

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF

ISMAEL NACARATI DA SILVA

USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS *BLENDS* COMO ADITIVOS PARA  
SILAGEM DE MILHO

Campos dos Goytacazes  
2024

ISMAEL NACARATI DA SILVA

USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS *BLENDS* COMO ADITIVOS PARA  
SILAGEM DE MILHO

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na área de concentração de produção de ruminantes, no trópico úmido.

ORIENTADOR: Professor Doutor Tadeu Silva de Oliveira

Campos dos Goytacazes  
2024



Governo do Estado do Rio de Janeiro  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro  
Centro de Ciências e Tecnologias Agropec.

## DECLARAÇÃO

Declaro para fim de validação da ata de defesa de Tese de Ismael Nacarati da Silva, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor, que foi aprovada pelos membros da banca Vicente Ribeiro Rocha Júnior e Elizabeth Fonsêca Processi, impossibilitados de assinar presencialmente.

Campos dos Goytacazes, 21 março de 2024

Tadeu Silva de Oliveira  
Orientador e Presidente da Banca de Defesa  
ID. Funcional 4467986-6



Documento assinado eletronicamente por **Tadeu Silva de Oliveira, Professor**, em 21/03/2024, às 15:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento nos art. 28º e 29º do [Decreto nº 48.209, de 19 de setembro de 2022](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.rj.gov.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=6](http://sei.rj.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=6), informando o código verificador **70812953** e o código CRC **B3799814**.

Referência: Processo nº SEI-260009/004636/2023

SEI nº 70812953

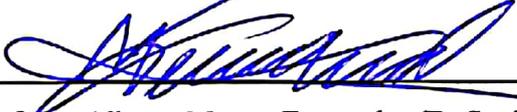
Avenida Alberto Lamego, 2000, - Bairro Pq. Califórnia, Campos dos Goytacazes/RJ, CEP 28013-602  
Telefone: - www.uenf.br

ISMAEL NACARATI DA SILVA

**USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS *BLENDS* COMO ADITIVOS PARA  
SILAGEM DE MILHO**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na área de concentração de produção de ruminantes, no trópico úmido.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2024.  
BANCA EXAMINADORA



---

Prof. Dr. Alberto Magno Fernandes (D. Sc, Zootecnia) – UENF

---

Prof. Dr. Vicente Ribeiro Rocha Júnior (D. Sc, Zootecnia) – UNIMONTES

---

Dra. Elizabeth Fonsêca Processi (D. Sc, Ciência Animal) – UFRRJ



---

Prof. Dr. Tadeu Silva de Oliveira (D. Sc, Zootecnia) – UENF  
(Orientador)

## DEDICATÓRIA

Inicialmente, dedico esta tese a Deus, cuja luz tem iluminado constantemente minhas escolhas, caminhos, destinos e recompensas. Sua orientação tem sido essencial em cada passo destas jornadas acadêmica e pessoal, guiando-me com sabedoria e graça.

Gostaria de dedicar uma parte especial destes agradecimentos em memória ao meu grande amigo José Bonifácio, que nos deixou no ano de 2023. Embora não tenha sido meu professor na academia, nossos caminhos se cruzaram nos corredores, resultando em uma amizade significativa e repleta de ensinamentos inestimáveis para a vida. Sua presença e amizade foram e continuam a ser lembradas eternamente com carinho e fonte de inspiração.

Ao meu pai, Hélio José da Silva, dedico meu profundo reconhecimento. Ele tem sido meu pilar, meu exemplo no trabalho e uma figura fundamental para o meu crescimento profissional. Seu comprometimento e dedicação moldaram meu caráter e me envolveram para alcançar conquistas além das expectativas.

À minha mãe, Maria Soely Nacarati da Silva. Sua confiança inabalável em mim, independentemente das minhas escolhas, se tornou um farol orientador. Além de ser um exemplo extraordinário de pessoa, ela tem sido fundamental para o meu crescimento pessoal e para a construção dos valores que me guiam.

Por último, mas definitivamente não menos importante, dedico esta conquista a todos os meus amigos verdadeiros. Vocês são parte integrante do que sou e são significativamente importantes para este triunfo. Sua amizade, apoio e companheirismo tornaram esta jornada mais rica e significativa. Juntos, celebramos não apenas esta vitória, mas também a força que vem da união e da amizade verdadeira.

A todos aqueles a quem dedico estas palavras, meus mais sinceros agradecimentos. Cada um de vocês contribuiu de maneira única para minha trajetória, sendo peça vital no quebra-cabeça da minha trajetória, e agradeço a cada um por seu papel inestimável nesta conquista.

## AGRADECIMENTOS

Chegando ao fim desta jornada acadêmica, sinto-me compelido a expressar minha imensa gratidão com estas linhas de agradecimento, mesmo as palavras não sendo suficientes para expressar o que eu sinto por todos.

Em primeiro lugar, quero expressar meus profundos agradecimentos a Deus, pois tudo é possível para Ele. Agradeço aos meus familiares, ao meu pai, Hélio José, à minha mãe, Maria Sueli, aos meus irmãos, Shirley e Israel, e aos cunhados, Odirlei e Irasi.

À Érica da Araújo, obrigado por ser meu pilar emocional nas melhores e piores horas. Você chegou na hora certa e tornou tudo mais agradável.

Agradeço ao meu grande amigo Flávio Henrique “Maraca” por ser fundamental na minha jornada, desde a ajuda para conseguir vaga no alojamento e estágio ainda no início da graduação, até influenciar na entrada no mestrado e, por fim, pela oportunidade de me apresentar ao meu orientador de doutorado. Você não sabe quão importante foi para minha trajetória.

Agradeço também à Lilian Guevara, que se tornou uma grande amiga, presente em quase todos os momentos desses quatro anos, sempre disposta para me ajudar, seja com o caderno, uma enxada ou com uma garrafa e copo na mão. Agradeço por sua amizade incrível, que eu não esperava encontrar aqui.

A todos os meus amigos, que foram pilares inabaláveis de apoio, meu profundo agradecimento. Não citarei o nome de todos para não cometer injustiça, mas agradeço a todos. Em especial, aos grupos da hora do recreio, só a nata: ano Nuevo e da Copa Cirrose. Houve muitas brincadeiras, zoação e muita diversão ao longo desse percurso, que foram uma válvula de escape para a seriedade e o cansaço do trabalho, além de terem amenizado a saudade que senti de casa. Aos colegas de laboratório, de curso e demais companheiros de jornada acadêmica, agradeço pela camaradagem e apoio. Em especial, aos estagiários do grupo NUPRO e a meus inestimáveis companheiros de projeto, José Ribeiro e Elon Aniceto. Juntos, conseguimos muitas conquistas.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, por fornecer o ambiente propício para a pesquisa e aprendizado, meus agradecimentos. Os recursos, infraestrutura e oportunidades oferecidos foram fundamentais.

Agradeço a todos os funcionários da UENF e da UFRRJ, em especial ao Sr. Paulo Roberto Bernardo Laurindo, matrícula-10544/5, ao Sr. Sérgio Américo Ribeiro, matrícula-10542/9 “Bonerge” e ao Robson Alves de Carvalho, matrícula-10376/2 “Robinho”, estendendo

também esse agradecimento à Elizabeth Processi, sempre presente nesses quatro anos. O apoio de vocês foi determinante para o cumprimento de minhas atividades acadêmicas.

Expresso meus profundos agradecimentos ao Professor Alberto Magno Fernandes. Ele esteve sempre presente em todas as etapas da jornada do doutorado – das bancas até os cafezinhos e conversas da vida. Tenha certeza de que você foi peça fundamental para que eu chegasse ao final desse processo.

Agradeço a uma pessoa que poderia se encaixar em qualquer parte desses agradecimentos, como orientador, professor, amigo ou família. Tadeu Silva, você tornou o doutorado leve, com muitos ensinamentos, diversão e respeito. Juntos, tivemos muitas conquistas pessoais e em grupo. Agradeço-lhe por me acolher e me incluir no grupo. Também sou grato por ter a oportunidade de te ensinar um pouquinho da magia do futebol. Brincadeiras à parte, precisamos de mais orientadores como você. Muito obrigado por tudo!

Agradeço também à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos, que me possibilitou realizar meu doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento do projeto que resultou nesta tese.

Aos membros da banca por disponibilizarem seu precioso tempo e atenção com a avaliação do nosso trabalho.

Que este seja um agradecimento sincero e abrangente a todos os que, de alguma forma, contribuíram para o sucesso desta jornada. Grato(a) a todos!

**“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.  
Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus não sou o que era antes”.**

**(Martin Luther King Jr.)**

## RESUMO

**SILVA, Ismael Nacarati da, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense “Darcy Ribeiro”. Fevereiro de 2024, Utilização de óleos essenciais e suas misturas como aditivos para silagem de milho. Orientador: Tadeu Silva de Oliveira.**

A silagem de milho é suscetível a perdas por deterioração aeróbia. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o aumento dos teores de óleo essencial de laranja doce, bem como a utilização de *blends* de óleos essenciais de copaíba (Co) e *Eucalyptus staigeriana* (ES) sobre a composição química, degradabilidade *in vitro*, perdas e parâmetros fermentativos, contagem microbiana e estabilidade aeróbia da silagem de milho. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e quatro repetições. Experimento 1, níveis de óleo de laranja doce: Controle (CON), silagem de milho sem óleo essencial de laranja doce; 200 mg kg<sup>-1</sup>; 400 mg kg<sup>-1</sup>; e 600 mg kg<sup>-1</sup> de massa ensilada. Experimento 2: silagem de milho controle (CON) sem óleo essencial; mistura 50:50 (50% ES mais 50% Co); mistura 75:25 (75% ES mais 25% Co); mistura 25:75 (25% ES mais 75% Co). O óleo essencial de laranja doce influenciou os teores de matéria seca (p=0,035) e a matéria orgânica (p=0,021), apresentando comportamento quadrático. O óleo essencial de laranja doce implicou em efeito quadrático (p=0,022) sobre a concentração de ácido acético na silagem de milho. Houve tendência (p=0,097) do óleo essencial de laranja doce reduzir linearmente o nitrogênio amoniacal. Além disso, o aumento dos níveis de óleo essencial de laranja doce diminuiu a temperatura (p=0,02) ao longo dos dias, mas não influenciou o pH (p=0,404) da silagem. O uso de *blends* aumentou (p=0,046) as concentrações de ácido acético na silagem. O ácido propiônico foi reduzido em 88,13% com a mistura 25:75 em comparação com a mistura 50:50. Os *blends* não influenciaram (p>0,05) as perdas fermentativas. A população fúngica foi reduzida (p=0,048) pela mistura 25:75, em comparação com as demais. O óleo essencial de laranja doce não altera a degradabilidade *in vitro*, os parâmetros de fermentação e a contagem microbiana na silagem de milho. Porém, a dose de 600 mg kg<sup>-1</sup> aumenta a concentração de ácido acético e a estabilidade aeróbica da silagem de milho. O uso de *blends* de óleos essenciais melhora a qualidade da silagem de milho. Os *blends* foram eficientes na redução das perdas fermentativas. A mistura 50:50 aumentou as concentrações dos ácidos acético e propiônico, melhorando a estabilidade aeróbica da silagem de milho.

**Palavras-chave:** Antifúngico; conservação; qualidade fermentativa; metabólitos secundários de planta.

## ABSTRACT

**SILVA, Ismael Nacarati da, D.Sc., State University of Northern Rio de Janeiro “Darcy Ribeiro”. February 2024, Use of essential oils and their blends as additives for corn silage. Supervisor: Tadeu Silva de Oliveira.**

Corn silage is susceptible to losses due to aerobic deterioration. Therefore, the objective of this study was to evaluate the increase of sweet orange essential oil content, as well as the use of blends of Copaiba (Co) and *Eucalyptus staigeriana* (ES) essential oils on the chemical composition, *in vitro* degradability, fermentation losses and parameters, microbial count, and aerobic stability of corn silage. The experiments were conducted in a completely randomized design with four treatments and four replications. Experiment 1, levels of sweet orange oil: Control (CON), corn silage without sweet orange essential oil; 200 mg kg<sup>-1</sup>; 400 mg kg<sup>-1</sup>; and 600 mg kg<sup>-1</sup> of silage mass. Experiment 2: Control corn silage (CON) without essential oil; 50:50 mixture (50% ES plus 50% Co); 75:25 mixture (75% ES plus 25% Co); 25:75 mixture (25% ES plus 75% Co). Sweet orange essential oil influenced the dry matter ( $p=0.035$ ) and organic matter ( $p=0.021$ ) contents, showing a quadratic behavior. Sweet orange essential oil had a quadratic effect ( $p=0.022$ ) on the concentration of acetic acid in corn silage. There was a tendency ( $p=0.097$ ) for sweet orange essential oil to reduce ammoniacal nitrogen linearly. In addition, increasing the concentration of sweet orange essential oil lowered the temperature ( $p=0.02$ ) over the days, but did not affect the pH ( $p=0.404$ ) of the silage. The use of the mixtures increased the concentration of acetic acid in the silage ( $p=0.046$ ). Propionic acid was reduced by 88.13% with the 25:75 blend compared to the 50:50 blend. The blends had no effect ( $p>0.05$ ) on fermentation losses. The fungal population was reduced by the 25:75 blend compared to the others ( $p=0.048$ ). Sweet orange essential oil did not alter *in vitro* degradability, fermentation parameters or microbial counts in corn silage. However, the dose of 600 mg kg<sup>-1</sup> increased the concentration of acetic acid and the aerobic stability of corn silage. The use of essential oil blends improves the quality of corn silage. The blends were effective in reducing fermentation losses. The 50:50 blend increased the concentrations of acetic and propionic acids and improved the aerobic stability of corn silage.

**Keywords:** Antifungal; conservation; fermentation quality; plant secondary metabolites.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
2.1. SILAGEM .....	15
2.2. ADITIVOS .....	17
2.3. ÓLEOS ESSENCIAIS .....	18
2.4. MECANISMO DE AÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS .....	21
ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA DOCE.....	24
2.5. ÓLEO ESSENCIAL DE COPAÍBA .....	26
2.6. ÓLEO ESSENCIAL DE <i>EUCALYPTUS STAIGERIANA</i> .....	27
2.7. INTERAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS .....	29
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	31
<b>CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA DOCE NA FERMENTAÇÃO E ESTABILIDADE AERÓBICA DE SILAGEM DE MILHO</b> .....	45
2.1. LOCALIZAÇÃO .....	47
2.2. COLHEITA, ENSILAGEM E TRATAMENTOS .....	47
2.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA .....	49
2.4. DEGRADABILIDADE <i>IN VITRO</i> .....	50
2.5. PERDAS POR GASES E EFLUENTES E RECUPERAÇÃO DE MATÉRIA SECA ....	52
2.6. PERFIL FERMENTATIVO.....	53
2.7. CONTAGEM MICROBIANA.....	54
2.8. ESTABILIDADE AERÓBICA.....	54
2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	56
<b>3. RESULTADOS</b> .....	57
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	60
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	62
<b>CAPÍTULO 2 - BLENDS DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. E <i>Eucalyptus staigeriana</i> NO PERFIL FERMENTATIVO, PERDAS E ESTABILIDADE AERÓBICA DE SILAGEM DE MILHO</b> .....	68
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	69
2.1. LOCALIZAÇÃO .....	70
2.2. PREPARO DA SILAGEM .....	71
2.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA .....	72
2.4. DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> E ENERGIA BRUTA.....	73
2.5. PERDAS POR GASES E EFLUENTES E RECUPERAÇÃO DE MATÉRIA SECA ....	74
2.6. PERFIL FERMENTATIVO.....	75

2.7. POPULAÇÕES MICROBIANAS e pH.....	76
2.8. ESTABILIDADE AERÓBICA.....	77
2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	78
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>79</b>
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>82</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>85</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>85</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As pastagens desempenham um papel fundamental na pecuária, sendo um ponto impactante na redução de custos na produção de leite e carne. No Brasil, grande parte das propriedades com atividades na pecuária tem como base o pasto (Araújo *et al.*, 2017). No entanto, devido à sazonalidade da produção e qualidade da forragem ao longo do ano, faz-se necessário realizar a implementação de estratégias de suplementação volumosa para o período de escassez (Rolim, 1994). Dentre as estratégias de suplementação, a ensilagem se destaca como uma das mais difundidas (Moran *et al.*, 1988).

A silagem é o produto da ensilagem, na qual o material vegetal (milho, sorgo, capim etc.) é colhido, picado e compactado em silos, nos quais sofrerá fermentação anaeróbica (Macêdo *et al.*, 2019). Após o período adequado para a completa fermentação, o silo é aberto e o material é fornecido aos animais. No entanto, quando ocorre a abertura do silo, o material entra em contato com o ambiente aeróbico, ocasionando deterioração, elevando o percentual de perdas e riscos de intoxicação (Vilela *et al.*, 2003). Normalmente, esses problemas são contornados com estratégias para minimizar as possíveis perdas. A mais utilizada para retardar a deterioração da silagem é a utilização de aditivos e inoculantes (Neumann *et al.*, 2010). A inclusão de aditivos é comumente utilizada para promover alterações durante a fermentação, resultando em um melhor processo e, conseqüentemente, em uma melhor estabilidade após a abertura do silo, além de melhorias na qualidade final da silagem (Yitbarek *et al.*, 2014).

Os benefícios resultantes da utilização de inoculantes na ensilagem incluem a fermentação mais rápida e eficiente do material ensilado. Além disso, sua composição contém cepas de bactérias selecionadas, como *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus*, que melhoram o crescimento e a atividade das bactérias lácticas no silo. Essas bactérias favorecem o processo de fermentação e produção de ácido láctico, responsáveis pela redução do pH. O ambiente mais ácido se torna desfavorável para a proliferação e desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, como fungos e bactérias deteriorantes. No entanto, silagens com elevada quantidade de ácido láctico podem se tornar mais suscetíveis à deterioração após a abertura do silo (Bernardes *et al.*, 2012). Para contornar esse possível transtorno, tem-se utilizado aditivos de bactérias heterotáticas, pois, além do ácido láctico, produzem o ácido acético (Ranjit *et al.*, 2000).

Baseando-se na estratégia do uso de aditivos, uma tendência crescente no mercado é a inclusão dos óleos essenciais na ensilagem. Com o intuito de melhorar a estabilidade após a abertura do silo, a utilização dos óleos essenciais tem a função de inibir a multiplicação de microrganismos que promovem degradação da silagem. Seu mecanismo de ação atua em uma ampla variedade de microrganismos, incluindo bactérias gram-negativas, bactérias gram-positivas e fungos (Lopez *et al.*, 2007). Ao penetrarem nas membranas externas das células bacterianas e nas membranas citoplasmáticas para o interior da célula, os princípios ativos dos OEs promovem desintegração das estruturas celulares, tornando-as mais permeáveis (Benchaar *et al.*, 2008). Esse processo compromete funções vitais para a sobrevivência dos microrganismos (Suzuki *et al.*, 2008).

Aliado a isso, existem as características específicas e particularidades de cada óleo, os quais podem afetar não somente a fermentação da silagem, mas também a fermentação ruminal dos animais e outros benefícios específicos. Esses inúmeros benefícios têm levado a diversas pesquisas desenvolvidas visando aprofundar e determinar as concentrações eficientes, métodos de extração e aplicação em alimentos tanto para humanos como para animais, bem como em relação à manipulação da população e ambiente ruminal (Calsamiglia *et al.*, 2007; Benchaar *et al.*, 2008; Baser *et al.*, 2010; Franz *et al.*, 2010; Patra *et al.*, 2015; Besharati *et al.*, 2021; Sousa *et al.*, 2023).

#### Hipótese Cap. 1

O aumento dos níveis de óleo essencial de laranja doce melhora os parâmetros de fermentação e a estabilidade aeróbica da silagem de milho.

#### Hipótese Cap. 2

A utilização de *blends* dos OEs da copaíba e de *Eucalyptus staigeriana* reduz as perdas fermentativas na silagem de milho, melhorando o valor nutricional e a estabilidade aeróbica.

## OBJETIVOS

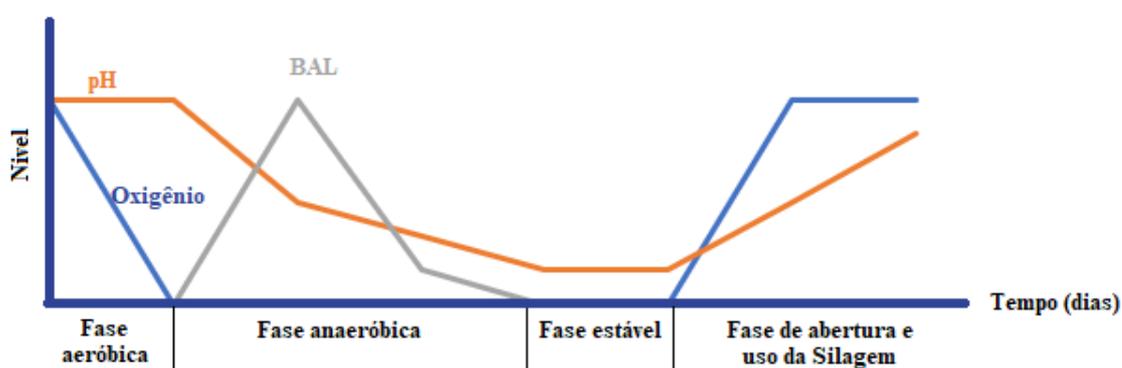
- Avaliar os efeitos dos níveis de óleo essencial de laranja doce na composição química, degradabilidade *in vitro*, perdas e parâmetros de fermentação, contagem microbiana e estabilidade aeróbica da silagem de milho.
- Medir o efeito dos *blends* dos OEs da copaíba e do *Eucalyptus staigeriana* sobre perfil fermentativo, perdas por gases e efluentes, composição química, degradação *in vitro* da matéria seca e fibra em detergente neutro, contagem de microrganismos e na estabilidade aeróbica da silagem de milho.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. SILAGEM

Ao longo da história da humanidade, a preservação de culturas frescas em silos por meio de fermentação anaeróbia tem sido empregada como alternativa de estocagem de alimentos para humanos e animais. Antigos registros egípcios datados de aproximadamente 1500-1000 a.C. indicam o uso de técnicas para a conservação de plantas inteiras de cereais naqueles tempos (Kirstein, 1963), algo bem parecido com a silagem, apesar de as plantas não serem picadas.

A silagem é um alimento volumoso obtido do processo conhecido como ensilagem, no qual o material vegetal (milho, sorgo, capim etc.) é colhido, picado e compactado em silos, seguido de fermentação anaeróbica, para posterior fornecimento aos animais (Macêdo *et al.*, 2019). Segundo Rotz *et al.* (1994), o período de estocagem da silagem pode ser dividido em quatro fases distintas, conhecidas como **fase aeróbia inicial**, **fase da fermentação ativa**, **fase estável** e **fase de abertura do silo**, ou aeróbia final, ocorrendo diversos processos em cada uma dessas fases (Figura 1).



FONTE: Adaptação de MCDONALD (1991).

**Figura 1:** Perfil do oxigênio, pH e das bactérias ácido-láticas (BAL) nas fases da silagem.

Após o silo ser fechado, até aproximadamente 2 a 7 dias, durante a fase aeróbia inicial, o oxigênio presente é utilizado na respiração vegetal da cultura ensilada,

ocorrendo a quebra dos açúcares dos vegetais em dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e água, liberando calor. Durante esse período, também ocorre atividade dos microrganismos aeróbicos ou aeróbicos facultativos, como mofos, leveduras e algumas bactérias, os quais consomem açúcares solúveis, liberando dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e calor (McDonald 1991). Quando todo oxigênio é consumido, inicia-se a fase anaeróbia, indo aproximadamente até o 21º dia, dependendo dos teores de MS e da população microbiana (McDonald, 1991; Bolsen *et al.*, 1996). Nesse período, as bactérias anaeróbicas (BALs) (bactérias lácticas) se tornam predominantes no ambiente, convertendo os açúcares solúveis, como a glicose, em uma maior proporção de ácido láctico e em uma menor de ácido acético (McDonald, 1991). Como consequência disso, o pH (potencial hidrogeniônico) reduz, evitando a fermentação secundária, conhecida como clostridial. A fermentação secundária é o resultado da utilização dos produtos de fermentação desejada (ácido láctico e de açúcares, proteínas e aminoácidos), para formar ácidos graxos butíricos e superiores, além de aminas, amidas e amônia (Monteiro *et al.*, 2011; Jobim *et al.*, 2013). Portanto, a qualidade do produto final é obtida conforme a proporção de produtos da fermentação primária em relação à fermentação secundária, sendo que quanto maior for a proporção, melhor será a qualidade (Reis *et al.*, 2014). A estabilidade do pH e a inativação dos microrganismos, aproximadamente no 21º dia, marcam o final da fase fermentativa. No entanto, quando ocorre a abertura do silo, o material entra em contato com o ambiente aeróbico, ocasionando elevação do pH e deterioração pelos microrganismos aeróbios, elevando o percentual de perdas e riscos de intoxicação (Vilela *et al.*, 2003).

Dentre os principais gargalos na produção de silagem, as perdas de material podem gerar grandes prejuízos econômicos. Elas podem ocorrer em todo o processo, incluindo desde a escolha do material, passando pela colheita, erros no processo de ensilagem, compactação inadequada e vedação ineficiente, chegando a perdas provocadas pela abertura, com entrada de ar e manejo deficiente. Todas essas etapas podem interferir na fermentação desejada e na qualidade da silagem (Macêdo *et al.*, 2019). No entanto, as perdas podem ser controladas estrategicamente em cada uma das fases, podendo ser monitoradas por meio da regulagem de equipamentos para colheita, cuidados de boas práticas na técnica de ensilagem, adição de aditivos para corrigir erros e deficiências do material escolhido, ponto de corte, fermentações indesejadas de microrganismos como clostrídios, enterobactérias, fungos filamentosos e leveduras, provocando melhorias na estabilidade após a abertura dos silos (Danner *et al.*, 2003).

## 2.2. ADITIVOS

Por volta do século XIX, ocorreram significativas inovações tecnológicas na área de manejo e preservação de alimentos ensilados (Wilkinson *et al.*, 2003). A partir desse ponto, a engenharia de equipamentos, estruturas de armazenagem (silos), filmes plásticos para vedação e aditivos tiveram importantes desenvolvimentos em muitas regiões. Entre essas mudanças, a introdução dos aditivos foi uma evolução no processo produtivo, possibilitando um melhor controle no âmbito das fermentações aeróbica e anaeróbia. Conforme a ANVISA (Brasil, 1997), os aditivos são definidos como ingredientes adicionados intencionalmente aos alimentos com o intuito de melhorar o desempenho ou reduzir qualquer tipo de perda, podendo ser classificados segundo as funções que exercem.

Existe no mercado uma variedade de aditivos com distintas finalidades, sendo que eles podem ser de origem química (ácido propiônico, ácido cítrico), orgânica (mel, melaço), inorgânica (cloreto de sódio, fosfato monocalcico) ou microbiológica (*Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus*, enzimas), os quais podem desempenhar o papel de inibidores ou estimulantes da fermentação (Schmidt *et al.*, 2014). Aditivos estimulantes da fermentação são subdivididos em duas categorias: nutritivos (ureia, biureto, cama ou esterco puro de aves, melaço, carbonato de cálcio, concentrados e cana-de-açúcar) e não nutritivos (inoculantes bacterianos e enzimáticos, como as celulases e hemicelulases). Segundo McDonald *et al.* (1991), ainda podem ser incluídos nessa classificação os inibidores de deterioração aeróbica e de nutrientes e os absorventes. Além disso, o aditivo pode pertencer a mais de uma classe.

Para Nussio e Schmidt (2004), no Brasil, os aditivos são classificados de forma mais simplificada, podendo ser microbianos, químicos e sequestrantes de umidade. Dentro dessas inúmeras classificações de aditivos, os inoculantes microbianos aparecem com maior destaque, pois são mais utilizados em decorrência de seu fácil manuseio e boa eficiência, com elevados níveis de produção de ácido lático e rapidez na redução do pH, aumentando a qualidade e a preservação da silagem.

Dentre os aditivos químicos, podemos citar os ácidos orgânicos, conservantes e, mais especificamente, os óleos essenciais (Schmidt *et al.*, 2014). Os óleos essenciais ainda não

são muito estudados como aditivos em silagem, ao contrário do que ocorre com os inoculantes microbianos, nos quais existe uma diversidade de trabalhos testando cepas de bactérias ácido-láticas, do tipo homofermentativas e heterofermentativas (Muck *et al.*, 2011; Kung Jr. *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2014).

No entanto, a preocupação com a segurança alimentar durante toda a cadeia produtiva vem crescendo a cada ano, resultando em uma crescente demanda por produtos com composição cada vez mais natural. Nesse contexto, os estudos e pesquisas com inclusão de óleos essenciais na busca por melhorias no sistema de produção dos animais têm ocorrido com frequência na tentativa de atender o mercado internacional, pois esses aditivos são compostos sem conservantes e agregam valor ao produto final (Feniman, 2011).

### 2.3. ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais (OEs) são produzidos a partir do metabolismo secundário dos vegetais. No entanto, não têm contribuição direta em seu crescimento e desenvolvimento. Inicialmente, foram pesquisados e empregados como aromatizantes/saborizantes, ou como conservantes naturais em pães, queijos, carnes, chucrute, doces e molhos (Souza *et al.*, 2007; Feniman, 2011). O próprio nome “essencial” deriva de “essência”, relacionando-se à capacidade dessa substância de fornecer sabores e odores específicos a diversas plantas (Calsamiglia *et al.*, 2007).

Segundo registros históricos, sua origem se deu há cerca de 7.000 a.C. a 4.000 a.C., quando os seres humanos começaram a extrair substâncias das plantas com o auxílio de utensílios de pedra. Acredita-se que essas substâncias sejam os primeiros registros dos óleos essenciais, que eram combinados com unguentos e utilizados para diversas funcionalidades por todo o Oriente (Marques, 2007). No entanto, considera-se que sua utilização se iniciou a partir das civilizações chinesa e egípcia para o emprego em produtos de banho, cosméticos, rituais religiosos e práticas medicinais (Alves, 2011). Tempos depois, durante as Cruzadas, a prática e os conhecimentos se espalharam para a região da Arábia, onde a técnica de destilação com serpentina refrigerada para extrair óleo essencial de rosas foi desenvolvida pelo filósofo Avicena. Dessa forma, foi

atribuída ao filósofo a “invenção” da moderna destilação, apesar de ele ter apenas aprimorado o método (Grace, 1999). A introdução dos OEs no Brasil se deu em 1927 com o extrativismo de essências nativas, como o pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), utilizado como essência para perfumes (Barbosa *et al.*, 2013; Trancoso, 2013). Já no período da Segunda Guerra Mundial, o país iniciou seu processo de extração de óleos essenciais com a menta (*Mentha* sp.), a laranja (*Citrus* sp.), o eucalipto (*Eucalyptus* spp.), o patchouli (*Pogostemon beyneanum* Benth), entre outras espécies. Esse evento ocorreu pela dificuldade dos países do Ocidente conseguirem produtos de fornecedores do Oriente devido à Segunda Guerra Mundial (Amorim, 2007). Na década de 1950, houve a instalação de importantes empresas internacionais de cosméticos, produtos alimentícios, farmacêuticos e de higiene no território brasileiro (Trancoso, 2013). Com o passar dos anos, os óleos essenciais foram ganhando mais visibilidade e, mediante pesquisas, foram sendo conhecidos seus inúmeros benefícios.

Os óleos essenciais são considerados substâncias lipofílicas, voláteis em temperatura ambiente, sendo obtidos por meio de hidrodestilação, prensagem a frio, extração por solventes orgânicos, extração por fluido supercrítico, entre outras técnicas (Guan *et al.*, 2007; Silveira *et al.*, 2012). Sua extração pode variar de acordo com sua localização na planta, com incidência nas flores, cascas, folhas e sementes das plantas (Losa, 2001; Simões *et al.*, 2002). Além da volatilidade, os óleos têm como característica marcante a variação de sua composição entre as diferentes partes da mesma planta (Dorman *et al.*, 2000). Alguns autores relatam que os OEs são armazenados na planta em células secretoras, cavidades, canais, células da epiderme ou tricomas glandulares (Burt, 2004; Bakkali *et al.*, 2008). São normalmente de consistência líquida, raramente coloridos, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos, com densidade geralmente menor do que a da água.

Do ponto de vista químico, os OEs são constituídos de uma mistura de 20 a 60 componentes diferentes, com alta complexidade e em diferentes concentrações. Em geral, são caracterizados por apresentarem dois ou três elementos em concentrações mais elevadas, com concentração em torno de 20% a 70% do total do óleo, que são denominados compostos majoritários (Bakkali *et al.*, 2008; Delamare *et al.*, 2007; Russo *et al.*, 1998; Senatore, 1996). A concentração e composição química variam principalmente pelo genótipo da planta, embora fatores climáticos, geográficos, estação do ano, período de colheita da planta e técnica de destilação também possam interferir (Knaak; Fiuza, 2010). (Kerrola *et al.*, 1994; Borsato *et al.*, 2008).

Assim como os metabólitos taninos e saponinas, os OEs desempenham um papel importante e ecológico, servindo de mensageiros químicos entre as interações das plantas e do ambiente. Na natureza, os óleos essenciais exercem um papel crucial na defesa das plantas como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e contra o ataque de herbívoros. Outra forma de sua atuação é na indução da propagação da planta por atraírem certos insetos que vão proporcionar a dispersão do pólen e sementes, garantindo a continuidade e perpetuação da espécie (Lee *et al.*, 2003; Burt, 2004).

Os benefícios proporcionados pelos OEs e a crescente preocupação com a segurança alimentar, especialmente do mercado internacional, abrangendo toda a cadeia de produção, desde a obtenção das matérias-primas até os produtos finais, implicaram o aumento no interesse do uso de óleos essenciais na nutrição animal. Na legislação brasileira, os OEs e extratos vegetais estão compreendidos dentro da classe de aditivos como aromatizantes (ANVISA, 2007) e são reconhecidos e autorizados na Europa pela Diretiva do Conselho 70/524/EEC Cap. III. Os óleos apresentam características vantajosas na utilização como aditivos por atuarem contra uma ampla variedade de microrganismos, incluindo bactérias gram-negativas, bactérias gram-positivas e fungos (Lopez *et al.*, 2007). Além disso, suas características antioxidativas, antimicóticas, antiviróticas, antibacterianas, antissépticas e anti-inflamatórias, proporcionadas por compostos como o carvacrol e o cinamaldeído, são cruciais (Batista, 2018).

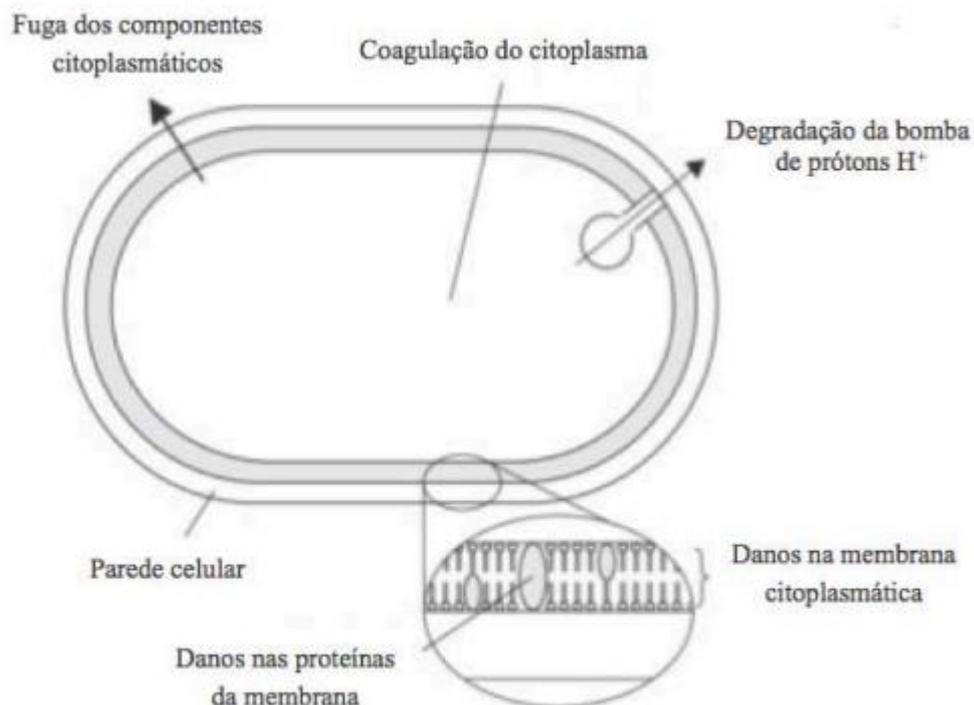
Devido à capacidade de atuar no controle de microrganismos, inúmeras pesquisas estão sendo desenvolvidas visando aprofundar e determinar as concentrações eficientes, métodos de extração e aplicação em alimentos tanto para humanos como para animais, bem como em manipulação da população e ambiente ruminal (Calsamiglia *et al.*, 2007; Benchaar *et al.*, 2008; Baser *et al.*, 2010; Franz *et al.*, 2010; Patra *et al.*, 2015; Besharati *et al.*, 2021; Sousa *et al.*, 2023).

A maioria dos óleos essenciais não apresenta empecilhos significativos para serem utilizados como aditivos em silagens. Seus efeitos estão diretamente correlacionados com o pH, mostrando maior eficácia em ambientes mais ácidos. Ambientes anaeróbicos favorecem sua atuação contra os patógenos, demonstrando sua aplicabilidade no ambiente específico das silagens (Juven *et al.*, 1994). Durante o processo de preparo da silagem ocorre a presença de uma vasta gama de população de microrganismos, podendo haver seres desejáveis e outros indesejáveis. Há relatos de que os microrganismos indesejáveis, como as leveduras, bolores e outros que podem trazer grandes prejuízos

econômicos, como a queda de qualidade da silagem, perdas durante a exposição aeróbia e danos sanitários aos animais (Danner *et al.*, 2003). McDonald *et al.* (1991) de que alguns microrganismos, como os *Clostridium* sp., *Bacillus* sp. e *Listeria* sp. podem promover mais do que perdas de silagem, podendo comprometer a saúde dos animais e até mesmo dos seres humanos. Dessa forma, os OEs têm se mostrado eficientes ao atuarem inibindo esses microrganismos e reduzindo perdas de silagem e causando riscos aos animais e, conseqüentemente, evitando danos econômicos (Danner *et al.*, 2003). Embora não esteja totalmente estudado, acredita-se que cerca de 60% dos óleos essenciais têm propriedades antifúngicas, e 35% exibem propriedades antibacterianas (Bhavanani; Ballow, 1992).

#### 2.4. MECANISMO DE AÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Considerando a grande diversidade de componentes químicos presentes nos óleos essenciais, conciliada com as diferentes concentrações, é provável que a atividade antibacteriana dos óleos não seja determinada por um mecanismo específico, podendo ocorrer uma potencialização do efeito sinérgico entre os diversos componentes encontrados (Bakkali *et al.*, 2008; Pateiro *et al.*, 2021). Portanto, os mecanismos de ação dos OEs ainda não foram bem esclarecidos. Porém, acredita-se não haver apenas um mecanismo específico na célula-alvo, podendo ocorrer variados efeitos, como observado na Figura 2, comprometendo as ações dos organismos afetados (Lambert *et al.*, 2001).



**Figura 2.** Mecanismo de ação antimicrobiana dos óleos essenciais na célula bacteriana. Adaptado de Burt (2004).

Diversos autores correlacionam o mecanismo de ação dos OEs à capacidade de penetração destes nas membranas externas das células bacterianas e nas membranas citoplasmáticas para o interior da célula, desintegrando as estruturas celulares e tornando-as mais permeáveis aos óleos essenciais. Dessa forma, dos mecanismos de ação dos OEs nas células bacterianas, os mais aceitáveis são a alteração do ácido graxo na membrana externa, a danificação da membrana citoplasmática, a depleção da força motriz do próton e o vazamento de metabólitos e íons vitais às células (Rao *et al.*, 2019). Segundo Burt (2004), os possíveis mecanismos de atuação dos óleos essenciais na célula bacteriana mais comumente aceitos como responsáveis pela ação antibacteriana estão relacionados com a capacidade de os princípios ativos dos OEs promoverem danos à parede celular bacteriana, desnaturando e coagulando proteínas. Essa ação altera a permeabilidade da membrana citoplasmática (Benchaar *et al.*, 2008). Esse processo compromete funções vitais para a sobrevivência dos microrganismos (Suzuki *et al.*, 2008).

A membrana externa das bactérias gram-negativas proporciona uma superfície hidrofílica, ocasionada pela presença de moléculas de lipopolissacarídeos (Nikaido *et al.*, 1985). Os terpenoides e fenilpropanoides interagem com a membrana celular bacteriana em virtude da natureza hidrofóbica dos hidrocarbonetos cíclicos presentes nos OEs,

permitindo sua acumulação na bicamada lipídica das bactérias (Chao *et al.*, 2000). De acordo com Calsamiglia *et al.* (2007), essa interação desintegra a membrana bacteriana, tornando-a mais permeável. A alteração na permeabilidade da membrana gera fuga de íons e outros componentes citoplasmáticos, o que reduz o gradiente iônico transmembranar, conduzindo à deterioração dos processos essenciais da célula, como o transporte de elétrons, translocação de proteínas, fosforilação e reações dependentes de enzimas (Figura 2) (Burt, 2004), resultando na perda do controle químico-osmótico da célula, podendo levar à morte bacteriana (Dorman *et al.*, 2000).

Estudos realizados por Lambert *et al.* (2001) observaram que o OE de orégano causou extravasamento de íons de fosfato, enquanto Ultee *et al.* (1999) observaram que o composto carvacrol resultou na perda de íons de potássio. Os microrganismos poderiam contrabalançar esses efeitos dos OEs por meio do uso de bombas iônicas, evitando a morte celular (Calsamiglia *et al.*, 2007). No entanto, esse processo consome excesso de energia, refletindo na redução do crescimento do microrganismo e alterando, conseqüentemente, a composição das populações de microrganismos.

Conforme Chao *et al.* (2000), os componentes terpenoides (principalmente os compostos fenólicos dos OEs) têm propriedades antibacterianas para bactérias gram-positivas e gram-negativas. No entanto, as bactérias gram-positivas parecem ser mais suscetíveis a essas propriedades devido à ausência da camada externa, rica em lipopolissacarídeos, que atua como barreira, restringindo o acesso de compostos hidrofóbicos, como os OEs (Russel, 2002). Em experimentos com OE de capim-cidreira, envolvendo ambos os grupos bacterianos, Naik *et al.* (2010) encontraram maior sensibilidade das bactérias gram-positivas.

De acordo com Calsamiglia *et al.* (2007), os efeitos dos OEs sobre bactérias gram-negativas proporcionam uma limitação devido às propriedades da membrana celular em diminuir a seletividade e aumentar a dificuldade de manipulação da fermentação ruminal, quando os OEs são usados no organismo animal. No entanto, os compostos de baixo peso molecular, como o carvacrol e o timol, podem interagir com a água via pontes de hidrogênio e mediante difusão, cruzando a parede externa até chegar à dupla camada fosfolipídica da parede interna das bactérias gram-negativas (Griffin *et al.*, 1999). Ao avaliarem a atividade antibacteriana do OE de orégano, Albado *et al.* (2001) observaram o efeito antimicrobiano diante das bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* e sobre bactérias gram-negativas, justificando, assim, seu uso na preparação e conservação de alimentos.