

Óleo essencial nanoformulado de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) como aditivo em silagens consorciadas

‘Alecrim Pimenta’ nanoformulated essential oil (*Lippia sidoides*) as additive in consortium silages

Bráulio Maia de Lana Sousa^{1*} , Sebastião de Jesus Santos¹ , Alfredo Acosta Backes¹ , Camilla Mendonça Silva¹ , Jailson Lara Fagundes¹ , Arie Fitzgerald Blank¹ , José Ricardo dos Santos Filho¹ 

¹Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, Sergipe, Brasil.

*Autor correspondente: brauliosousa@academico.ufs.br

Resumo

A presença de microrganismos deterioradores na forragem interfere no processo fermentativo da silagem, devido a competição com as bactérias ácido lácticas por substrato, gerando perdas e influenciando o valor nutritivo do material ensilado. Assim, objetiva-se avaliar o efeito do óleo essencial de Alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) e do timol nanoformulado sobre perfil microbiológico, fermentativo e estabilidade aeróbia de silagem do consórcio de Sorgo (*Sorghum bicolor* var. Ponta Negra) com capim Paiaguás (*Urochloa brizantha* cv. Paiaguás). Foi adotado esquema fatorial 4 x 3, quatro aditivos aplicados nas silagens (tratamento controle; óleo essencial de Alecrim pimenta nanoformulado (OEN); timol nanoformulado 62%; e timol nanoformulado 100% de pureza), associados a três tempos de abertura do silo (15, 30 e 45 dias), com cinco repetições por tratamento, totalizando 60 mini silos. A população de *Clostridium* foi maior no tratamento controle e no OEN. A população de *Lactobacillus* reduziu com o aumento no tempo de abertura do silo. Maiores estabilidades aeróbica foram registradas em silagens com timol nanoformulado 100% com abertura aos 15 dias; e silagens com Timol nanoformulado 62% (tempos de abertura aos 30 e 45 dias). Silagens com timol 100% proporcionaram maiores perdas de matéria seca, gases e efluentes, enquanto que o uso de OEN proporcionou menores perdas de matéria seca e gases. Silos com abertura aos 45 dias apresentaram maiores perdas de matéria seca, gases e efluentes. Silagens de Sorgo e capim Paiaguás que recebem timol nanoformulado foram mais eficientes em controlar as populações de *Clostridium* e *Lactobacillus*, bem como este aditivo melhorou a estabilidade aeróbica da silagem.

Palavras-chaves: estabilidade aeróbica; microbiologia da silagem; sustentabilidade; timol

Abstract

The presence of spoilage microorganisms in forage interferes with the fermentation process of silage, due to competition with lactic acid bacteria for substrate, generating losses and influencing the nutritional value of the ensiled material. Thus, the objective is to evaluate the effect of “Alecrim Pimenta” essential oil (*Lippia sidoides*) and nanoformulated thymol on microbiological, fermentative and aerobic stability profile of sorghum (*Sorghum bicolor* cv. BRS Ponta Negra) silage intercropped with Paiaguás grass (*Urochloa brizantha* cv. BRS Paiaguás). A 4 x 3 factorial design was adopted, with four additives applied to the silages (control treatment; nanoformulated “Alecrim Pimenta” essential oil (OEN); 62% nanoformulated thymol; and 100% pure nanoformulated thymol), associated with three silo period times (15, 30 and 45 days), with five replications per treatment, totaling 60 mini silos. The *Clostridium* population was higher in the control treatment and in the OEN. The *Lactobacillus* population decreased with the increase in silo opening time. Higher aerobic stabilities were recorded in silages with 100% nanoformulated thymol with opening at 15 days; and silages with 62% nanoformulated Thymol (opening period at 30 and 45 days). Silages with 100% thymol provided higher losses of dry matter, gases and effluents, while the use of OEN provided lower losses of dry matter and gases. Silos opened at 45 days showed higher losses of dry matter, gases and effluents. Sorghum and Paiaguás grass silages that received nanoformulated thymol were more efficient in controlling *Clostridium* and *Lactobacillus* populations, and this additive improved the aerobic stability of the silage.

Keywords: aerobic stability; silage microbiology; sustainability; thymol

1. Introdução

O óleo essencial extraído do Alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) possui propriedades fungicidas, bactericidas, moluscicidas e larvicidas ^(1,2), devido principalmente a maior presença do timol, teor aproximado de 62%, o qual é o seu principal constituinte⁽³⁾. Essas especificidades permitem que os óleos essenciais possam ser aplicados nas forragens

conservadas como um aditivo químico ⁽⁴⁾, com possível ação antifúngica e bactericida ⁽⁵⁾, por melhorar o processo fermentativo das silagens, especialmente, por seus constituintes químicos serem não persistentes e de baixa toxicidade ⁽⁶⁾.

Entretanto, apesar do potencial farmacológico dos óleos essenciais de um modo geral as pesquisas sobre seu uso como aditivo para conservação de forragens ensiladas

Recebido: 4 de agosto de 2022. Aceito: 31 de outubro de 2022. Publicado: 26 de dezembro de 2022.



Este é um artigo de Acesso Aberto distribuído sob os termos da Creative Commons Attribution License, que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o trabalho original seja devidamente citado.

<https://revistas.ufg.br/vet/index>

ainda são incipientes. Soyacan-Önenç et al. ⁽⁷⁾ inferem que em silagem de ervilha forrageira com 400 mg de óleo essencial de canela resultou em inibição na formação de fungos durante o período de exposição ao ar nas silagens tratadas. Porém, quando o óleo essencial foi associado ao timol houve aumento dos teores de proteína bruta e matéria seca, diminuição da quantidade de CO₂, além da inibição de mofo após a abertura. Besharati et al. ⁽⁸⁾ verificaram efeitos da utilização de óleo essencial aplicados como aditivo na silagem de alfafa sobre a estabilidade aeróbia e no processo fermentativo, além disso, este aditivo permitiu a redução do pH da biomassa.

Neste contexto, para potencializar a bioatividade antimicrobiana e antifúngica deste óleo essencial a nanoformulação é uma alternativa dentro da biotecnologia, com a finalidade de construir novos materiais em escala de nanômetros ⁽⁹⁾. Assim, é possível melhorar as características dos ingredientes ativos, a solubilidade em água, a forma de armazenamento e a estabilidade térmica, com possibilidade de liberação controlada de compostos importantes, como timol em concentrações reduzidas ^(10, 11).

Diante das informações relatadas, a hipótese adotada na presente pesquisa foi se o óleo essencial nanoformulado de Alecrim pimenta pode melhorar o processo fermentativo quando aplicado em silagens de Sorgo com capim Paiaguás; e verificar se a bioatividade deste óleo advém apenas do Timol nanoformulado. Portanto, objetivou-se avaliar os efeitos da utilização do óleo essencial nanoformulado de Alecrim pimenta (*Lippia sidoides*), do Timol 62 e 100% nanoformulados sobre o perfil microbiológico e fermentativo da silagem de Sorgo com capim Paiaguás.

2. Material e métodos

O estudo foi realizado no município de São Cristóvão/SE, Brasil, latitude 10°55'27'' Sul, longitude 37°11'57'' Oeste e altitude de 5 m, no período de maio de 2018 a maio de 2019. O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Awa, tropical. A precipitação média anual de São Cristóvão é de 1.200 mm, com temperatura média de 25,5 °C e umidade relativa do ar média de 75%.

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 3 constituído por quatro tipos de aditivos antimicrobianos adicionados na massa ensilada de Sorgo com capim Paiaguás (controle com água; o óleo essencial nanoformulado de Alecrim pimenta (*Lippia sidoides*); Timol nanoformulado a 62%; Timol nanoformulado a 100% de pureza); associados a três tempos de abertura dos silos (15, 30 e 45 dias após o fechamento do silo), cada tratamento continha cinco repetições, totalizando 60 unidades experimentais (mini silo de PVC).

O óleo essencial de Alecrim pimenta utilizado no presente estudo foi adquirido na Produtos Naturais Ltda (Pronat Ltda, Ceará, BR). A composição química foi determinada em cromatografo gasoso GC-MS/FID (QP2010 Ultra, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com um amostrador automático AOC-20i (Shimadzu).

O óleo essencial apresentou, 62,05 (Timol); 13,65 (p-cimeno); 6,74 ((E)-cariofileno); 3,51 (Mirceno); 2,15 (γ-terpineno); 1,25 (α-terpineno); 1,14 (timol metil éter); 0,71 (terpinen-4-ol); 0,50 (α-thujeno); 0,32 (α-terpineol); 0,64 (α-pineno); 0,70 (óxido de cariofileno); 0,63 (Carvacrol); 0,30 (Linalol); 0,21 (3-thujen-2-ona isômero); 0,12 (6,7-epoximirceno); 0,14 ((E)-β-ocimeno); 0,12 ((Z)-β-ocimeno); 0,15 (isoterpinoleno); 0,22 (BHA); 0,44 (viridifloreto); 0,14 (β-bisaboleno); 0,19 (δ-cadineno); 0,14 (oct-1-en-3-ol); 0,31 (α-copaeno); 0,55 (aromadendreno); 0,34 (α-humuleno); 0,78 (limoneno); 0,61 (1,8-cineol); 0,21 (δ-3-careno); 0,14 (γ-elemeno); 0,11 (p-cimeno); e <0,1% [acetato de isopentila, acetato de 2-metilbutila, Canfeno, β-pineno, α-felandreno, cis-sabineno hidrato, 3-thujen-2-ona, acetato de butila e miltail-4(12)-eno].

O processo biotecnológico de nanoformulação do óleo essencial de Alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) e do timol foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento Farmacotécnico (Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Sergipe). Foi preparada uma mistura tensoativo e cotensoativo, na proporção 1:1 de Tween 80 e Propilenoglicol sob agitação magnética por 10 minutos. Em seguida, o ingrediente ativo (óleo essencial de Alecrim pimenta - fase oleosa) de densidade 0,983 g/mL foi adicionado lentamente. A mistura do tensoativo-cotensoativo, água e óleo (proporção de 9,0:0,5:0,5 respectivamente) foi homogeneizada por agitação magnética à temperatura ambiente (12). O sistema foi mantido em agitação até sua completa homogeneização. As soluções foram armazenadas em frascos âmbar, em sala com temperatura ambiente de 26°C (variação de 3°C), umidade de 50% (variação de 10%) e ausência de luminosidade.

As plantas forrageiras utilizadas para produção das silagens foram Sorgo (*Sorghum bicolor* var. Ponta Negra) e o capim Paiaguás (*Urochloa brizantha* cv. Paiaguás), cultivados consorciados em sistema de integração lavoura-pecuária.

Sobre as características de implantação, o Sorgo foi implantado com espaçamento de 0,55m entre linhas, com 11 plantas/m linear. A semeadura do capim Paiaguás foi realizada na linha de plantio do Sorgo, de maneira associada à adubação de estabelecimento e, com densidade de 7 kg/ha de sementes puras viáveis.

As forrageiras foram colhidas em média com 100 dias de idade, e a colheita foi realizada de forma

manualmente com auxílio de roçadeira costal. Após o corte o material foi picado mecanicamente em partículas de 3 cm, utilizando um desintegrador estacionário. Este material foi homogeneizado e subdividido em quatro porções de 90 kg por tipo de tratamento mais controle, para aplicação do aditivo correspondente.

A proporção de utilização de cada forrageira para composição das silagens foi, 92,0% de plantas de Sorgo e 8,0% de plantas de capim Paiaguás⁽¹³⁾. O Sorgo apresentava, em média, 2,66% de lâminas foliares verdes, 69,71% de colmos, 6,04% de lâminas foliares mortas e 21,59% de pendão. Já o capim Paiaguás apresentava, em média, 28,66% de lâminas foliares, 62,78% de colmos e 8,56% de forragem morta.

A concentração utilizada de cada aditivo na massa ensilada foi de 400 mg/kg. A aplicação dos aditivos na forragem foi realizada por pulverização, com diluição dos aditivos em 300 mL de água destilada, sendo que o tratamento controle possuía apenas os 300 mL de água destilada.

Posteriormente a forragem verde foi colocada em mini silos experimentais de “PVC” medindo 150 mm de diâmetro e 500 mm de comprimento, cada mini silo tem capacidade para 6 kg. O material ensilado foi compactado com pêndulo de ferro e os silos fechados com tampa de PVC dotados de válvulas tipo “Bunsen”, lacrados com fita adesiva⁽¹⁴⁾. Os mini silos foram armazenados até o período de abertura (15, 30 e 45 dias após o fechamento do silo).

A composição química da biomassa ensilada foi determinada pela metodologia proposta por AOAC⁽¹⁵⁾, sendo que a silagem consorciada apresentou 29,1% de matéria seca, 9,7% de proteína bruta, 65,4% de fibra em detergente neutro, 38,5% de fibra em detergente ácido, 6,7% de lignina, 3,8% de extrato etéreo e 7,9% de cinzas.

Após a abertura dos silos em seus respectivos períodos (15, 30 e 45 dias após o fechamento do silo) cerca de 2 kg do conteúdo foi retirado e homogeneizado; sendo retirada 500 g de biomassa, a qual foi congelada para posterior análise do pH e da microbiologia. O restante foi acondicionado em caixas de isopor sem tampa, mantidas em temperatura ambiente (25°C) em uma sala fechada para a avaliação da estabilidade aeróbia. A temperatura ambiental da sala foi constante, e obtida através de um sistema de ar-condicionado programado para 25°C, sendo controlada através de termômetro de temperatura máxima e mínima acoplada na parede da sala.

Para observação da temperatura da biomassa foram acoplados no centro da massa em cada caixa de isopor um termômetro digital com haste de inox (modelo AK05, AKSO Produtos Eletrônicos, Rio Grande do Sul, Brasil).

A estabilidade aeróbia foi realizada com base na

diferença entre a temperatura da silagem e a temperatura do ambiente, na qual foi analisado o tempo (horas) necessárias para a temperatura do silo se igualar do ambiente, e se elevar em 2° C acima desta temperatura, de acordo com a metodologia sugerida por Cantoia Junior et al. (6). Após 24 horas de exposição aeróbia foram realizadas as análises de pH, posteriormente em intervalos de 12 h até às 240 horas (14). O pH da biomassa ao longo dos dias de exposição aeróbia foi mensurado de acordo com AOAC⁽¹⁵⁾.

Para determinação das perdas de matéria seca, por gases e efluentes, bem como o índice de recuperação de matéria seca foi utilizada metodologia proposta por Pinedo et al.⁽¹⁶⁾.

Para mensuração das populações microbianas (*Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp., Enterobactérias spp., fungos e leveduras) foi preparado um extrato aquoso a partir de 10 g de silagem fresca homogeneizada em 90 mL de água destilada, por 30 segundos no liquidificador industrial⁽¹⁷⁾. A solução obtida foi filtrada, da qual retirou-se 1,0 mL para ser misturada com 9,0 mL de solução tampão fosfato (pH 7,2), obtendo-se diluições que variaram entre 10⁻² e 10⁻⁶ e o plaqueamento para cada diluição foi feito em duplicata.

As populações microbianas foram determinadas em meios de culturas específicos, conforme os seguintes protocolos: Agar “MRS *Lactobacillus* Base” e Agar “*Clostridium* Reforçado” para cultivo de bactérias lácticas e *Clostridium* sp., respectivamente, com mensuração das colônias após 48 horas de incubação em estufa (37°C); Agar “Potato Glucose” para cultivo de fungos e leveduras, sendo a contagem realizada após sete dias à temperatura ambiente; e Agar “Violeta Red Bile” para cultivo de Enterobactérias sp., sendo a contagem feita após 48 horas de incubação em temperatura de 32°C. Os meios de cultura foram produzidos, conforme as descrições dos fabricantes, e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software SAS⁽¹⁸⁾, os dados foram submetidos a análise de variância. Quando verificado efeito significativo da interação do tipo de aditivo e tempo de abertura do silo, os mesmos foram desdobrados fixando um dos fatores. As médias foram comparadas por meio do teste Tukey com 5% de significância.

3. Resultados e discussão

Foi observada interação ($P < 0,05$) entre o tipo de aditivo e o tempo de abertura dos silos sobre a temperatura máxima e acumulada e o tempo de estabilidade aeróbia (Tabela 1). As silagens que receberam tratamento com o óleo essencial de alecrim pimenta nanoformulado (OEN) com período de fermentação de 30 e 45 dias alcançaram as temperaturas

máximas observadas, assim como houve efeito do Timol nanoformulado 62% sobre as silagens, demonstrando que possivelmente baixa eficiência no controle dos microrganismos após abertura. Entretanto, de uma maneira geral, menores temperaturas máximas e acumuladas foram registradas com Timol nanoformulado 100%.

Tabela 1. Temperaturas máximas e acumulada e estabilidade aeróbica da silagem de Sorgo com o capim Paiaguás com diferentes aditivos e tempos de abertura do silo

Tempo de abertura do silo (dias)	Aditivo				CV (%) ¹
	Controle	OEN	Timol 62%	Timol 100%	
Temperatura máxima (° C)					
15	30,7 ab	31,2 Bb	32,1 Aa	29,8 Db	0,8
30	30,9 Ba	31,5 Ab	30,5 Cb	30,5 Ca	0,9
45	30,6 Cb	32,6 Aa	31,8 Ba	30,8 Ca	1,6
CV (%) ¹	0,5	0,7	1,5	1,3	
Temperatura acumulada (° C)					
15	615,1 Cab	623,6 Bb	641,8Aa	595,6 Db	1,9
30	618,9 Ba	629,7 Ab	609,7 Cb	607,1 Ca	2,2
45	612,5 Cb	651,2 Aa	637,1 Ba	615,3 Ca	3,0
CV (%) ¹	0,4	0,7	1,5	1,2	
Estabilidade aeróbica (h)					
15	30,2 Bb	36,8 Bb	38,4 Bb	52,6 Aa	9,4
30	31,0 Bb	42,2 Ba	50,2 Aa	38,2 Bb	7,9
45	40,6 Ba	40,4 Ba	52,6 Aa	40,6 Bb	8,8
CV (%) ¹	3,78	2,50	3,89	4,67	

Para cada característica, médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si ($P>0,05$) pelo teste Tukey. 1CV: Coeficiente de variação.

Para estabilidade aeróbica da massa, foi observado que silagens tratadas com Timol nanoformulados 100% fermentadas por 15 dias levaram 52,6 h para alcançar a

quebra de estabilidade aeróbica; efeito semelhante verificado com Timol nanoformulado 62% (tempos de abertura 30 e 45 dias). Nas silagens controle e que foram tratadas com OEN o aumento no tempo de abertura proporcionou maior tempo em horas para iniciar a quebra de estabilidade aeróbica (Tabela 1).

Dessa forma, verifica-se que sobre as características de estabilidade aeróbica apenas o aditivo com o principio ativo isolado, Timol nanoformulado com 100% de pureza foi eficiente em reduzir o aumento das temperaturas da massa, possivelmente os aditivos baseados em OE (óleo essencial) não conseguiram controlar a proliferação de microrganismos deterioradores, que causam o aumento da temperatura. Segundo Hodjatpanah-Montazeri et al. ⁽¹⁹⁾, ação contra patógenos dos OE é favorecida em ambientes anaeróbios, enquanto que OE tem efeito dependente do pH, sendo mais eficientes em pH mais baixos ⁽⁵⁾. Além disso, é possível que a concentração utilizada no presente estudo tenha sido baixa. Cantoia Junior et al. ⁽⁶⁾ observaram silagens de cana-açúcar tratadas com altas doses de óleo essencial de capim limão (120g/kg) permaneceram estáveis por duas semanas.

Os valores de pH das silagens de Sorgo com o capim Paiaguás variaram nos dias 0, 2 e 3 durante a análise de estabilidade aeróbica ($P<0,05$) em função do tipo de aditivo utilizado e com o tempo de abertura do silo. Foram registrados valores de pH maiores para silagem que recebeu Timol nanoformulado 100% (Figura 1A). Três dias após a abertura do silo, maiores valores de pH foram obtidos na silagem com tratamento controle, e pH reduzido para silagens com Timol nanoformulado 62%. Em relação ao tempo de abertura dos silos foi verificado que a fermentação da massa em 15 dias

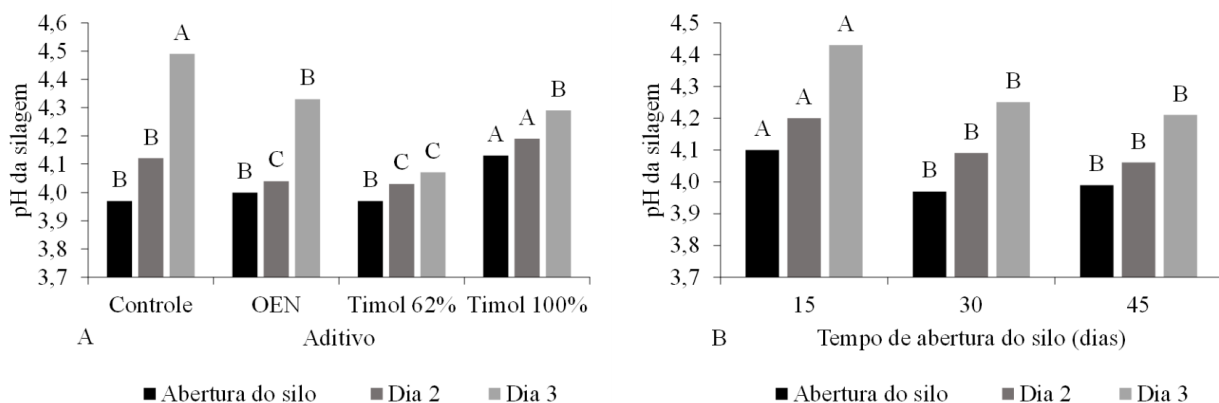


Figura 1. Valores de pH durante a estabilidade aeróbica da silagem de Sorgo com o capim Paiaguás com diferentes aditivos (1A) e tempos de abertura do silo (1B). *Para cada característica, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si ($P>0,05$) pelo teste Tukey.

proporcionou os maiores valores de pH (Figura 1B).

Houve interação ($P < 0,05$) entre o tipo de aditivo utilizado e o tempo de abertura dos silos sobre o pH durante a estabilidade aeróbica, o pH da silagem não variou entre os aditivos utilizados quando o tempo de abertura do silo foi de 15 dias (Tabela 2). Contudo, quando a abertura dos silos ocorreu com 30 e 45 dias, foi observado elevação nos valores de pH nas silagens com Timol 100% nanoformulado. Para os dias quatro e cinco, as silagens que não receberam nenhum aditivo, tratamento controle, apresentaram elevados valores de pH em todos os tempos de abertura avaliados. A silagem com OEN também apresentou elevados valores de pH aos cinco dias. De maneira geral, o aumento no tempo de abertura do silo de 15 para 30 e 45 dias reduziu o pH da silagem, exceto no dia 1 para os aditivos OEN e timol nanoformulado 62 e 100% (Tabela 2).

Vale ressaltar que mesmo ocorrendo variação em relação ao valor de pH das silagens que receberam os aditivos em relação ao tratamento controle, nos três primeiros dias do período da estabilidade aeróbica os valores de pH mantiveram-se abaixo de 4,5, isto indica boa conservação da forragem⁽²⁰⁾. A partir do quinto dia, todas as silagens apresentaram valores de pH acima de 4,5. Contudo, os menores valores de pH obtidos nas silagens com Timol nanoformulado 62 e 100%, indicam que essa substância foi mais eficiente no controle do desenvolvimento de microrganismos aeróbicos como leveduras e fungos. Segundo Chaves et al.⁽⁵⁾, a inclusão de óleos essenciais em silagem de cevada diminuiu o crescimento de leveduras durante exposição da silagem

ao ar por até 7 dias.

Em relação as perdas fermentativas das silagens a utilização do timol nanoformulado 100% resultou em maiores perdas de matéria seca, gases e efluentes, enquanto o uso de OEN proporcionou menores perdas de matéria seca e gases na silagem de Sorgo com capim Paiaguás (Figura 2A). Maiores perdas de matéria seca, gases e efluentes foram registradas no tempo de abertura do silo de 45 dias (Figura 2B).

Tabela 2. Valores de pH durante a estabilidade aeróbica da silagem de Sorgo com o capim Paiaguás com diferentes aditivos e tempos de abertura do silo

Tempo de abertura do silo (dias)	Aditivo				CV (%) ¹
	Controle	OEN	Timol 62%	Timol 100%	
Um dia após a abertura do silo					
15	4,07 Aa	4,00 Aa	3,99 Aa	4,10 Aa	2,09
30	3,99 Bb	3,96 Ba	3,94 Ba	4,13 Aa	3,99
45	3,99 Bb	3,96 Ba	3,99 Ba	4,17 Aa	1,56
CV (%) ¹	0,79	1,64	1,53	1,23	
Quatro dias após a abertura do silo					
15	5,18 Aa	4,59 Ba	4,69 Ba	4,43 Ba	1,89
30	5,05 Ab	4,58 Ba	4,33 Bb	4,34 Bb	3,57
45	5,03 Bb	4,45 Ab	4,22 Db	4,33 Ab	1,65
CV (%) ¹	1,48	2,74	3,78	1,37	
Cinco dias após a abertura do silo					
15	5,90 Aa	5,59 Aa	5,15 Ba	4,84 Ca	3,76
30	5,77 Ab	5,52 Aa	4,85 Ba	4,63 Bb	5,19
45	5,70 Ab	5,50 Ba	4,45 Bb	4,59 Bb	3,46
CV (%) ¹	1,06	3,32	5,91	4,95	

Para cada característica, médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si ($P > 0,05$) pelo teste Tukey. 1CV: Coeficiente de variação.

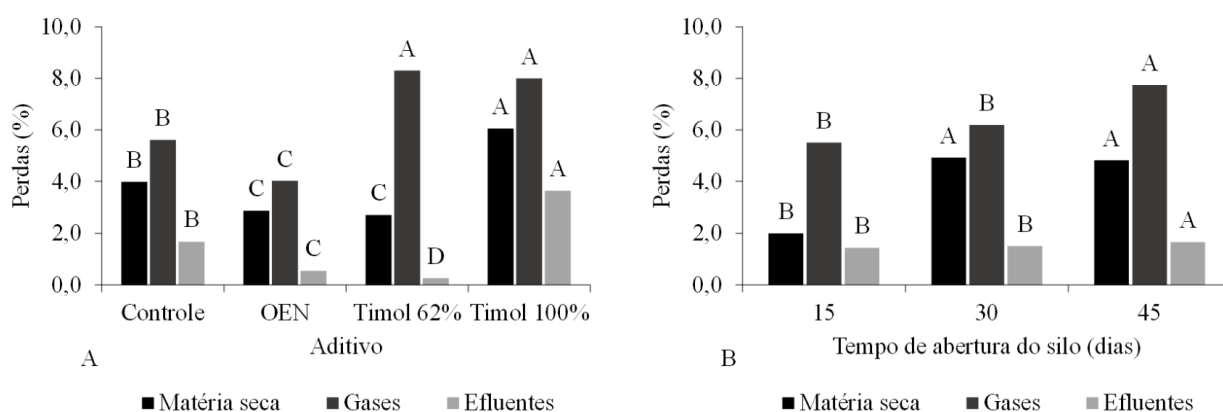


Figura 2. Perdas fermentativas da silagem de Sorgo com o capim Paiaguás com diferentes aditivos (2A) e tempos de abertura do silo (2B). *Para cada característica, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si ($P > 0,05$) pelo teste Tukey.

Estas perdas por gases e matéria seca podem estar relacionadas ao perfil de fermentação ocorrido na silagem, com menor presença de bactérias produtoras de ácido lático. A perda por efluentes também é indesejável,

visto que indica perdas de nutrientes. Segundo Driehuis et al.⁽²⁰⁾, este material contém grandes quantidades de compostos orgânicos como açúcares, ácidos orgânicos, proteínas, minerais (cálcio, potássio e magnésio) e outros

constituintes do material ensilado.

A melhor eficiência do Timol nanoformulado observada no presente estudo em relação ao óleo essencial de Alecrim pimenta nanoformulado (*Lippia sidoides* Cham.) pode estar relacionada a biotecnologia aplicada a esses compostos. A técnica de nanoformulação tem como intuito permitir o melhor aproveitamento dos compostos submetidos a esta biotecnologia, uma vez que protege as substâncias bioativas da degradação e perdas por evaporação, além de permitir uma liberação controlada dos constituintes, aumentando o seu poder de ação ⁽²¹⁾. Quando aplicada aos óleos essenciais as nanoformulações promove maior área específica, solubilidade e mobilidade das partículas, o que contribui para melhor atuação dos óleos essenciais quando comparado aos aditivos convencionais ^(22, 23), como culturas bacterianas, fontes de carboidratos, ácidos orgânicos e conservantes.

As populações de *Clostridium* e de *Lactobacillus* da silagem de Sorgo com o capim Paiaguás foram afetadas ($P < 0,05$) pelo tipo de aditivo utilizado. A população de *Clostridium* foi maior no tratamento controle (4,76 log ufc/g) e com óleo essencial nanoformulado (4,58 logs ufc/g), comparativamente com o aditivo timol nanoformulado 62 e 100% (3,86 e 3,69 logs ufc/g, respectivamente) (Figura 3).

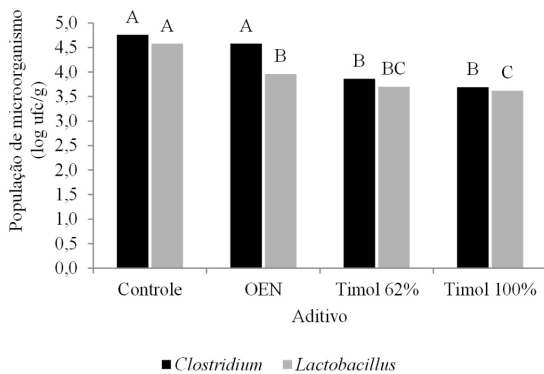


Figura 3. Populações de *Clostridium* e *Lactobacillus* na silagem de Sorgo com o capim Paiaguás com diferentes aditivos. *Para cada cepa bacteriana médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ($P > 0,05$) pelo teste Tukey.

Por sua vez, houve maior crescimento de *Lactobacillus* no tratamento controle (4,58 logs ufc/g) e menor com a adição de timol nanoformulado 62 e 100% (3,70 e 3,62 logs ufc/g, respectivamente). Foi observada redução na população de *Lactobacillus* conforme o aumento no tempo de abertura do silo ($P < 0,05$), apresentando 4,13 log ufc/g (15 dias), 3,99 logs ufc/g (30 dias) e 3,78 logs ufc/g (45 dias) (Figura 4).

De maneira geral, o aumento no tempo de abertura do silo resultou em menor população de *Lactobacillus*,

entretanto sem comprometer o pH da silagem no momento de abertura do silo, os quais estiveram abaixo de 4,2. Isto demonstra flexibilidade para o produtor quanto o tempo em que o silo permanece fechado. Contudo, vale ressaltar que o menor tempo de abertura do silo (15 dias), pode comprometer a qualidade da silagem se a mesma não for utilizada rapidamente, uma vez que a estabilidade aeróbica foi menor e os valores de pH durante esta estabilidade foram maiores em comparação aos tempos de abertura de 30 e 45 dias.

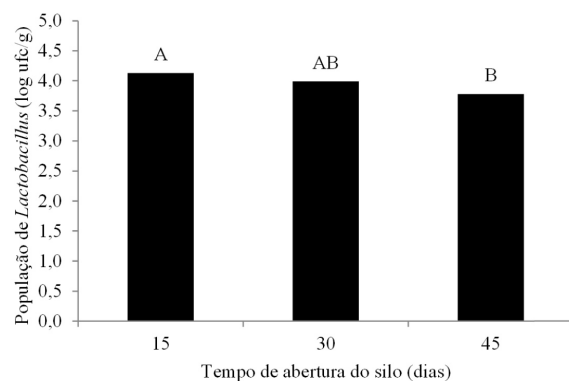


Figura 4. Populações de *Lactobacillus* spp. na silagem de Sorgo com o capim Paiaguás com diferentes tempos de abertura do silo. *Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si ($P > 0,05$) pelo teste Tukey

Nesse sentido, os achados do presente estudo demonstraram que a utilização de Timol 62 e 100% reduziu a população de *Clostridium* e de *Lactobacillus*. A inibição do crescimento de *Clostridium* é desejável para que haja boa fermentação da silagem, uma vez que este microrganismo é responsável pela fermentação butírica⁽²⁴⁾. A presença de ácido butírico indica deterioração da silagem, uma vez que indica a presença de microrganismos indesejáveis, portanto níveis elevados podem comprometer a qualidade da silagem ⁽²⁵⁾.

Em contrapartida, a redução na população de *Lactobacillus* é indesejável no processo, visto que são responsáveis pela produção de ácido láctico, sendo essencial na qualidade fermentativa da silagem. Ao inibir o crescimento dessas bactérias, possivelmente ocorreu redução na produção de ácidos orgânicos como o lático das silagens tratadas com esses aditivos, acarretando em aumento do pH. Contudo, este padrão registrado não afetou negativamente o processo fermentativo, visto que os valores de pH foram de 3,97 (silagem controle), 4,00 (silagem com óleo essencial nanoformulado), 3,97 (silagem com Timol nanoformulado 62%) e 4,13 (silagem com Timol nanoformulado 100%). Estes valores estão situados entre a faixa de pH considerada ideal (3,8 a 4,2) para uma boa conservação da forragem ⁽²⁰⁾.

O ácido lático é o principal produto final da cultura tradicional silagens (por exemplo, milho, grama e

alfafa)⁽²⁶⁾. Segundo Cantoia Junior et al.⁽⁶⁾ as bactérias lácticas tem a função de metabolizar os carboidratos solúveis da massa em ácidos orgânicos.

No presente estudo, a ausência de efeitos do óleo essencial de Alecrim pimenta nanoformulado (*Lippia sidoides* Cham.) sobre as características fermentativas das silagens pode estar associado com a expressiva variação na concentração dos compostos com atividade microbiana do óleo essencial ocasionando em reduzido efeito da atividade bactericida desses óleos^(27, 28), uma vez que de forma geral o uso de Timol nanoformulado utilizado de forma isolada proporcionaram silagens com boas características fermentativas. Além disso, alguns constituintes presentes em pequenas quantidades nos óleos essenciais, como γ -terpineno e p-cimeno, interferem na atividade antimicrobiana dos óleos facilitando a permeabilidade do carvacrol e timol na célula bacteriana⁽²⁹⁾.

De maneira geral, o conhecimento sobre a ação dos óleos essenciais como aditivos em silagens ainda é muito incipiente, portanto, são necessárias mais pesquisas para elucidar os mecanismos de ação desses compostos como aditivo para controlar perdas no processo de fermentação da massa ensilada.

4. Conclusão

O Timol nanoformulado é mais eficiente em controlar os processos fermentativos e a população de *Clostridium*, bem como melhorou a estabilidade aeróbia da silagem de Sorgo com o capim Paiaguás.

Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse

Contribuições do autor

Conceituação: B.M.L. Sousa, A.C. Backes e A.F. Blank. Curadoria de dados: B.M.L. Sousa, J.L. Fagundes. Investigação: S.J. Santos e J.R. Santos Filho. Metodologia: A.C. Backes e A.F. Blank. Gerenciamento do projeto e Validação: B.M.L. Sousa, A.C. Backes e A.F. Blank. Redação (esboço original): S.J. Santos. Redação (revisão e edição): C.M. Silva.

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação Integrado em Zootecnia da Universidade Federal de Sergipe (PIIZ/UFS). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Apoio à Pesquisa e a Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC).

Referências

1. Aguilar-Sánchez R, Munguía-Pérez R, Reyes-Jurado F, Navarro-Cruz AR, Cid-Pérez TS, Hernández-Carranza P, Beristain-Bauza SD, Ochoa-Velasco CE, Avila-Sosa R. Structural, physical, and antifungal characterization of starch edible films added with nanocomposites and Mexican oregano (*Lippia berlandieri Schauer*) essential oil. *Molecules*. 2019; 25(12): 2340.
2. Bruna LD, Priscila FC, Mateus SD, Dalmarcia DS, Felipe RD, Rosangela RD, Ped RR, Talita PD, Fabricio SC, Gil RR. Control of papaya fruits anthracnose by essential oils of medicinal plants associated to different coatings. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2020; 30(6): 239-46.
3. Faraone N, Hillier NK, Cutler GC. Plant essential oils synergize and antagonize toxicity of different conventional insecticides against *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Plos One*. 2015; 10: 1-12.
4. Schmidt P, Novinski CO, Junges D, Almeida R, De Souza CM. Concentration of mycotoxins and chemical composition of corn silage: a farm survey using infrared thermography. *Journal of Dairy Science*. 2015; 98: 6609-6619.
5. Chaves AV, John BAAH, Yuxi W, Tim A, McAllister, CB. Effects of cinnamon leaf, oregano and sweet orange essential oils on fermentation and aerobic stability of barley silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2012; 92(4): 906-915.
6. Cantoia Junior R, Capucho E, Garcia TM, Del Valle TA, Campana M, Zilio EMC, Azevedo EB, Morais JPG. Lemongrass essential oil in sugarcane silage: Fermentative profile, losses, chemical composition, and aerobic stability. *Animal Feed Science and Technology*, 2020; 260: 114371.
7. Soyacan-Önenç S, Koc F, Coşkuntuna L, Özdüven ML, Gümüş T. The effect of oregano and cinnamon essential oils on fermentation quality and aerobic stability of field pea silages. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2015; 28(9): 1281.
8. Besharati M, Palangi V, Niazifar M, Nemati Z. Comparison study of flaxseed, cinnamon and lemon seed essential oils additives on quality and fermentation characteristics of lucerne silage. *Acta Agriculturae Slovenica*. 2020; 15(2): 455-62.
9. Esmaili F, Sanei-Dehkordi A, Amoozegar F, Osanloo M. A review on the use of essential oil-based nanoformulations in control of mosquitoes. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 2021; 11(5): 12516-29.
10. Cruz EM, Mendonça MC, Blank AF, Sampaio TS, Pinto JA, Gagliardi PR, Junior LF, de Lima RS, Nunes RS, Warwick DR. *Lippia gracilis Schauer* essential oil nanoformulation prototype for the control of *Thielaviopsis paradoxa*. *Industrial Crops and Products*. 2018; 1: 117:245-51.
11. Liao W, Badri W, Dumas E, Ghnimi S, Elaïssari A, Saurel R, Gharsallaoui A. Nanoencapsulation of essential oils as natural food antimicrobial agents: an overview. *Applied Sciences*. 2021; 22(13): 5778.
12. Oliveira AP, Santana AS, Santana EDR, Lima APS, Faro RRN, Nunes RS, Lima AD, Blank AF, Araújo APA, Cristaldo PF, Bacci L. Nanoformulation prototype of the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol to population management of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Industrial crops and products*, 2017; 107: 198-205.
13. Santos Filho JR, Sousa BM, Fagundes JL, Backes AA, Silva JW, Andrade GS, Santos AL, Florêncio RS, Silva VC. Establishment of paiaguas palisadegrass in monoculture or in an integration system with other crops. *Ciência Animal Brasileira*. 2021;

22: e-68211.

14. Silva CM, Amaral PNCD, Baggio RA, Tubin JSB, Conte RA, Pivo JCD, Krahl G, Zampar A, Paiano D. Estabilidade de silagens de grãos úmidos de milho e milho reidratado. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 2016; 17(3): 331-343.

15. AOAC - Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. 18th ed. Arlington: AOAC International; 2005.

16. Pinedo LA, dos Santos Arévalo BR, dos Santos BR, Cortes LC, Ribeiro AA, Amorim DS, Chacón SA, de Oliveira PV, Firmino SS, Gomes RN. Dry matter losses and fermentative profile of sorghum silages cultivated in the Western Amazon. *Research, Society and Development*. 2022; 16(8): e20811830668.

17. Coelho MM, Gonçalves LC, Rodrigues JAS, Keller KM, Anjos GVDSD, Ottoni D, Jayme DG. Chemical characteristics, aerobic stability, and microbiological counts in corn silage reensiled with bacterial inoculant. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2018; 53: 1045-1052.

18. SAS Institute. *Statistical Analysis System: user guide [CD-ROM]*. Version 8. Cary (NC): SAS Institute Inc., 2002. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7244/>).

19. Hodjatpanah-Montazeri A, Mesgaran MD, Vakili A, Tahmasebi AM. Effect of essential oils of various plants as microbial modifier to alter corn silage fermentation and in vitro methane production. *Iran Journal of Applied Animal Sciences*, 2016; 6: 269-276.

20. Driehuis F, Wilkinson JM, Jiang Y, Ogunade I, Adesogan AT. Silage review: Animal and human health risks from silage. *Journal of Dairy Science*, 2018; 101(5): 4093-4110.

21. González JOW, Gutiérrez MM, Ferrero AA, Band BF. Essential oils nanoformulations for stored-product pest control – characterization and biological properties. *Chemosphere*, 2014; 130-138.

22. González JOW, Stefanazzi N, Murray AP, Ferrero AA, Band BF. Novel nanoinsecticides based on essential oils to control the German cockroach. *Journal of Pest Science*, 2015; 88(2): 393-404.

23. Montefuscoli AR, González JOW, Palma SD, Ferrero AA, Band BF. Design and development of aqueous nanoformulations for mosquito control. *Parasitology research*, 2014; 113(2): 793-800.

24. Zheng M, Niu D, Zuo S, Mao P, Meng L, Xu C. The effect of cultivar, wilting and storage period on fermentation and the clostridial community of alfalfa silage. *Italian Journal of Animal Science*. 2018; 3(2):336-46.

25. Marques KO, Jakelaitis A, Guimarães KC, Pereira LS. Perfil agronômico, fermentativo e bromatológico da silagem obtida do consórcio entre milho e soja. *Research, Society and Development*, 2021; 10(1): e41410111925-e41410111925.

26. Soundharrajan I, Park HS, Rengasamy S, Sivanesan R, Choi KC. Application and Future Prospective of Lactic Acid Bacteria as Natural Additives for Silage Production—A Review. *Applied Sciences*. 2021 Sep 1;11(17):8127.

27. Santos CP, Pinto JAO, Santos CA, Cruz EMO, Arrigoni-Blank MF, Andrade TM, Santos, DA, Alves PB, Blank AF. Harvest time and geographical origin affect the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. *Journal of Crop Protection*, 2016; 79: 205-210.

28. Souza AA, Dias NAA, Piccoli RH, Bertolucci SKV. Composição química e concentração mínima bactericida de dezesseis óleos essenciais sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 2016; 18: 105-112.

29. Samba N, Aitfella-Lahlou R, Nelo M, Silva L. Coca., R.; Rocha, P.; López Rodilla, JM. Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Lippia multiflora* Moldenke Essential Oil from Different Regions of Angola. *Molecules*. 2021; 26: 2-28.