati, Z., 2020. Comparison study of flaxseed, cinnamon and lemon seed essential oils additives on quality and fermentation characteristics of lucerne silage. *Acta Agric. Slov.* 2, 455–462. <https://doi.org/10.14720/aas.2020.115.2.1483>
- Borreani, G., Tabacco, E., Schmidt, R.J., Holmes, B.J., Muck, R.E., 2018. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *J. Dairy Sci.* 101, 3952–3979. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13837>
- Bueno, A.V.I., Lazzari, G., Jobim, C.C., Daniel, J.L.P., 2020. Ensiling total mixed ration for ruminants: A review. *Agronomy* 10. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060879>
- Cantoia Júnior, R., Capucho, E., Garcia, T.M., Del Valle, T.A., Campana, M., Zilio, E.M.C., Azevedo, E.B., Morais, J.P.G., 2020. Lemongrass essential oil in sugarcane silage: Fermentative profile, losses, chemical composition, and aerobic stability. *Anim. Feed Sci. Technol.* 260, 114371. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114371>

- Chaves, A. V, Baah, J., Wang, Y., Mcallister, A., Benchaar, C., 2012. Effects of cinnamon leaf, oregano and sweet orange essential oils on fermentation and aerobic stability of barley silage 906–915. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4669>
- Ding, W.R., Long, R.J., Guo, X.S., 2013. Effects of plant enzyme inactivation or sterilization on lipolysis and proteolysis in alfalfa silage. *J. Dairy Sci.* 96, 2536–2543. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6438>
- Fietz, C.R., Fisch, G.F., 2008. O Clima da Região de Dourados, MS. Embrapa Agropecuária Oeste 92, 32.
- Filya, I., Sucu, E., Karabulut, A. 2004. The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. *J. Appl. Microbiol.* 97, p. 818-826. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02367.x.
- Gupta C., 2022. Chemical composition of fruit peels essential oil from citrus species and their antimicrobial efficacy as biopreservatives. *Adv Food Technol Nutr Sci Open J.* 8(1): 29-35. doi: 10.17140/AFTNSOJ-8-177.
- Jobim, C.C., Nussio, L.G., Reis, R.A., Schmidt, P., 2007. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada Methodological advances in evaluation. *Rev. Bras. Zootec.* 36, 101–119.
- Kung Jr, L., Shaver, R.D., Grant, R.J., Schmidt, R.J., 2018. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *J. Dairy Sci.* 101, 4020–4033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>
- Kung Junior, L., Stokes, M.R., Lin, C.J., 2003. Silage additives, in: Buxton, D.R., Muck, R.E., Harrison, J.H. (Eds.), *Silage Sc. Technol.* Madison, pp. 305–360.
- Kung, L. Jr, Tung, R.S., Maciorowski, K., 1991. Effect of microbial inoculant (Ecosyl-TM) and/or a glycopeptide antibiotic on fermentation and aerobic stability of wilted alfalfa silage. *Animal Feed Science Technology* 35:37-48. doi:10.1016/0377-8401(91)90097-C.
- Lazzari, G., Poppi, A.C.O., Machado, J., Bueno, A.V.I., Gomes, A.L.M., Jobim, C.C., Daniel, J.L.P., 2021. Effects of protein source and lipid supplementation on conservation and feed value of total mixed ration silages for finishing beef cattle. *J. Anim. Sci.* 99, 1–13. <https://doi.org/10.1093/jas/skab032>
- Miyaji, M., Matsuyama, H., Nonaka, K., 2017. Effect of ensiling process of total mixed ration on fermentation profile, nutrient loss and in situ ruminal degradation characteristics of diet. *Anim. Sci. J.* 88, 134–139. <https://doi.org/10.1111/asj.12610>

- Miyaji, M., Nonaka, K., 2018. Effects of altering total mixed ration conservation method when feeding dry-rolled versus steam-flaked hulled rice on lactation and digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101, 5092–5101. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13802>
- Muck, R.E., 2010. Silage microbiology and its control through additives. *Rev. Bras. Zootec.* 39, 183–191. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982010001300021>
- Niu, D. Z., Zheng, M. L., Zuo, S. S., Jiang, D., Xu, C. C. 2018. Effects of maize meal and limestone on the fermentation profile and aerobic stability of smooth brome grass (*Bromus inermis* Leyss) silage. *Grass and forage Sci.*, 73, 622-629. doi: 10.1111/gfs.12355
- NASEN, National Academies of Sciences, Engineering and Medicine, 2021. *Book nutritional requirements for dairy cattle*. 8nd ed. United States National Academy of Sciences.
- Playne, M.J., McDonald, P.T., 1966. The buffering constituents of herbage and of silage. *J. Sci. Food Agric.* 17, 264–268.
- Pryce, J.D., 1969. A modification of Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. *Analyst* 94, 1151–1152. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/AN9699401151>
- Schingoethe, D.J., 2017. A 100-Year Review: Total mixed ration feeding of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100, 10143–10150. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12967>
- Susanto, I., Rahmadani, M., Wiryawan, K.G., Laconi, E.B., Jayanegara, A., 2023. Evaluation of Essential Oils as Additives during Fermentation of Feed Products: A Meta-Analysis. *Fermentation* 9, 1–14. <https://doi.org/10.3390/fermentation9070583>
- Tian, P., Vyas, D., Niu, D., Zuo, S., Jiang, D., Xu, C.H. 2020. Effects of calcium carbonate on the fermentation quality and aerobic stability of total mixed ration silage. *J. Anim. Feed Sci.* 29, 167-174. doi:10.22358/jafs/124047/2020
- Tilley, J.M.A., Terry, R.A., 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass Forage Sci.* 18, 104–111.
- Turan, A., Önenç, S.S., 2018. Effect of cumin essential oil usage on fermentation quality, aerobic stability and in vitro digestibility of alfalfa silage. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 31, 1252–1258.