

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DESENVOLVIMENTO DE MICRORGANISMOS E VALOR
NUTRITIVO DE SILAGENS DE CAPIM-TIFTON 85**

Jussimara Manoela Nascimento Silva

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo Andrade Reis**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Zootecnia – Área de Concentração: Produção Animal, como parte das exigências para a obtenção do Título de Doutor em Zootecnia.

**NOVEMBRO - 2002
Jaboticabal - SP**

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

JUSSIMARA MANOELA NASCIMENTO SILVA - Nascida em Botucatu em 09 de Janeiro de 1971. Curso de Graduação em Zootecnia realizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP -concluído em julho de 1994. O curso de Mestrado em Zootecnia, Área de Concentração: Nutrição e Produção Animal foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu, sob a orientação do Prof. Dr. Ciniro Costa e concluído em março de 1998. O curso de Doutorado em Zootecnia, Área de concentração: Produção Animal foi realizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP, sob a orientação do Prof. Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino e a co-orientação do Prof. Dr. Ricardo Andrade Reis e concluído em Novembro de 2002.

À minha mãe, Dirce,
Por acreditar em mim.

Ofereço.

Ao meu filho Victor e ao meu marido César,
pela paciência e carinho de sempre.

“As pessoas que nos são caras estão continuamente
presentes em nós.”

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, presente em todos os momentos de minha vida.

Ao Prof. Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino, pela orientação e compreensão nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Ricardo Andrade Reis, pela co-orientação, ajuda e amizade de sempre.

À Profa. Dra. Rita de Cássia Panizzi pelos ensinamentos e sugestões apresentadas.

Ao Prof. Dr. Manoel Henrique Salgado pela elaboração das análises estatísticas.

À amiga Salete Dezen Vieira pela presteza, amizade e ajuda inestimável.

A todos os amigos do Laboratório de Microbiologia, em especial à técnica Silvana

Aos amigos Rogério Marchiori Coan, Márcio dos Santos Pereira e Thiago Fernandes Bernardes pela amizade, atenção e a ajuda na condução do experimento.

Aos funcionários do Laboratório de Nutrição Animal, em especial ao amigo Alexandre Biondi pelo auxílio na condução das análises.

A todos os colegas de Pós-Graduação pela amizade e convivência que sempre vou me lembrar.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

A todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse concluído.

Muito Obrigada

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
- CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	01
REFERÊNCIAS.....	19
- CAPÍTULO 2 – Desenvolvimento de microrganismos no capim-Tifton 85 ensilado com diferentes conteúdos de umidade.....	28
RESUMO.....	28
INTRODUÇÃO.....	29
MATERIAL E MÉTODOS.....	31
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS.....	57
- CAPÍTULO 3 – Valor nutritivo do capim-Tifton 85 ensilado com diferentes conteúdos de umidade.....	64
RESUMO.....	64
INTRODUÇÃO.....	65
MATERIAL E MÉTODOS.....	66
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS.....	79

DESENVOLVIMENTO DE MICRORGANISMOS E VALOR NUTRITIVO DE SILAGENS DE CAPIM-TIFTON 85

RESUMO – Objetivou-se estudar o valor nutritivo e desenvolvimento de fungos e de *Listeria* spp. no capim-Tifton 85 (híbrido de *Cynodon*, PI 290884 originário da África do Sul com o Tifton 68 (*Cynodon nlemfuensis*) ensilado sem emurchecimento (umidade 60-70%), submetido a pré-secagem (umidade 40-50%) e com adição ou não de polpa cítrica (5% do peso verde). As amostras foram colhidas na abertura dos silos e aos 15 e 30 dias após a abertura, para avaliação da ocorrência de *Listeria* spp e de fungos, do padrão de fermentação (pH, N amoniacal, ácidos orgânicos), teores de matéria seca, de proteína bruta, de nitrogênio associado a parede celular, dos constituintes da parede celular e digestibilidade "in vitro" da matéria seca (DIVMS). Os dados foram analisados segundo o delineamento em blocos completos casualizados, em esquema de parcela subdividida, sendo que nas parcelas foram avaliadas as silagens submetidas ao emurchecimento e uso ou não de polpa cítrica e nas subparcelas os períodos de exposição ao ar, com quatro repetições. Constatou-se a presença de *Listeria* spp em 65,6% das silagens de alta matéria seca, sendo que destas 10% foram positivas para *Listeria monocytogenes*. As silagens de alta matéria seca apresentaram pouca estabilidade aeróbia, tendo sido registrado aumento na ocorrência dos fungos *Penicillium*, *Fusarium* e *Pithomyces* com o prolongamento do período de exposição ao ar. Esses resultados evidenciaram o risco potencial que silagens de gramíneas com alto conteúdo de matéria seca pode representar para a saúde dos animais e humanos. Em termos de padrão de fermentação observou-se baixos teores de ácidos orgânicos e de N amoniacal, altos valores de pH, provavelmente devido aos elevados conteúdos de matéria seca causados pelo emurchecimento e adição de polpa cítrica. A análise dos teores de N-NH_3 / N total e de N total evidenciaram baixa produção de amônia em silagens com alto teor de MS, provavelmente pela inibição da atividade das bactérias do gênero *Clostridium*, preservando assim a fração PB. As frações N-FDN e N-FDA aumentaram devido ao aquecimento promovido por microrganismos aeróbios durante o

período de aeração das silagens de alta matéria seca. Os teores dos componentes da fração fibrosa e a DIVMS das silagens de alta matéria seca não foram afetados pelo emurchecimento, adição de polpa cítrica e períodos de exposição ao ar.

Palavras-Chave: aditivos, silagem de capim, gramínea tropical, estabilidade aeróbia.

TITLE: MICROORGANISMS OCCURRENCE AND NUTRITIVE VALUE OF GRASS-TIFTON 85 SILAGES

ABSTRACT – This research was conducted to evaluate the nutritive value and fungal and *Listeria* spp. occurrence of the no wilted (60 to 70% of moisture) and wilted (40 to 50% of moisture) Tifton 85 ensiled with or without citrus pulp (5.0% of the wet weight). The high dry matter silage were harvested, immediately after the silos opening, also 15 and 30 days after the air exposition. It was evaluated the *Listeria* and fungal occurrences, fermentation characteristics (pH, amoniacal nitrogen, organic acids), values of dry matter, crude protein (CP), neutral detergent insoluble nitrogen (NDIN), acid detergent insoluble nitrogen (ADIN), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), and "in vitro" dry matter digestibility (IVDMD). The data were analyzed according to a randomized block design in split plot scheme, being the silages studied in plots and the periods of air exposure in the split plots, with four replications. It was observed *Listeria* spp in 65.6% of the high dry matter silage samples, and *Listeria monocytogenes* occurred in 10.0% of these samples. The high dry matter silage was air unstable and *Penicillium*, *Fusarium* e *Pithomyces* occurrence increased during the air exposition period. These data showed the potential risk that the high dry matter grass silage could represent to the animal and human health. In relation to the fermentation characteristics, it was observed lowest values of amoniacal nitrogen, organic acid, and highest pH values, probably due to the high dry matter content of the silage. The high dry matter silage showed lowest N-NH₃/N total values, preserving the crude protein content, probably caused by the low *Clostridium* activity. The NDIN and ADIN contents increased during the air exposition periods, in function of the microorganism's activity, resulted in high temperature of the high dry matter silage. The wilting or citrus pulp addition and air exposition did not affect the cell wall contents and IVDMD of the Tifton 85 high dry matter silage.

KEYWORDS: additives, grass silage, tropical grass, aerobic stability

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Estacionalidade da produção das plantas forrageiras e a necessidade de estratégias conservacionistas

A alimentação de ruminantes e de eqüinos depende, em sua quase totalidade, da biomassa oriunda das pastagens, cuja disponibilidade durante o ano é condicionada pela estacionalidade da produção forrageira, que afeta diretamente a produção animal devido às modificações quantitativas e qualitativas das forrageiras.

Estudos sobre a dinâmica de crescimento e acúmulo de matéria seca em pastagens, apontam para uma distribuição desuniforme de produção forrageira, perfazendo 75 a 85% do total no verão e 25 a 15% no inverno, indicando grande estacionalidade e potencial para conservação, através da ensilagem e/ou fenação.

Nas condições climáticas do Brasil central, durante os meses de verão, observa-se que há ocorrência de 50% de dias propícios à secagem do material no campo, ou seja, com a ausência de chuvas, temperatura elevada, umidade relativa baixa e ocorrência de ventos (REIS & RODRIGUES, 1998).

O objetivo da ensilagem é a preservação da forragem pela estimulação da fermentação láctica através da população de bactérias epifíticas produtoras de ácido láctico (BAL), as quais proporcionam uma rápida redução do pH, minimizando mudanças no valor nutritivo da planta (DAVIES et al., 1996). As silagens de gramíneas tropicais perenes passaram a ter projeção em planos nutricionais, nos últimos anos, devido ao surgimento ou melhoria das condições de colheita e processamento físico, da forragem e na estocagem. Os principais avanços tecnológicos que levaram a melhoria do sistema de conservação são descritos como sendo: melhoramento genético de plantas forrageiras associadas às práticas de manejo de pastagens, surgimento de equipamentos de colheita com desempenho favorável, redução da área de plantio, custo e risco quando comparadas à cultura tradicional como a do milho.

Da necessidade de buscar mecanismos viáveis para produção de volumosos em

quantidade e com qualidade no verão, a silagem emurchecida surge como alternativa para programas de conservação de forragem. A técnica do emurchecimento possibilita a ensilagem de plantas forrageiras, com teor de matéria seca intermediário, num processo em que as fermentações indesejáveis são controladas através da diminuição da atividade da água ou elevação da pressão osmótica, o que limita o crescimento de bactérias do gênero *Clostridium* (McDONALD et al., 1991).

1.2 O capim-Tifton

A conservação da forragem produzida no verão, para o fornecimento durante o inverno é possível com plantas do gênero *Cynodon*. Esta prática, quando executada adequadamente poderá produzir alimentos volumosos de valor nutritivo elevado compatível às alternativas tradicionais (CORSI & MARTA JÚNIOR, 1998).

O capim bermuda Tifton 85 é um híbrido de *Cynodon*, do PI 290884 originário da África do Sul com o Tifton 68 (*Cynodon nlemfuensis*).

É uma planta perene, estolonífera e rizomatosa apresentando colmos e folhas mais finos que o capim-Tifton 68, e maiores do que o capim Coastcross 1. Os estolões apresentam coloração verde e pigmentação roxa pouco intensa. É um capim recomendado para fenação e para pastejo em decorrência da boa relação folha/colmo, sendo aceito por eqüinos, bovinos e caprinos (RODRIGUES et al., 1998).

O capim-Tifton foi selecionado por sua alta produtividade e digestibilidade, quando comparada com a maioria das outras plantas do gênero *Cynodon* (PEDREIRA, 1996).

As plantas do gênero *Cynodon* são eficientes produtores de matéria seca superando 20 toneladas por hectare por ano, principalmente sob manejo que envolve adubação nitrogenada. Embora as hastes em crescimento desta gramínea apresentem elevada digestibilidade (75 a 85%), a maturação ocorre rapidamente e com isso a digestibilidade sofre redução para valores próximos a 30%. Este decréscimo é associado ao aumento no conteúdo de parede celular, que perde valor nutritivo continuamente ao longo da maturação (NUSSIO et al. 1998).

1.3 Adequação de gramíneas tropicais ao processo de ensilagem

Quantidades adequadas de substrato potencialmente fermentecível, poder tampão relativamente reduzido e porcentagem de matéria seca acima de 30% são reconhecidas como características importantes para a obtenção de padrões desejáveis de fermentação e conservação de forragem, através da ensilagem (McDONALD et al., 1991).

É importante considerar os fatores inerentes à forragem tropical, como matéria seca e os estádios de crescimento em que apresentem um alto valor nutritivo. Estas características colocam em risco o processo de conservação, com probabilidade de surgirem fermentações secundárias, refletindo negativamente nas perdas de matéria seca (VILELA, 1998). Limitações dessa natureza podem ser parcialmente controladas pelo aumento na concentração de matéria seca, através do emurchecimento, ou pela utilização de aditivos que possam contribuir para acelerar e estabilizar a fermentação.

As plantas forrageiras tropicais, em geral, apresentam teores elevados de fibra e baixas concentrações de conteúdo celular.

Embora as gramíneas tropicais para a ensilagem necessitem ser colhidas no seu estágio vegetativo precoce, quando o teor de proteína permanece elevado, existe o inconveniente de que nesta oportunidade o teor de umidade é elevado, podendo afetar negativamente a qualidade da fermentação da silagem (McDONALD et al., 1991)

Um fator que também influi em plantas forrageiras é a temperatura, principalmente a ambiente, onde a cada 10⁰ C de aumento na temperatura por unidade de tempo, ocorre maior lignificação da parede celular da forragem, em consequência da maior velocidade no metabolismo dos açúcares (VILELA, 1994).

O estágio de maturidade da planta forrageira, na colheita, influencia o seu valor nutritivo. À medida que a planta cresce e se desenvolve, os teores de FDN, FDA e de lignina aumentam, enquanto o teor de proteína bruta e os valores de digestibilidade são reduzidos. As plantas forrageiras maduras permitem menor consumo voluntário, devido

às mudanças estruturais e bromatológicas ocorridas com o avanço da maturidade, que decresce a taxa de digestão, retarda a passagem e, conseqüentemente, reduz o consumo. Portanto é relevante o conhecimento do momento de colheita, pois a forragem de melhor valor alimentício certamente promoverá maior consumo e desempenho animal (RIBEIRO et al., 2001).

O teor de proteína das forragens tropicais raramente é superior a 12% e na maioria das vezes os valores são menores que 7%. Em muitos casos, as silagens de gramíneas tropicais mostram valores de proteína abaixo de 6%, pois estes materiais são ensilados na maior maioria das vezes em estágio fisiológico avançado. As plantas tropicais, além de apresentarem baixos teores de proteína, também apresentam baixos teores de nitrogênio como proteína verdadeira. A maior parte do nitrogênio nestas gramíneas está relacionado a fração não protéica, porém é provável que isto seja aceitável somente para plantas muito novas, que ainda não tenham atingido o ponto de ensilagem. Deste modo, plantas aptas a serem ensiladas apresentam as frações associadas à parede celular (N-FDN e N-FDA) em maiores proporções. O N-FDN tem ampla variação entre as análises bromatológicas encontrando-se valores entre 25 a 70% do nitrogênio total, sendo a maior freqüência na faixa de 40 a 60% (BALSALOBRE et al., 2001).

Uma das possíveis razões do baixo desempenho de animais alimentados com silagens de gramíneas tropicais perene é o baixo valor nutritivo na idade normalmente utilizada para o seu corte, associados com efeitos fisiológicos provocados pelas interações com o meio ambiente. A condição de aerobiose dentro do silo pode acarretar características indesejáveis, tanto de composição química e padrão de fermentação quanto de microrganismos indesejáveis.

RANJIT & KUNG JÚNIOR (2000) demonstraram que quando as silagens são expostas ao ar, microrganismos oportunistas iniciam a atividade metabólica, produzindo calor e consumindo nutrientes, resultando em perdas, as quais, segundo McDONALD et al. (1991), podem chegar a 15%.

VILELA (1998) destaca que durante a primeira fase da fermentação pode haver

intensa proteólise, resultado da geração de peptídeos e aminoácidos, e depois decompostos em amônia e aminas. A maioria das enzimas vegetais que degradam as proteínas são ativas somente em pH superior a 5, sendo que a acidificação desnatura essas enzimas e minimiza as perdas de proteínas.

1.4 Emurhecimento

A técnica do emurhecimento, ou pré-secagem possibilita a ensilagem de forrageiras colhidas com baixo teor de matéria seca, num processo em que as fermentações indesejáveis são controladas através da elevação da pressão osmótica (de FARIA & CORSI, 1992). No entanto, a desidratação da planta dificulta o seu corte em partículas pequenas, bem como a compactação e a exclusão do ar da massa ensilada. A redução no teor de umidade das plantas a serem ensiladas poderá ser realizada através do emurhecimento por exposição ao sol ou pela utilização de aditivos que contenham elevada concentração de matéria seca (VILELA, 1984).

CHAMBERLAIN & WILKINSON (2000) de acordo com WILKINSON (1985) propuseram um período máximo de secagem no campo de 24 horas, pois longos períodos de secagem podem resultar em grandes perdas de matéria seca, principalmente de proteína, alterando a proporção do N-proteico que proporcionará redução no consumo de matéria seca e carboidratos solúveis, reduzindo o valor energético da silagem, enquanto curtos períodos proporcionam pequenas perdas pela respiração com aumento significativo na concentração de matéria seca da forragem.

NASCIMENTO et al. (1998) trabalharam com o emurhecimento da alfafa ao sol até perder 50, 60 e 80% do peso, em seguida o material era levado para o galpão e mantido espalhado e amontoado. O método mais adequado para a conservação da alfafa na forma de feno consistiu no emurhecimento ao sol até a perda de 50% do peso da forragem original, com posterior secagem do material espalhado à sombra.

Segundo FROST et al. (1995) o emurhecimento tende a reduzir a concentração dos produtos potencialmente fermentáveis, sendo a desidratação da massa o efeito

mais importante, resultante da ação direta do tratamento.

O emurchecimento em gramíneas ou leguminosas pode melhorar a qualidade da silagem, reduzindo ou eliminando perdas por efluentes, restringindo a fermentação butírica devido ao aumentando na pressão osmótica, melhorando a estabilidade aeróbia.

Como resultado, na fase de fermentação ocorre a produção de pequenas quantidades de ácidos orgânicos e as silagens se estabilizam com pH mais alto. Em silagem bem preservada, carboidratos solúveis e proteínas são pouco afetados pela fermentação, proporcionando um bom alimento para o animal, geralmente de alta aceitabilidade (VAN SOEST, 1994).

ANDRADE et al. (1997) comparando a produção de matéria seca e o valor nutritivo do capim Coastcross 1, sob as formas de feno, silagem e silagem emurchecida, observaram que o teor de matéria seca na forma de silagem úmida e emurchecida após a abertura com 28, 35, 42 e 49 dias foi de 30,8; 27,9; 31,7; 35,7% e 49,8; 48,2; 50,9; 51,2%, respectivamente.

MARTINS (1997) notou aumento no teor de matéria seca de forragem e redução da concentração de nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) em silagem emurchecida, enquanto na úmida foi observado alto teor de NIDA (nitrogênio insolúvel em detergente ácido) o que pode ser devido ao aquecimento durante a fermentação.

A qualidade da silagem com alto teor de matéria seca (>40%) é dependente de dois fatores principais: o efeito termodinâmico e presença de oxigênio. A importante causa de perda de matéria seca por calor não envolve reação biológica, inclui a reação de Maillard (VAN SOEST, 1994).

Silagens, geralmente com elevados teores de matéria seca, estão sujeitas a elevação de temperatura na massa ensilada. As condições de umidade e temperatura acima de 55 ° C são favoráveis à ocorrência de reações não enzimáticas entre os carboidratos solúveis e grupos aminas dos aminoácidos, resultando em compostos denominados produtos da reação de Maillard (MOSER, 1980; VAN SOEST, 1994). A formação de produtos de Maillard em silagens superaquecidas promove diminuição

acentuada na digestibilidade da proteína, uma vez que se pode observar aumentos consideráveis nos teores de nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) o qual é indisponível para os microrganismos do rúmen (VAN SOEST, 1994).

A cor verde presente em silagens pré-secadas é alterada para vários tons de marrom. A extensão das alterações na cor fornece indicação da intensidade do aquecimento no armazenamento e ocorrência da reação de Maillard.

1.5 Aditivos

As gramíneas tropicais para a ensilagem necessitam ser colhidas no seu estágio vegetativo precoce, quando o teor de proteína permanece elevado, mas existe o inconveniente de que nesta oportunidade o teor de umidade é maior (McDONALD et al., 1991). Limitações dessa natureza podem ser parcialmente controladas pelo aumento na concentração de matéria seca pela utilização de aditivos que possam contribuir para acelerar e estabilizar a fermentação.

A aditivação com polpa objetiva aumentar a quantidade de energia disponível para a fermentação, aumentar os teores de matéria seca, absorvendo parte da umidade em excesso, permite também um acréscimo de nutrientes à massa ensilada, melhorando a qualidade da silagem.

O aditivo a ser utilizado no capim deve ser de fácil manipulação, boa disponibilidade no mercado, baixo custo de aquisição. A polpa cítrica tornou-se uma alternativa interessante para a nutrição animal em regiões produtoras de citrus, haja vista a alta qualidade do ingrediente e o baixo custo da aquisição. A alta capacidade de absorção de água e a concentração elevada de carboidratos solúveis, substratos disponíveis para as bactérias fermentadoras possibilita a inclusão de polpa cítrica na ensilagem de gramíneas tropicais. MORAIS (1999) sugere que dos produtos disponíveis comercialmente no Brasil, a polpa cítrica apresenta um grande potencial para ser usada como aditivo de silagem de gramíneas, devido às suas características qualitativas.

Segundo VILELA (1998), a polpa cítrica é capaz de absorver 145% de seu peso em umidade, quando em contato com forrageiras úmidas, preservando assim nutrientes que seriam perdidos na forma de efluente ou fermentações indesejáveis. A dose recomendada na mistura varia de 5 a 20% na matéria verde do capim, e além de melhorar a fermentação no silo aumenta aceitação da silagem pelos animais.

INGARASI (2002) relatou que adição de polpa cítrica em silagens de Tifton 85 melhorou as características fermentativas (pH, nitrogênio amoniacal), diminuiu as perdas no processo fermentativo (efluentes e gases), aumentou a recuperação da matéria seca.

PEDREIRA et al. (2001) Trabalhando com silagem de Tifton 85 concluíram que a adição de 5% de polpa cítrica peletizada promoveu um aumento no teor de matéria seca, possibilitando uma melhor conservação da silagem.

Aditivos são usados na ensilagem com objetivos de melhorar a qualidade da fermentação no silo pelo aumento no teor de matéria seca, reduzir a perda de nutrientes pelo controle da respiração e da fermentação durante o período de armazenamento e aumentar o consumo de matéria seca (VILELA, 1984; WILKINSON, 1998).

A polpa cítrica peletizada tem sido incluída em muitos estudos de silagem de capim, pois além de ser fonte de nutrientes, fornece carboidratos solúveis que melhoram a qualidade da fermentação no silo e apresenta elevada capacidade absorvente.

1.6 Vedação do silo

De acordo com o manual de revestimento de fardos TRIOPLAST AB (1995), durante os anos 70, as primeiras embalagens de silagens em polietileno foram usadas no Reino Unido, gerando resultados variáveis, principalmente devido à quantidade excessiva de ar remanescente na embalagem, e a dificuldade em se obter eficiente

vedação do sistema. No decorrer dos anos, os equipamentos utilizados no revestimento de fardos foram sendo aperfeiçoados, tornando o sistema totalmente automatizado. A popularização desta técnica se deu pelas seguintes vantagens: silagens revestidas podem ser facilmente comercializada com base no seu valor nutritivo, pois os fardos podem ser embalados gradativamente associando parâmetros quantitativos e qualitativos da forragem. O sistema requer menores investimentos fixos e os custos podem ser limitados usando-se a terceirização ou parceria na utilização dos equipamentos; cada fardo é uma unidade vedada, geralmente muito mais desidratada do que a silagem à granel, onde a probabilidade de efluentes é extremamente pequena e há facilidade de armazenamento e transporte.

Segundo CHAMBERLAIN & WILKINSON (2000) a silagem revestida por lona apresenta vantagens quanto a qualidade nutricional, uma vez que a melhor vedação leva a um padrão de fermentação mais restrito, onde o aumento do consumo se deve à menor acidez da silagem. O menor consumo de silagem é provavelmente resultado de perdas na fermentação, geralmente é caracterizado por mudanças na fração dos carboidratos solúveis e proteína que são transformados em ácidos acético e butírico e nitrogênio não protéico, respectivamente.

O emurhecimento é importante para se atingir uma adequada fermentação e densidade do fardo, sendo os melhores resultados obtidos com uma concentração igual ou superior a 45% MS, e não havendo necessidade de aditivos para concentração acima de 40%. O emurhecimento utilizado de forma adequada poderia ajudar a aumentar a densidade do fardo, uma vez que dificilmente a ação da enfardadeira poderia desidratar as células vegetais inteiramente, durante o curto período envolvido na compressão da silagem.

REIS & PEREIRA (2001) consideram que o ideal para ensilagem é que a forragem apresente teores de matéria seca entre 35 e 45%, sendo que para os teores entre 40 a 45% é recomendável que a forragem seja picada em partículas menores, a fim de se conseguir uma melhor compactação.

O processamento físico através da picagem e esmagamento pode melhorar o

processo de conservação da silagem, permitindo melhor acomodação do material dentro do silo, diminuindo a fase aeróbica da ensilagem. LAVEZZO (1985) recomendou que a trituração de capim visando a ensilagem deve ser em partículas de 3 a 5 cm de tamanho, para permitir uma melhor compactação e, por conseguinte garantindo um ambiente anaeróbico mais rapidamente. Tamanhos de partículas mais reduzidos podem favorecer a fermentação, facilitando a compactação, promovendo maior superfície de contato entre o substrato e microrganismos (AGUIAR et al., 2001).

DULPHY & DEMARQUILLY (1973) relataram que a qualidade de conservação da silagem foi melhor em silagens finamente picadas (< 3 cm) que aquelas sob partículas maiores. O pH, a porcentagem de proteína degradada em amônia, o conteúdo de ácido butírico e o total de ácidos graxos voláteis foram baixos, e o conteúdo de ácido láctico foi alto na silagem finamente picada.

1.7 Efeitos da *Listeria* em silagens

É importante considerar, que no processamento da forragem para a produção de feno ou de silagem, ocorrem alterações na população de microrganismos que resultam em modificações na composição química e valor nutritivo da forragem.

De maneira geral, tem-se no processo de ensilagem profunda modificação na população de microrganismos devido às condições anaeróbicas e de baixo pH que ocorrem dentro do silo. Muitas vezes no processo de ensilagem, e mesmo condições inadequadas de armazenamento resultam em aumento da população de microrganismos indesejáveis.

Dentre as espécies de *Listeria*, a *L. monocytogenes* é inquestionavelmente patogênica ao homem e aos animais, ao contrário da maioria dos patógenos de origem alimentar que geralmente provocam sintomas gastrintestinais, as principais manifestações clínicas de listeriose são inicialmente semelhantes a de um resfriado, com febre baixa e mal-estar geral, podendo progredir para meningite, meningoencefalite, septicemia, aborto ou parto prematuro (SILVA et al., 2001).

Cabe destacar a presença da bactéria *Listeria monocytogenes* em forragens ensiladas, o seu desenvolvimento está diretamente ligado ao pH. Quando este for inferior a 5,2 a *Listeria monocytogenes* não se desenvolve, mas sua destruição ocorre somente em pH mais ácido. Em silagens com o pH elevado poderá ocorrer desenvolvimento de listeria, salvo se o teor de matéria seca for muito elevado, ao redor de 70% (CORROT, 1998). A bibliografia mostra que a contaminação com listeria ocorre principalmente nas regiões periféricas do silo onde há alterações na conservação da silagem. Portanto, deve-se proceder a eliminação dessa silagem mal conservada para evitar problemas de contaminação.

A bactéria conhecida hoje como *Listeria monocytogenes* foi descrita pela primeira vez por Murray e colaboradores (1929) como a causadora de doença de cobaias de laboratório e coelhos, do departamento de Patologia da Universidade de Cambridge. Os autores propuseram o nome de *Bacterium monocytogenes* para o organismo devido à elevação característica nos valores sanguíneos de leucócitos mononucleares (SCHELECH et al., 1983). Em 1925, Pirie isolou um organismo muito similar e ele o chamou de *Listerella hepatolytica* pelo comprometimento hepático durante a infecção. A similaridade dos organismos descritos pelos diferentes pesquisadores levou, em consenso, ao nome de *Listerella monocytogenes*, posteriormente modificado para *Listeria*. É interessante ressaltar, que ambos pesquisadores atribuíram as infecções dos animais ao consumo de alimentos contaminados (POST, 1994).

O gênero *Listeria* encontra-se atualmente constituído por cinco espécies (*L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivannovii*, *L. innocua* e *L. welshimeri*) e as outras espécies foram reclassificadas.

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva, psicrotolerante, que se apresenta na forma de bastonetes curtos e regulares. É desprovida de cápsula, não formadora de esporos, anaeróbios facultativos e que está associada a infecções veiculadas por alimentos, catalase positivas e não produtoras de gás sulfídrico. Sua temperatura ótima de crescimento está entre 30⁰ e 37⁰ C (DOYLE, 1988), embora seja

capaz de multiplicar-se entre 0^o e 45^o C (WELBOURN & WILLIAMS JÚNIOR., 1999), sendo capaz, portanto de se multiplicar, mesmo que lentamente, sob condições de refrigeração.

Em estudos realizados por DOYLE (1988) e EIROA (1990) há relatos de que a *L. monocytogenes* resiste a um amplo intervalo de pH, variando de 5,0 a 9,6. Em algumas situações especiais, foi relatada a ocorrência de microrganismos em pH 4,3 (PAPAGEORGIU & MARTH, 1989) e pH 4,8 (CONNER et al., 1986). FENLON (1985) mencionou que a bactéria era capaz de manter-se viável em pH 4,0 ou inferior, em silagem de boa qualidade.

Apesar de ser reconhecida como um patógeno de importância veterinária desde 1925 e como agente de listeriose humana desde 1929, somente na década de 80 foi considerada passível de ser veiculada por alimentos (EIROA, 1990). Animais infectados pela bactéria, embora assintomáticos, podem veiculá-la pelo leite e a sua presença tem sido constatada em vários países (LOKEN et al., citado por ROSENOW & MARTH, 1987).

A forma como a bactéria *Listeria monocytogenes* passa do intestino para a corrente sanguínea para atingir diferentes tecidos do organismo foi identificada por pesquisadores do Instituto Pasteur, em Paris. A ingestão de *Listeria monocytogenes* em alimentos contaminados pode causar a listeriose. Esta bactéria passa pelo estômago, atravessa o intestino, atinge a circulação sanguínea para se disseminar no sistema nervoso central ou na placenta. Ainda não se conheciam os mecanismos moleculares que permitiam a essas bactérias atravessarem a barreira intestinal. Pesquisadores haviam identificado em células intestinais humanas em cultura, a interação entre uma proteína presente na superfície da bactéria, a internalina e um receptor localizado na superfície das células, a E-caderina. Sabe-se que a internalina é um dos primeiros fatores a entrar em ação e que interage com a E-caderina para permitir à bactéria entrar nas células intestinais e atingir a corrente sanguínea. Células que exprimem a E-caderina estão presentes na barreira hemato-encefálica e na placenta, mas o papel da internalina nesses níveis não é conhecido ainda (ESTEVES,

2002).

No trabalho de prevenção da ocorrência de *Listeria monocytogenes* de STAHL et al. (1996) foi discutida a dificuldade de se prevenir a presença desta bactéria patogênica em produtos alimentícios. Uma completa organização da produção pelos fazendeiros seria necessária para controlar o problema. A *Listeria* pode ser um contaminante do leite cru e a silagem tem sido a maior fonte de contaminação de *Listeria* no leite.

Segundo SCHELCHER et al. (1992) nos ruminantes as perturbações nervosas (encefalites) se transformam na forma mais freqüente de listeriose, sobretudo nos adultos e nos jovens com menos de dois meses de idade. Alguns dos principais sinais clínicos são: depressão, inaptidão à mastigação e preensão, paralisia muscular facial, andar em círculo e estrabismo. Também pode ocorrer septicemia, sobretudo nos recém-nascidos com menos de oito dias; abortos, raramente associados a problemas nervosos e infecção peritoneal.

Os animais podem infectar-se pela ingestão de alimentos contaminados como silagem, pasto, palha e outros tipos de alimentos. Também a utilização de estrumes contaminados contribui para a disseminação da bactéria. A utilização destes fertilizantes naturais nos terrenos de cultivo provoca a subsequente contaminação do solo, água e vegetação (SCHELECH et al., 1983).

SANAA et al. (1993) avaliando 128 fazendas, num estudo controle para verificar a associação de vários fatores de risco suspeitos para a contaminação do leite cru por *Listeria monocytogenes*, encontraram que a baixa qualidade da silagem (pH > 4.0), inadequada higiene da área e das vacas, incorreta desinfecção da ordenhadeira, insuficiente limpeza dos estábulos estão significativamente associadas com a contaminação do leite por *Listeria*. Maior atenção no preparo da silagem e melhor higiene na ordenha são importantes fatores para se diminuir o risco de contaminação do leite por este agente. PONTEL, citado por JAY (1992) descreveu em 1954, o primeiro caso de listeriose humana que foi relacionado com o consumo de leite cru proveniente de uma vaca mastítica. Foi isolada a mesma serovariedade em dois

gêmeos natimortos de uma mulher e no leite que ela ingeriu.

Num estudo realizado por FENSTERBANK et al. (1984) foram encontrados 48 tipos de *Listeria* isolada de animais doentes (27 cabras, 19 ovelhas, 2 vacas) de 33 fazendas e 40 tipos foram isolados da silagem ingerida por esses animais que foram estudados. A *Listeria* foi isolada mais freqüentemente de silagens de baixa qualidade do que aquelas de excelente qualidade, embora a *Listeria* tenha sido encontrada em 11 das 31 silagens de excelente qualidade com valor de pH entre 3,6 e 4,0. Concordaram com estes resultados RYSER et al. (1997) que verificaram o efeito do pH na distribuição da *Listeria* em silagens de milho, feno e na forragem verde. Os autores observaram que 83% das amostras de silagem de milho de alta qualidade (pH 3,8-4,2) continham *Listeria*. A silagem de baixa qualidade é prontamente discernida pela aparência; contudo este experimento demonstrou que uma silagem de milho de alta qualidade (pH 3,8-4,2) pode conter *Listeria* spp, incluindo tipos de *Listeria monocytogenes* de grande importância nos casos de listeriose originada por alimentos.

DONALD et al. (1995) verificaram os efeitos combinados de parâmetros físicos e químicos (tensão de oxigênio, pH e matéria seca) influenciando o crescimento de *Listeria monocytogenes* e sua sobrevivência em silagem. Estes parâmetros foram estudados simultaneamente em um sistema "in vitro". A forragem ensilada foi exposta à baixa concentração de oxigênio e seu efeito foi mostrado pela acidificação e pela população microbiana dinâmica, como por exemplo: Bactérias produtoras de ácido lático, enterobactérias, leveduras, mofos e *Listeria monocytogenes* em gramíneas. A *Listeria monocytogenes* sobrevive dependendo de um fino ajuste entre características físico-químicas e microbiológicas, exemplo: tensão de oxigênio, matéria seca, pH, tipo de gramínea, qualidade microbiológica. De maneira geral, em todas as gramíneas ensiladas, com concentração de oxigênio de 1,0% ou mais, sustentam o crescimento da *Listeria monocytogenes*, este nível de crescimento foi dependente principalmente da taxa e qualidade de fermentação. Em silagens de gramínea de muito pobre qualidade, com fermentação láctica restrita, a sobrevivência da listeria foi prolongada em condições anaeróbias.

OSTLING e LINDGREN (1993) trabalharam com a concentração inibitória mínima de ácido láctico não dissociado, ácido acético e fórmico, avaliando 23 tipos de enterobactéria e 2 tipos de *Listeria monocytogenes*. O valor da concentração inibitória mínima foi levemente menor em condições anaeróbias quando comparados com condições aeróbias. A influência dos prótons na inibição foi observada para ácido acético com baixos valores de pH. O ácido acético não dissociado foi mais eficiente na inibição da *Listeria monocytogenes* comparando com as enterobactérias. O ácido inorgânico (HCl) inibiu a maioria das enterobactérias com pH 4,0; alguns tipos contudo foram capazes de iniciar o crescimento com pH 3,8. Os resultados indicam que os valores de ácido não-dissociados que ocorrem na silagem de pH 4,1-4,5 são suficientes para proteger a forragem do crescimento de enterobactérias e *Listeria monocytogenes*.

WALKER et al. (1994) estudaram um caso de ocorrência natural de meningoencefalite com *Listeria* inócua numa ovelha da raça Polled-dorset. A ovelha era de um grupo de 25, que comeram à vontade, silagem compactada e coberta. A *Listeria innocua* foi isolada depois de uma semana em meio de cultura enriquecido de tecido cerebral e pituitária. Exames histológicos demonstraram lesões de vascularização e perivasculares no centro do cérebro, o que é consistente com a listeriose, embora com distribuição e severidade limitada.

1.8 Presença de fungos em silagens

O processo de deterioração das forragens causado por fungos inicia-se no campo durante a maturação e continua nos processos de secagem, transporte e de armazenamento. Esses fungos podem ser classificados em três grupos: fungos de campo, fungos intermediários e fungos de armazenamento (LAZZARI, 1993).

Segundo LAZZARI (1993) existe pouco ou nenhum controle sobre as condições que favorecem o desenvolvimento de fungos de campo, pois eles invadem as culturas. Os fungos de campo mais comuns são: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* e

Helminthosporium .

Os fungos intermediários invadem a cultura e continuam a crescer e a causar danos durante o armazenamento. Nessa categoria enquadram-se algumas espécies de *Penicillium* e de *Fusarium* e certos levedos (LAZZARI, 1993). Segundo BELÉM (1994) no armazenamento, o crescimento fúngico pode ser influenciado por muitos fatores, principalmente nível de umidade, temperatura, aeração, danos provocados por insetos e tempo de armazenamento.

A ocorrência de fungos, nos fenos de grama paulista (*Cynodon dactylon* (L.) Pers) enfardados com diferentes conteúdos de água, foi avaliada por REIS et al. (1997), que observaram os gêneros *Cladosporium*, *Curvularia*, *Aspergillus* e *Penicillium* com maior incidência. Todavia, segundo os autores, com o armazenamento durante 30 dias, observou-se diminuição na incidência de *Curvularia* (fungo de campo) e aumento de *Aspergillus* e *Penicillium*, fungos típicos de armazenamento.

Os fungos mais comuns encontrados em silagens são os do gênero *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Estes fungos necessitam de temperatura acima de zero, umidade acima de 20% e de oxigênio para se desenvolverem (MUCK e SHINNES, 2001).

A deterioração aeróbia da silagem está associada, principalmente, com o desenvolvimento de fungos e leveduras. Estes microrganismos apresentam alta resistência as variações do pH e sobrevivem em meio anaeróbio.

O oferecimento de material com alta concentração de fungos e a exposição a esporos fúngicos pode ser prejudicial à saúde dos animais, especialmente ruminantes jovens (MUCK et al.,1984; WITTENBERG et al, 1996) e eqüinos (CUNHA, 1991) bem como as pessoas que manuseiam a forragem, devido à presença de toxinas, especialmente aquelas relacionadas com fungos patogênicos, como o *Aspergillus Glaucus* e *Aspergillus fumigatus* (MOSER, 1980 e REIS & RODRIGUES, 1992).

Segundo PENZ JUNIOR (1992) as toxinas podem causar perdas irreversíveis aos animais. Perdas estas que incluem a redução no desempenho, hemorragia, comprometimento do sistema imunológico, danos no fígado e aborto.

Os fungos, principalmente as espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, crescem nos fenos e silagens, com formação de toxinas as quais podem acarretar prejuízos aos animais quando ingeridas (MAHANNA,1994). As micotoxinas de *Fusarium* geralmente são formadas no campo, embora algumas sínteses possam ocorrer durante o armazenamento, a temperatura, condições de umidade e infestação por insetos são fatores críticos que afetam a síntese de toxina. Essas toxinas aparentemente não são transmitidas ao leite, carne e ovos. (FOOD RESEARCH INSTITUTE, 2002).

Segundo BELÉM (1994) o principal grupo de fungos, de conhecida capacidade de produzir micotoxinas, inclui espécies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Pithomyces* e *Stachybotrys*, contudo os gêneros dominantes são: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

Algumas espécies de fungos do gênero *Fusarium* produzem potentes micotoxinas, como: fumosina, conhecida por causar leucoencefalomacia e transtornos neurológicos em cavalos e edema pulmonar em suínos, possui efeitos hepatotóxico e nefrotóxico em outros animais domésticos; vomitoxina, produzida por várias espécies de *Fusarium* rosa, causadora de vômitos, diarreia, perda de peso, redução da produção de leite; zearalenona, é uma micotoxina rotineira podendo afetar a eficácia reprodutiva dos animais. (OFFICE OF INDIANA STATE CHEMIST, 2002). Algumas espécies do gênero *Penicillium* também são produtoras de micotoxinas, como: esterigmacistina, patulina, ácido penicílico .

O gênero *Pithomyces* é conhecido por produzir a micotoxina esporidesmina, que é produzida pelo *Pithomyces chartarum* e é responsável pela pitomicotoxicose mais conhecida por eczema facial e que se caracteriza por uma hepatite e fotossensibilização em ovelhas, mas que também pode ocorrer em outras espécies como bovinos, animais de zoológico e cães. Este fungo exige alta temperatura e elevada umidade para crescer. O quadro clínico inclui: letargia, apatia, anorexia, icterícia e dermatite fotossensível (HOLLINGER, 1999).

Para HLODVERSSON e KASPERSSON (1986) ocorre uma acentuada alteração

na população de fungos com o processo de fenação, havendo diminuição daqueles gêneros típicos de campo como *Fusarium* e *Cladosporium* e aumento de *Aspergillus* e *Penicillium* de maior ocorrência durante o armazenamento. Os fungos de armazenamento, como o *Aspergillus*, podem se desenvolver em fenos com diferentes conteúdos de umidade podendo servir como indicador biológico das condições de armazenamento (KASPERSSON et al. 1984).

Também NASCIMENTO et al. (1998) avaliando a qualidade do feno de alfafa, quanto à presença de fungos constataram que a ocorrência de fungos foi maior nos tratamentos em que a forragem não sofreu emurchecimento e permaneceu amontoada no galpão, os gêneros de fungos mais comuns foram: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizoctonia* e *Trichoderma*, sendo o gênero *Aspergillus* um potente produtor de micotoxinas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, R.N.S. et al. Efeito do tamanho de partícula na composição da fração nitrogenada de silagem de capim Tanzânia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p.314-315.
- ANDRADE, J.B. et al. Dry matter yield and nutritive value of coast-cross n. 1 preserved as hay, silage and haylage. In: INTERNACIONAL GRASSLAND CONGRESS, 18., 1997, Winnipeg. **Proceedings...** Winnipeg: Saskatoon; Saskatchewan, 1997. p.14.3-14.4
- BALSALOBRE, M.A.A. et al. Controle de perdas de silagem de gramíneas tropicais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba, **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p.890-911.
- BELÉM, P.A.D. **Introdução ao estudo das micotoxinas de interesse em medicina veterinária.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1994. 18p.
- CHAMBERLAIN, A.T.; WILKINSON, J.M. **Feeding the dairy cow.** Lincoln: Chalcomb, 2000. 241p.
- CONNER, D.E. et al. Effect of temperature, sodium chloride and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cobbage juice. **Applied Environment Microbiology** , v.52, n.1, p. 59-63, 1986.
- CORROT, G. **Qualité bacteriologique de l'enrubannage: spores butyriques et Listeria. Recolter & Conserver L'herbe aujourd'hui.** Paris: Association Française, 1998. 197p.

CORSI, M.; MARTA JÚNIOR, G.B. Manejo de pastagens para produção de carne e leite. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 15., 1998, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1998., p.55-84.

CUNHA, T.J. **Horse: feeding and nutrition**. 2ed. Califórnia: Academic Press, 1991. 445p.

DAVIES, D.R. et al. The effect of timing of slurry application on the microflora of grass, and changes occurring during silage fermentation. **Grass Forage Science**, v.51, n. 23, p.42-51, 1996.

DONALD, A.S. et al. The relationship between ecophysiology, indigenous microflora and growth of *Listeria monocytogenes* in grass silage. **Journal of applied Bacteriology**, v. 79, n.2, p. 141-148, 1995.

DOYLE, M.P. Effects of environmental and processing condition on *Listeria monocytogenes* . **Food Technology** , v. 42, n.4, p. 169-71, 1988.

DULPHY, J.P.; DEMARQUILLY, C. Influence de la machine de recolte et de la finesse de hachage sur le valeur alimentare des ensilages. **Annual Zootechnie**, v.12,n.12, p. 199-217, 1973.

EIROA, M.N. *Listeria monocytogenes* – características, ocorrência e desenvolvimento em alimentos. **Colet ITAL**, v.20, n.1, p. 13-22, 1990.

ESTEVES, B. **Identificado o mecanismo de infecção da *Listeria monocytogenes* que permite atravessar a barreira intestinal e atingir a corrente sanguínea**, jul 2001. Disponível em: <<http://www.uol.com.br/cienciahoje/chdia/n366.html>>. Acesso em: 28 ago. 2002.

- FARIA, V.P. de, CORSI, M. Técnicas de Produção de silagem. In: PEIXOTO, A.M.; MOURA, J.C.; FARIA, V.P. de **Curso de Alimentação de Bovinos**. Piracicaba: FEALQ. 1992, p.165-192.
- FENLON, D.R. Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. **Journal of applied Microbiology**, v.59, n.6, p. 537-43, 1985.
- FENSTERBANK, R. et al. *Listeria* strains isolated from sick animals and consumed silage. **Annual Research Veterinary**, v. 15, n.1, p.113-118, 1984
- FROST, J.P. et al. Effect of forage matting on rate of grass drying. Rate of silage fermentation, silage intake and digestibility of silage by sheep. **Grass Forage Science.**, v. 50, p.21-30, 1995.
- INGARASI, M. S. **Controle de perdas na ensilagem de capim Tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia) sob os efeitos do teor de matéria seca, do tamanho de partícula, da estação do ano e da presença do inoculante bacteriano**. 2002. 132p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2002.
- FOOD RESEARCH INSTITUTE - University of Wisconsin – Madison. **“Fusarium Mycotoxins”** Disponível em:<<http://www.micotoxinas.com.br/boletim16.htm>>. Acesso em 27 ago. 2002.
- JAY, J.M. Listeriosis transmitida por alimentos In:----- **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3 ed. Espanha: Press, 1992, p. 210-240.

HLODVERSSON, R. e KASPERSSON, A. Nutrient losses during deterioration of hay in relation to changes in biochemical composition and microbial growth. **Animal Feed Science**, v.15,n.12, p.149-165, 1986.

HOLLINGER, D.V.M. Mycotoxicosis in food producing animals: Veterinary Clinics of North America: **Food Animal Practice**; v.15, n.1, p. 133-163, 1999.

KASPERSSON, A. et al. Microbial and biochemical changes occurring during deterioration of hay and preservative effect of urea. **Swed Journal Agricultural Research**, v.14, n.1, p.127-133, 1984.

LAVEZZO, W. Silagem de capim elefante. **Informe Agropecuário**, v.11, n.132, p.50-57, 1985.

LAZZARI, F.A. Contaminação fúngica de sementes, grãos e rações. In: SIMPÓSIO DE PROTEÇÃO DE GRÃOS ARMAZENADOS, 1993, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1993. p.59-69.

MAHANNA, B. Proper management assures high-quality feeds. **Feedstuffs**, Minneapolis, v.10, p 12-56, 1994.

MARTINS, L.C.T. **Bovinos-Volumosos Suplementares**. São Paulo: Nobel, 1997. 143p.

McDONALD, P. et al. **The Biochemistry of Silage**. 2.ed. Marlow: Chalcombe, 1991. 340p.

MORAIS, J.P.G. Silagem de gramíneas tropicais. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 7., 1999, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1999. p.89-95.

MOSER, L.C. Quality of forage as affected by post-harvest storage and processing. In: ----
Crop quality storage and utilization. Madison: ASA/CSSA, 1980.p. 227-260.

MUCK, A.P. et al. Physiological functions of glicocorticoides in stress and their relation to pharmacological actions . **Endocrinological Review**, v.5, n.1, p.25, 1984.

MUCK, R.E.; SHINNES, K.J. Conserved forages (silage and hay): Progress and priorities. In: INTERNACIONAL GRSSLAND CONGRESS. XIX. 2001. São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba: Brazilian Society of Animal Husbandry. 2001.p. 753-762.

NASCIMENTO, J.M. et al. Método de fenação e tempo de armazenamento na composição bromatológica e ocorrência de fungos no feno de alfafa. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998. p.224-226.

NUSSIO, G.N. et al. Valor alimentício em plantas do gênero *Cynodon* In: SIMPOSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 15., Piracicaba, 1998. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 203-242.

OFFICE OF INDIANA STATE CHEMIST (OISC) “**Mycotoxins in Feed grains**” **Current Guidelines for mycotoxins**. 2001. Disponível em:<<http://www.micotoxinas.com.br>>. Acesso em 28 ago. 2002.

OSTLING, C.E. e LINDGREN, S.E. Inhibition of enterobacteria and listeria growth by lactic, acetic and formic acids, **Journal of applied Bacteriology** v75, n.1, p.18-24, 1993.

PAPAGEORGIU, D.K. & MARTH , E.H. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture ripening and storage of feta cheese. **Journal Food Protection**, v.52, n.2, p. 82-7, 1989.

PEDREIRA, C.G.S. Avaliação de novas gramíneas do gênero *Cynodon* para a pecuária dos Estados Unidos. In: WORKSHOP SOBRE O POTENCIAL FORRAGEIRO DO GÊNERO *CYNODON*. 1996, Juiz de Fora. **Anais...** EMBRAPA-CNPGL, 1996. p.111-126.

PEDREIRA, M.S. et al. Características químicas e fermentativas do Tifton 85 (*Cynodon* spp.) ensilado com diferentes conteúdo de matéria seca e níveis de polpa cítrica. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. 38., Piracicaba, 2001. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 100-102.

PENZ JUNIOR, A.M.P. o Milho e o sorgo na alimentação animal In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 19., 1992, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, 1992. p.264-273.

POST, D. E. **Food-borne phatogens-monograph number 2 : *Listeria*** Techinal Suport Manager. New York: Oxoid Laboratories Co., 1994. 25p.

RANJIT, N.K.; KUNG JÚNIOR, L. The effects of lactobacillus buchneri, lactobacillus plantarum, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science** n.3, v.83 p.526-535, 2000.

REIS, R.A.; RODRIGUES, L.R. de A. Uso de conservantes em fenos com alto teor de umidade. In: SEMANA DE ZOOTECNIA, 14., 1992, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: Fundação Cargill, 1992. p.77-89.

- REIS, R.A. et al. Efeitos da amonização na ocorrência de fungos, composição química e digestibilidade in vitro de fenos de grama seda (*Cynodon dactylon* (L.) Pers). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.26, n.3, p.454-460. 1997.
- REIS, R.A.; RODRIGUES, L.R.A. Aditivos para a produção de fenos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., Botucatu, 1998. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998. p. 109-152.
- REIS, R.A.; PEREIRA, J.R.A. Produção de silagem pré-secada com forrageiras temperadas e tropicais. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, Maringá, 2001. **Anais...** Maringá: UEM, 2001. p.64-86.
- RIBEIRO, K.G. et al. Consumo e digestibilidade aparente total e parcial de nutrientes, em bovinos recebendo ração contendo feno de capim-Tifton 85 de diferentes idades de rebrota. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30. n.2, p. 573-580, 2001.
- RODRIGUES, L.R.A; REIS, R.A ; FILHO, C.V.S. Estabelecimento de pastagens de *Cynodon*. In: SIMPOSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 15., Piracicaba, 1998. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1998. p.115-128.
- ROSENOW, E. M.; MARTH, E.H. Growth of *Listeria monocytogenes* in skimmed whole and chocolate milk and whipping cream during incubation at 4,8,13,21, and 35⁰ C. **Journal Food Protection**, v.50, n.23, p. 452-459, 1987.
- RYSER, E.T., ARIMI,S.M., DONNELLY, C.W. Effects of pH on distribution of listeria ribotypes in corn, hay, and grass silage. **Applied Environment Microbiology**, v.63, n.9, p.3695-3697, 1997 .

- SANAA, M., POUTREL, B., MENARD, J.L. Risk factors associated with contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in dairy farms, **Journal of Dairy Science** v.76, n.10, p.2891-2898, 1993.
- SCHELCHER, F.; VALARCHER, J. F.; MAENNLEIN, E. Listeriose des ruminants et santé humaine. **Le Point Veterinary**, v.24, n. 2, p.27-39, 1992.
- SCHELECH, W.F. et al. Epidemic Listeriosis – Evidence for transmission by food. **New England Journal Medical**, v.308, n. 34, p.203-206, 1983.
- SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela, 2001, 295p.
- STHAL , V. , GARCIA, E., HEZARD, B. Prevention of *Listeria monocytogenes* contamination on dairy farms and in the cheese industry. **Pathology Biology**, v. 44, n.9, p.816-24, 1996.
- TRIOPLAST AB. **The bale wrapping handbbok**. Smalandsstenar: TRIOPLAST AB, 1995. 52P.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2.ed. New York: Cornell University Press, 1994. 476p.
- VILELA, D. **Aditivos na ensilagem** Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1984. 32p. (Circular Técnica 21)
- VILELA, D. Utilização do capim-elefante na forma de forragem conservada. In:----. **Capim-Elefante: Produção e utilização**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1994, p. 117-164.

- VILELA, D. Aditivos para silagem de plantas de clima tropical. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998. p.73-108.
- WALKER, J. K. , MORGAN, J.H., MC LAUCHLIN, J. *Listeria innocua* isolated from a case of ovine meningoencephalitis , **Veterinary Microbiology** , v. 42, n.2-3, p.245-53, 1994.
- WELBOURN, J.L.; WILLIAMS JÚNIOR, J. New *Listeria* Control measures under consideration. **Scope Technic Bull Siliker Lab**, v.14, n.1, p. 1-7, 1999.
- WILKINSON, J.M. **Beef production from silage**. New York: Longman, 1985, 137 p.
- WILKINSON, J.M. Additives for ensiled temperate crops. In: REUNIÃO ANNUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., Botucatu, 1998. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998. p. 53-72.
- WITTENBERG, K.M., UNDI, M., BOSSUYT, C. Establishing a feed value for moulded hay. **Animal Feed Science and technology.**, v.60, n.3-4, p.301-310. 1996.

CAPÍTULO 2 - Desenvolvimento de microrganismos no capim-Tifton 85 ensilado com diferentes conteúdos de umidade

RESUMO - O experimento foi conduzido na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-UNESP, Campus de Jaboticabal para avaliação da ocorrência de *Listeria* spp., de *Listeria monocytogenes* e de fungos nas silagens de capim-Tifton 85 sem emurchecimento (umidade 60-70%) e com emurchecimento (umidade 40-50%) e com adição (5% na matéria natural) ou não de polpa cítrica. As amostragens foram efetuadas no momento na abertura do silo (depois de 80 dias fechado) e aos 15 e 30 dias após a abertura para avaliar a ocorrência de *Listeria* spp e de fungos, o padrão de fermentação (pH, N amoniacal, ácidos orgânicos) e os teores de matéria seca. Os dados foram analisados segundo o delineamento em blocos completos casualizados, em esquema de parcela subdividida, sendo que nas parcelas foram avaliadas as silagens submetidas ao emurchecimento e uso ou não de polpa cítrica e nas subparcelas os períodos de exposição ao ar. A presença de *Listeria spp* foi observada em 65,6% das amostras, sendo que destas 10% foram positivas para *Listeria monocytogenes*. As silagens apresentaram pouca estabilidade aeróbia, tendo sido registrado aumento na ocorrência dos fungos *Penicillium*, *Fusarium* e *Pithomyces* com o prolongamento do período de exposição ao ar. Esses resultados evidenciaram o risco potencial que silagens de gramíneas com alto conteúdo de matéria seca pode representar para a saúde dos animais. Em termos de padrão de fermentação observou-se baixos teores de ácidos orgânicos e N amoniacal devido aos altos valores de matéria seca causados pelo emurchecimento e adição de polpa cítrica, o que acarretou baixa formação de produtos fermentados e elevou o pH.

Palavras-chave: estabilidade aeróbia, bactéria, silagem de capim, Tifton 85.

Introdução

A alimentação de ruminantes e de eqüinos depende, em sua quase totalidade, da biomassa oriunda das pastagens, cuja disponibilidade durante o ano é condicionada pela estacionalidade da produção forrageira, que afeta diretamente a produção animal devido às modificações quantitativas e qualitativas das forrageiras.

Contudo, a eficiência de utilização das plantas forrageiras pode ser aumentada quando se adota técnicas de conservação de forragem, como a fenação e a ensilagem que permitem a produção de volumosos de alta qualidade para o uso na época de escassez de alimentos.

De maneira geral, tem-se durante a ensilagem profunda modificação na população de microrganismos devido às condições anaeróbias e de baixo pH que ocorrem dentro do silo, e mesmo condições inadequadas de armazenamento resultam em aumento da população de microrganismos indesejáveis.

Dentre as bactérias indesejáveis de importância que ocorrem na silagem tem-se a *Listeria monocytogenes*, que é uma bactéria que pode causar abortos, meningoencefalites, ela contamina o leite cru e excreta de animais contaminados.

A bactéria conhecida hoje como *Listeria monocytogenes* foi descrita no ano de 1929 por Murray e colaboradores como a causa de doença de cobaias de laboratório e coelhos, do departamento de Patologia da Universidade de Cambridge. Esses autores propuseram o nome de *Bacterium monocytogenes* para o organismo devido à elevação característica nos valores sanguíneos de leucócitos mononucleares (SCHELECH et al., 1983). Em 1925, Pirie isolou um organismo muito similar e o chamou de *Listerella hepatolytica* pelo comprometimento hepático durante a infecção. A similaridade dos organismos descritos pelos diferentes pesquisadores levou, em consenso, ao nome de *Listerella monocytogenes*, posteriormente modificado para *Listeria*. É interessante ressaltar, que ambos pesquisadores atribuíram as infecções dos animais ao consumo de alimentos contaminados (POST, 1994).

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva, psicrotolerante, que se apresenta na forma de bastonetes curtos e regulares. É desprovida de cápsula, não formadora de esporos, anaeróbio facultativo e que está associada a infecções veiculadas por alimentos. Sua temperatura ótima de crescimento está entre 30^o e 37^o C (DOYLE, 1988), embora seja capaz de multiplicar-se entre 0^o e 45^o C (WELBOURN & WILLIAMS JÚNIOR, 1999) sendo capaz, portanto, de se multiplicar mesmo que lentamente, sob condições de refrigeração.

Apesar de ser reconhecida como um patógeno de importância veterinária desde 1925 e como agente de listeriose humana desde 1929, somente na década de 80 foi considerada passível de ser veiculada por alimentos (EIROA, 1990).

O desenvolvimento de fungos ocorre em silagens, principalmente nas regiões periféricas do silo, as quais devem ser eliminadas, mas também pode ocorrer no interior deste, dependendo de condições de pH, matéria seca, compactação, tipo de forragem, etc. Em virtude do desenvolvimento de fungos que produzem micotoxinas, o oferecimento de silagem contaminada aos animais pode acarretar sérios danos à saúde. O oferecimento de material com alta concentração de fungos e a exposição a esporos fúngicos pode ser prejudicial à saúde dos animais, especialmente ruminantes jovens (MUCK et al., 1984, WITTENBERG et al., 1996).

Os fungos, principalmente as espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, crescem nos fenos e silagens, com formação de toxinas as quais podem acarretar prejuízos aos animais quando ingeridas (MAHANNA, 1994). Algumas espécies de fungos do gênero *Fusarium* produzem potentes micotoxinas, como: fumosina, conhecida por causar leucoencefalomacia e transtornos neurológicos em cavalos e edema pulmonar em suínos, possui efeitos hepatotóxico e nefrotóxico em outros animais domésticos; vomitoxina, produzida por várias espécies de *Fusarium* rosa causadora de vômitos, diarreia, perda de peso, redução da produção de leite; zearalenona, é uma micotoxina rotineira, podendo afetar a eficácia reprodutiva dos animais; toxina T2, ainda não é muito conhecida. (OFFICE OF INDIANA STATE CHEMIST, 2002) micotoxinas de *Fusarium* geralmente são formadas no campo,

embora algumas toxinas possam ser sintetizadas durante o armazenamento. Essas toxinas aparentemente não são transmitidas ao leite, carne e ovos. (FOOD RESEARCH INSTITUTE, 2002).

Algumas espécies do gênero *Penicillium* também são produtoras de micotoxinas, como: esterigmacistina, patulina, ácido penicílico.

O gênero *Pithomyces* é conhecido por produzir a micotoxina esporidesmina, que é produzida pelo *Pithomyces chartarum*.

Desta forma este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos dos sistemas de conservação do capim-Tifton 85 ensilado com diferentes conteúdos de umidade: sem emurhecimento e com emurhecimento ambos sem e com a adição de polpa cítrica, e dos períodos de exposição ao ar, verificando a população de *Listeria* e de fungos da matéria orgânica.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido na FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, para estudar a presença de *Listeria* e de fungos patogênicos na forragem armazenada na forma de silagem e silagem emurhecida sem e com a adição de 5% de polpa cítrica peletizada.

A forrageira utilizada foi o capim-Tifton 85 (híbrido de *Cynodon*, PI 290884 originário da África do Sul com o Tifton 68 (*Cynodon nlemfuensis*) sendo o corte realizado no dia 16 de Abril de 2001, quando a forrageira estava com aproximadamente 40 dias de crescimento vegetativo e apresentava 10 a 20% de florescimento.

O capim sofreu um emurhecimento que constitui-se na ceifa da forragem e exposição ao ambiente para desidratação no campo. Considerando os objetivos do estudo de se avaliar a ocorrência de microrganismos nas silagens de Tifton 85 contendo alto conteúdo de matéria seca e de verificar a possibilidade de recolher e emurhecer a forragem no mesmo dia, evitando maiores perdas de nutrientes e reidratação no período noturno, determinou-se os períodos de zero, 1, 2 e 3 horas de

exposição ao sol para secagem. Com isso o teor de matéria seca observado foi conseqüência desse tempo de exposição imposto à forragem e também pela adição de polpa cítrica peletizada. Os teores de matéria seca do material com zero, 1, 2 e 3 horas de exposição ao sol foi respectivamente 39,08%, 42,52%, 45,24% e 61,25%.

No galpão o capim sofreu picagem para se obter partículas com aproximadamente 3 cm para ser ensilado. Nos tratamentos que receberam a adição de polpa cítrica peletizada, esta foi adicionada na dose de 5% do peso total da forragem, adicionada aos poucos durante o enchimento dos silos. A composição bromatológica da polpa cítrica peletizada foi (% na MS) foi 88,24% de MS, 6,74% de PB, 23,06% de FDN e 14,05% de FDA. A forragem foi compactada com os pés para a acomodação das camadas.

A forragem foi ensilada em tambores com diâmetro de 60 cm e altura de 90 cm. Com a acomodação final da forragem, os silos experimentais foram fechados e vedados com fitas plásticas auto-adesivas, na tentativa de evitar a entrada de ar. A seguir os silos foram armazenados em local protegido e à temperatura ambiente.

Os tratamentos avaliados foram: T1 –Tifton ensilado sem emurchecimento e sem polpa; T2 – Tifton ensilado sem emurchecimento e com 5% de polpa cítrica; T3 – Tifton ensilado com emurchecimento de 1 hora e sem polpa; T4 - Tifton ensilado com emurchecimento de 1 hora e com 5% de polpa; T5 - Tifton ensilado com emurchecimento de 2 horas e sem polpa; T6 - Tifton ensilado com emurchecimento de 2 horas e com 5% de polpa ; T7 - Tifton ensilado com emurchecimento de 3 horas e sem polpa; T8 - Tifton ensilado com emurchecimento de 3 horas e com 5% de polpa. Havia duas repetições de campo para cada tratamento.

No dia 03 de Julho de 2001 ocorreu a abertura dos silos, decorridos aproximadamente 80 dias do fechamento destes, e em seguida realizou-se a amostragem, sendo as amostras encaminhadas para os laboratórios. No Laboratório de Nutrição Animal foram efetuadas as análises de composição bromatológica, no Laboratório de Microbiologia foram feitas as análises de *Listeria* e no Laboratório de Defesa Fitossanitária as análises dos fungos.

As amostragens foram efetuadas no momento da abertura dos silos (80 dias após a ensilagem) e aos 15 e 30 dias após a abertura, foi retirada uma camada de 5 cm da parte superior do silo antes de cada amostragem para evitar que esta parte mais deteriorada influenciasse nas análises, à seguir camadas de 30 cm de silagem eram retiradas simulando a utilização de um silo do tipo poço em condições práticas. Após as amostragens nos dias especificados, o silo era fechado com lona plástica, vedado com tampa metálica a fim de proteger a silagem.

A seguir as amostras foram encaminhadas para laboratórios para a avaliação da ocorrência de *Listeria* spp, de fungos e do padrão de fermentação (pH, N amoniacal, ácidos orgânicos) e teores de matéria seca.

As amostras foram levadas a estufas para a determinação da matéria seca a 55°C por 48 horas e em seguida a secagem foram moídas. Os teores de matéria seca a 105 ° C (MS) e pH foram avaliados segundo os métodos descritos por SILVA (1990), o teor de N amoniacal foi determinado segundo a AOAC (1975) e a concentração de ácidos orgânicos (acético, propionico, butírico, láctico) foi obtida em cromatógrafo da marca VARIAN modelo PRO STAR 410.

Para o levantamento dos fungos associados ao material ensilado, foi utilizado o método do papel de filtro usado em testes de sanidade de sementes, o qual foi adaptado ao material ensilado. Este método consistiu em se colocar três folhas de papel de filtro por placa de Petri, previamente umedecidos com água destilada e esterelizada. Posteriormente, foram colocadas em cada placa, 10 fragmentos de 0,5 cm do capim- Tifton 85 ensilado (por amostra), de maneira a ficarem equidistantes uns dos outros (LUCCA FILHO, 1987).

Os fragmentos das silagens foram retirados de partes da planta escolhidas ao acaso, foram incubados sob regime de luz alternada (12 horas de luz e 12 horas de escuro) por 7 dias, a uma temperatura de $20^{\circ} + 2^{\circ}$ C.

A luz utilizada foi a fluorescente fria, e após o período de incubação os fragmentos foram examinados, individualmente, através de microscópio estereoscópio. Sempre que necessário, foram feitas lâminas das estruturas dos fungos (micélio e

corpo de frutificação) e examinadas em microscópio ótico comum e comparadas segundo a descrição de BARNETT & HUNTER (1972) e HANLIN (1990) para facilitar a identificação.

Foi detectada apenas a porcentagem de ocorrência de cada gênero de fungo estudado nas amostras. A estimativa dos fungos foi calculada através da fórmula usada por SENTHILKUMAR et al. (1993):

$$\% \text{ de freqüência} = \frac{\text{número de amostras nas quais apareceram fungos}}{\text{número total de amostras examinadas}} \times 100$$

A identificação de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* nas silagens foi determinada no Laboratório de Microbiologia da FCAV/Unesp, Campus de Jaboticabal. Inicialmente todas as amostras foram identificadas e pesadas assepticamente 25 g representativos da amostra e colocadas em copo de homogeneizador. Foram adicionados 225 mL de água peptonada a 0,1% previamente esterilizada e homogeneizados por 2 minutos. Sendo esta diluição de 10^{-1} . Foi pipetado 1 mL para tubo de cultura contendo 9 mL do mesmo diluente (diluição 10^{-2}). Deste tubo de cultura 1 mL foi repassado para um outro tubo de cultura contendo 9 mL de água peptonada (diluição 10^{-3}) (BRASIL, 1993).

- Isolamento de *listeria* spp.

Foram pipetados 0,1 mL das diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e semeados na superfície de placas de Petri contendo "Listeria Selective Agar" (OXOID), previamente esterilizadas sendo este método chamado de semeadura direta. As placas foram incubadas a 35° C por 24 a 48 horas.

Das colônias típicas (pequenas e amarronzadas) foram realizados esfregaços corados pelo método de Gram. As colônias que apresentaram bactérias em forma de bastonetes curtos e regulares, não esporuladas e Gram positivas foram repicadas para

placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura usado anteriormente, para a manutenção até a realização das análises bioquímicas (SILVA et al., 2001).

- Análises bioquímicas para identificação de *Listeria* sp.

Das colônias típicas, já observadas anteriormente na microscopia, procedeu-se a semeadura em tubos de cultura contendo caldo cérebro – coração (BHI – Difco). Foram incubados a 37⁰C, por 24 horas. Após esse tempo foi observado o crescimento da bactéria e foram realizadas as seguintes análises: teste de catalase, teste de motilidade, teste de nitrato, reação em Agar tríplice açúcar ferro (TSI – Difco), teste de produção de hemólise, teste de fermentação da dextrose, ramnose, manitol, maltose e esculina (SILVA et al.,2001).

- **Teste de Catalase:** A partir dos tubos contendo caldo de BHI, foi transferida uma alíquota com alça microbiológica da cultura para uma lâmina de microscopia, misturando-a com uma gota de Peróxido de hidrogênio 3% e logo após foi observada a ocorrência de borbulhamento imediato (teste positivo) ou não-borbulhamento (teste negativo). As cepas de *Listeria* são catalases positivas.

- **Teste de Motilidade:** A partir dos tubos contendo BHI, foi inoculada cada cultura suspeita em um tubo com Agar sulfeto Indol motilidade (SIM), através de picada com agulha no centro do meio de cultura, até uma distância de 1 cm do fundo. Esses foram incubados a 25⁰C/ 7 dias e observados diariamente. As cepas de *Listeria* são móveis e desenvolvem uma zona de migração típica, espalhando-se na parte superior do meio e mantendo-se restrita a inoculação por picada no fundo do tubo. Esse tipo de migração produz uma massa de crescimento característica, lembrando um guarda-chuva.

- **Teste de Nitrato:** A partir dos tubos contendo BHI, foi tranferida uma alíquota com alça microbiológica com inóculo pesado de cada cultura para tubos contendo caldo nitrato e incubados a 35⁰ C / 5 dias. Após a incubação, foi adicionado aos tubos 0,25 mL de cada um dos reagentes para teste de nitrato (A= solução 0,8% de ácido sulfanílico: B = solução 0,5% de alfa-naftol). O desenvolvimento de uma cor rósea avermelhada em no máximo 10 minutos confirma o teste positivo. Em caso de

resultado negativo, adiciono-se uma pitada de zinco em pó, deixa-se em repouso por 10 minutos para observar se o meio permanece com a cor inalterada (teste positivo). Caso adquirir uma coloração rósea avermelhada o teste é negativo. As cepas de *Listeria* não reduzem o nitrato.

- **Reação em Agar tríplice açúcar ferro (TSI):** A partir dos tubos contendo BHI, foi inoculada cada cultura em um tubo contendo TSI, por picada em estrias na rampa do ágar. Os tubos foram incubados a 37⁰C / 24 horas e observado se houve a ocorrência de reação típica de *Listeria*: rampa e fundo ácidos (amarelados), sem produção de H₂S (Não escurecimento do ágar). Os tubos foram incubados com a tampa ligeiramente afrouxada, para manter condições aeróbias. Esse cuidado preveniu reações ácidas errôneas na rampa.

- **Teste de Verificação de Hemólise:** Com uma caneta hidrográfica, foram demarcados 20 a 25 setores no fundo de uma placa de Agar sangue N. 2 suplementado com sangue de cavalo e foram inoculados, a partir dos tubos de BHI, cada uma das culturas suspeitas, por picada, em um dos setores demarcados. As placas foram incubadas a 35⁰C / 48 horas e foi observada a formação de um halo transparente de hemólise em redor das colônias. As cepas de *L.monocytogenes* formam halos discretos, que não se estendem muito para fora da colônia, enquanto *L.ivanovii* forma halos grandes e bem definidos e *L. innocua* não apresenta hemólise.

- **Teste de fermentação da Dextrose, Xilose, Rhamnose, Manitol, Maltose e Esculina:** A partir dos tubos contendo BHI, foi inoculada uma alçada de cada cultura em tubos contendo caldo púrpura base suplementado com 0,5% do carboidrato a ser testado. Incubados à 37⁰C / 7 dias e foram observados diariamente se havia produção de ácido (alteração da cor do meio de púrpura para amarelo) e produção de gás (coletados em tubo de Durham). Nenhuma cepa de *Listeria* produz gás a partir desses compostos de carbono e todas fermentam a dextrose, a maltose e a esculina. A *L.monocytogenes* também fermenta a rhamnose, mas não fermenta a xilose e o manitol.

Após a verificação de todas as análises bioquímicas, estas eram comparadas

com o quadro 1 para a classificação da espécie de *Listeria*.

Tabela 1 – Classificação de algumas espécies de *Listeria* spp. (SILVA, 2001)

L.m. = *Listeria monocytogenes*, L.i. = *Listeria innocua*, L.v. = *Listeria Ivanovii*, L.g. = *Listeria grayi*, Ou = outros contaminantes

TSI	Nitrato	Xilose	Esculina	maltose	dextrose	manitol	ramnose	motilidade	hemólise	catalase	Class.
+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	<i>L.m.</i>
+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	<i>L.i.</i>
+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>L.g.</i>
+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	<i>L.v.</i>
+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	ou

O delineamento utilizado foi em blocos completos casualizados, em esquema de parcelas subdivididas, sendo que nas parcelas foram avaliadas as silagens submetidas ao emurchecimento e uso ou não de polpa cítrica e nas subparcelas os períodos de exposição ao ar com quatro repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

1. Padrão de fermentação

A análise dos dados da Tabela 2 evidencia que ocorreu aumento de matéria seca ($P < 0,05$) nas silagens em função da adição de polpa cítrica e do emurchecimento. Tal fato está relacionado com o alto teor de matéria seca da polpa cítrica (88,24%) e da perda de umidade resultante do processo de emurchecimento de exposição ao sol.

Tabela 2 - Teores de matéria seca (%) e valores de pH das silagens do capim-Tifton 85 submetidas a diferentes tratamentos

Tratamento	MS (%)			pH		
	Período pós abertura (dias)			Período pós abertura (dias)		
	0	15	30	0	15	30
T ₁	39,1 Aa	40,70Aa	54,6Ab	4,68 Aa	4,97Aa	7,21 Ab
T ₂	37,7Aa	40,7Ab	56,5ABc	4,67Aa	4,73 Aa	6,95 Ab
T ₃	42,5Ba	41,1ABa	58,8Bb	4,78 Aa	6,12 ABa	7,85 ABb
T ₄	42,7Ba	45,4BCb	66,1Cc	5,17 Aa	6,28 ABa	7,83 ABb
T ₅	45,2Ca	46,7Ca	67,4Cb	5,41 Aa	6,50 Ba	8,09 ABb
T ₆	45,0Ca	46,5Ca	67,3Cb	5,44 Aa	7,51 BCb	8,29 ABb
T ₇	61,3Da	67,3Db	71,7Dc	5,68 Aa	8,28 Cb	8,59 Bb
T ₈	63,9Ea	67,3Db	74,8Ec	5,42 Aa	8,36 Cb	8,49 ABb

T1- Tifton ensilado sem emurchecimento e sem polpa

T2 - Tifton ensilado sem emurchecimento e com 5% de polpa

T3- Tifton ensilado com emurchecimento de 1 hora e sem polpa

T4--Tifton ensilado com emurchecimento de 1 hora e com 5% de polpa

T5- Tifton ensilado com emurchecimento de 2 horas e sem polpa

T6- Tifton ensilado com emurchecimento de 2 horas e com 5% de polpa

T7- Tifton ensilado com emurchecimento de 3 horas e sem polpa

T8- Tifton ensilado com emurchecimento de 3 horas e com 5% de polpa.

Médias seguidas de letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância

Apesar da adoção da prática de cobrir os silos após a retirada das camadas de 30 cm de silagem (abertura dos silos, 15 e 30 dias de exposição ao ar), simulando a utilização de um silo poço, tal procedimento pode ter influenciado os teores de matéria seca. Deve-se considerar, que a retirada apenas da camada superior para a análise, que era mais seca por estar mais exposta ao ar do que as camadas inferiores, e também devido a lixiviação de líquidos para a porção inferior dos silos, pode ter resultado em silagem com menor conteúdo de umidade. Contudo, deve-se considerar

que este procedimento é o adotado nas condições de fazenda, onde na maioria das vezes o produtor não cobre os silos após a retirada da silagem, aumentando assim a exposição ao ar.

Com relação aos teores de matéria seca, verificou-se diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos devido a esses fatores e também dos períodos de exposição ao ar. As silagens produzidas com forragem que receberam 3 horas de sol atingiram teor de matéria seca de 61,3 e 63,9% na abertura do silo e no período de armazenamento de 15 dias passaram para 67,3% e com 30 dias 71,7 e 74,8%. Cumpre salientar que esses valores comprometeram todo o processo de fermentação característico que ocorre dentro do silo, pela dificuldade de compactação da silagem, causando baixa formação de ácidos orgânicos (Tabela 3).

De acordo com REIS & PEREIRA (2001) o ideal para o processo de ensilagem é que a forragem apresente teores de matéria seca entre 35 e 45%, sendo que para os teores de 40 a 45% é recomendável que a forragem seja picada em partículas menores, a fim de se conseguir uma melhor compactação

A adição de polpa cítrica peletizada poderia ser dispensada neste caso, pois neste estágio de maturidade do capim (40 dias de crescimento vegetativo) o teor de matéria seca apresentado foi 39,08%, pode ser considerado apropriado para a conservação da forragem na forma de silagem (WOOLFORD, 1984, McDONALD et al., 1991).

A partir da análise dos dados referentes aos valores de pH (Tabela 2) se depreende que estes foram elevados, evidenciando padrão de fermentação inadequado, não sendo característico de silagens bem conservadas (McDONALD et al., 1991)

Os elevados valores de pH (Tabela 2) decorrem do alto teor de matéria seca e tamanho de partícula que permitem a entrada de ar no sistema, principalmente no período de exposição ao ar de 15 e 30 dias, após a abertura dos silos.

O manejo dos silos, mesmo com o fechamento após a retirada da silagem, aumentou a instabilidade, sendo tal fato mais evidente aos 30 dias de armazenamento

onde os valores de pH variaram de 6,95 a 8,59, permitindo deterioração aeróbia (Tabela 2).

É importante salientar que é possível a preservação da qualidade de silagens com alto conteúdo de matéria seca com valores de pH de até 5,0 (VAN SOEST, 1994; REIS & PEREIRA 2001), por outro lado os valores elevados de pH indicam processo fermentativos inadequados .

A análise dos teores de ácidos orgânicos (Tabela 3), evidencia baixos valores e observou-se diminuição destes ($P < 0,05$) com o aumento dos conteúdos de matéria seca em decorrência do emurhecimento e adição de polpa cítrica. É importante considerar, que no presente trabalho registrou-se dificuldade de compactação da silagem em função do elevado conteúdo de MS (Tabela 2) o que acarretou baixa formação de produtos fermentados entre eles o ácido láctico (Tabela 3), que em baixas concentrações tendeu a produzir silagens com altos valores de pH (Tabela 2).

PEDREIRA et al. (2001) ensilaram o capim-Tifton 85 e verificaram que o emurhecimento e adição de polpa cítrica peletizada proporcionaram redução na fração nitrogênio amoniacal.

Os valores de N amoniacal/NT (Tabela 3) diminuíram significativamente ($P < 0,05$) com o aumento do conteúdo de matéria seca das silagens emurhecidas e com polpa cítrica.

O teor de nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total é um parâmetro qualitativo da silagem, que caracteriza o perfil fermentativo ocorrido no processo. Menores teores de nitrogênio amoniacal indicam menor intensidade de proteólise ocorrida na ensilagem. McDONALD & HENDERSON (1981) afirmaram que a falta de estabilidade na fermentação da silagem resulta na degradação extensiva de aminoácidos em amônia, CO_2 e aminas.

Segundo BENACCHIO (1965) classificou as silagens quanto ao teor de nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total, considerando a silagem como muito boa, quando os valores são inferiores a 10%, aceitável entre 10 a 15% e insatisfatória quando os valores se situam acima de 20%.

Tabela 3 - Teores de N amoniacal/N total e de ácidos orgânicos das silagens do capim-Tifton 85 submetidas a diferentes tratamentos

Tratamentos	N-NH ₃ /NT	Lático	Ácidos orgânicos (% MS)		
			Acético	Propiônico	Butírico
T ₁	7,6 AB	0,09 A	0,27 A	0,02AC	0,07 AC
T ₂	9,8 A	0,08 A	0,21 B	0,01B	0,05 B
T ₃	8,5 AB	0,27 B	0,28 A	0,01B	0,06 A
T ₄	8,6 B	0,02 C	0,07 C	0,01B	0,07 C
T ₅	4,7 EF	0,02 C	0,03 D	0,01B	0,08 DC
T ₆	5,7 E	0,01 C	0,03 D	0,01B	0,12 E
T ₇	3,1 FG	0,01 C	0,07 C	0,0 D	0,09 FG
T ₈	1,9 G	0,04 D	0,01 E	0,0 D	0,01 G

T1- Tifton ensilado sem emurchecimento e sem polpa

T2 - Tifton ensilado sem emurchecimento e com 5% de polpa

T3- Tifton ensilado com emurchecimento de 1 hora e sem polpa

T4--Tifton ensilado com emurchecimento de 1 hora e com 5% de polpa

T5- Tifton ensilado com emurchecimento de 2 horas e sem polpa

T6- Tifton ensilado com emurchecimento de 2 horas e com 5% de polpa

T7- Tifton ensilado com emurchecimento de 3 horas e sem polpa

T8- Tifton ensilado com emurchecimento de 3 horas e com 5% de polpa.

Médias seguidas de letras distintas maiúsculas nas colunas, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância

A alteração do teor de matéria seca onde a silagem sofreu emurchecimento, apresentaram teores de nitrogênio amoniacal menores, com 3 horas de exposição ao sol, os teores chegaram a 3,1 e 1,9 e o maior valor encontrado foi de 8,5 com 1 hora de exposição ao sol, indicando menor grau de proteólise devido ao emurchecimento e adição de polpa cítrica nos tratamentos.

A análise conjunta dos valores de matéria seca da silagem, pH, N-NH₃ / N total (Tabelas 2, 3) evidenciou que as silagens, apesar dos altos valores de pH, tiveram baixa proteólise, provavelmente em função da redução da atividade clostrídica,

preservando os conteúdos de proteína bruta.

A presença de *Clostridium* sp é indesejável porque atua contra a preservação, através da destruição do ácido láctico, ou seja, a partir de dois moles de ácido láctico produz-se um mol de ácido butírico, que é um ácido mais fraco, levando a aumento no pH. Além disso, a fermentação clostrídrica pode resultar em subprodutos da degradação de proteínas, como as aminas e amônia que podem restringir o consumo das silagens (McDONALD et al., 1991 e STEFANIE et al., 2000).

A redução do teor de nitrogênio amoniacal nas silagens pré-emurchecidos e com polpa cítrica é resultante do efeito benéfico causado pela elevação do teor de matéria seca do material ensilado. Contudo, deve-se ressaltar que durante o emurchecimento de 3 horas no presente experimento, provavelmente não houve proteólise extensa na planta.

Deve-se considerar que a baixa disponibilidade de água livre dificulta a sobrevivência de microrganismos, principalmente os do gênero *Clostridium* que não toleram alto teor de matéria seca e são inibidos, justificando os menores teores de nitrogênio amoniacal e de ácido butírico das silagens com alto conteúdo de MS.

Os principais produtos da hidrólise da proteína durante o emurchecimento são peptídeos, aminoácidos livres e amidas. É importante destacar que se a secagem for rápida o conteúdo de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) não sofreria alteração, mas se o emurchecimento for prolongado, grande proporção de amônia poderia ser formada devido à atividade microbiana (McDONALD et al., 1991).

PEDREIRA et al. (2001) relataram a diminuição do N-NH₃ em relação ao N total com o emurchecimento e adição de polpa cítrica. O mais alto valor de N-NH₃ em relação ao N total foi de 11,8% e foi observado na silagem das plantas não submetidas ao emurchecimento e sem a adição de polpa cítrica, esses fatores diminuem acentuadamente os valores de N-NH₃ em relação ao N total devido à baixa proteólise oriunda da atividade das enzimas da planta ou mesmo proveniente das enzimas produzidas pelos *Clostridium* (WOOLFORD, 1984; McDONALD et al., 1991).

Tem-se que uma silagem é considerada de qualidade satisfatória se apresentar

pH inferior a 4,2, ácido butírico inferior a 0,2%, na MS, e N amoniacal inferior ou igual a 11-12% do N total (SILVEIRA, 1975, VAN SOEST, 1994). Também McDONALD et al. (1991) ressaltam que o pH ideal para a conservação é dependente da umidade do material e também da temperatura, sendo que em silagens com teor de matéria seca superior a 20%, é aceitável um pH equivalente a 4,0 para obter-se conservação satisfatória.

Contudo, apesar de as silagens produzidas apresentarem baixos valores de N amoniacal e de ácido butírico, estas não podem ser consideradas de boa qualidade, principalmente se forem avaliados os valores de pH, de ácido láctico e a ocorrência de microrganismos que caracterizam processos fermentativos.

2. Presença de *Listeria*

Foi encontrada a presença de *Listeria* spp. (*L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivannovii*, *L. innocua*, e *L. welshimeri*) em 65,6% das amostras de silagem de capim-Tifton 85, sendo que destas 10% foram positivas para *Listeria monocytogenes*, que dentre as espécies de *Listeria* é inquestionavelmente patogênica ao homem e aos animais. Ao contrário da maioria dos patógenos de origem alimentar, que geralmente provocam sintomas gastrintestinais, as principais manifestações clínicas da listeriose são inicialmente semelhantes a de um resfriado, com febre baixa e mal estar geral, podendo progredir para meningite, meningoencefalite, septicemia, aborto ou parto prematuro (SILVA et al., 2001). Além disso, essa bactéria pode ser contaminante do leite cru e excretas de animais contaminados. Esses resultados revelam o risco potencial que este tipo de alimento pode representar para a saúde dos animais. Animais infectados pela bactéria, embora assintomáticos, podem veiculá-la pelo leite e a sua presença tem sido constatada em vários países (LOKEN et al., citado por ROSENOW & MARTH, 1987).

Foi detectada a presença de *Listeria* spp e de *Listeria monocytogenes* em todos períodos de exposição da silagem ao ar: na abertura do silo, com 15 e 30 dias de exposição. A *Listeria monocytogenes* não foi detectada no material proveniente do campo, este apresentou apenas *Listeria* spp, conforme Figura 1.

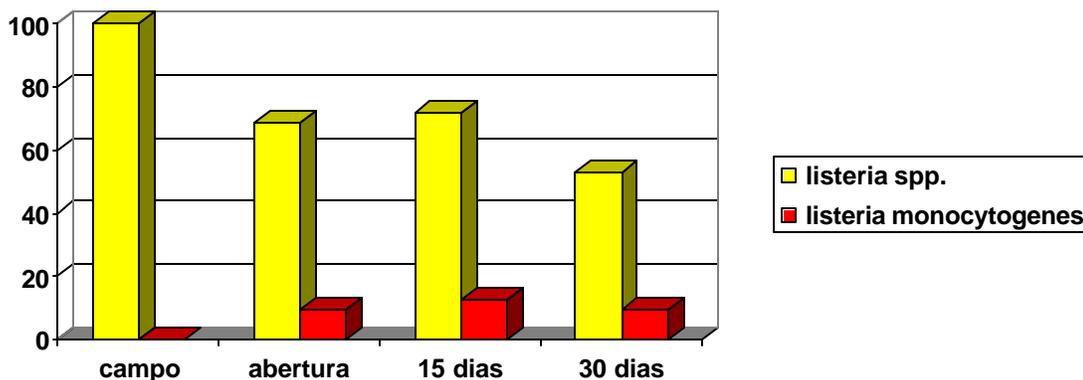


Figura 1 – Identificação de *Listeria* spp e de *Listeria monocytogenes*, a partir de colônias típicas isoladas de silagens de capim-Tifton 85, em porcentagens de ocorrência no campo, na abertura do silo e com 15 e 30 dias de período de pós-abertura.

Na abertura do silo, o teor de matéria seca variou de 39,1 a 63,9% , o pH de 4,68 a 5,68, com baixa concentração de ácidos orgânicos e foi detectado que 68,75% das amostras estavam contaminadas por *Listeria* spp, sendo que 9,38% destas eram *Listeria monocytogenes*, que apareceram nos tratamentos T2 (sem desidratação e 5% de polpa) com 37,7% de matéria seca e pH de 4,67 e o T5 (com desidratação de 2 horas e sem polpa) com 45,2% de matéria seca e pH de 5,41, Figura 2.

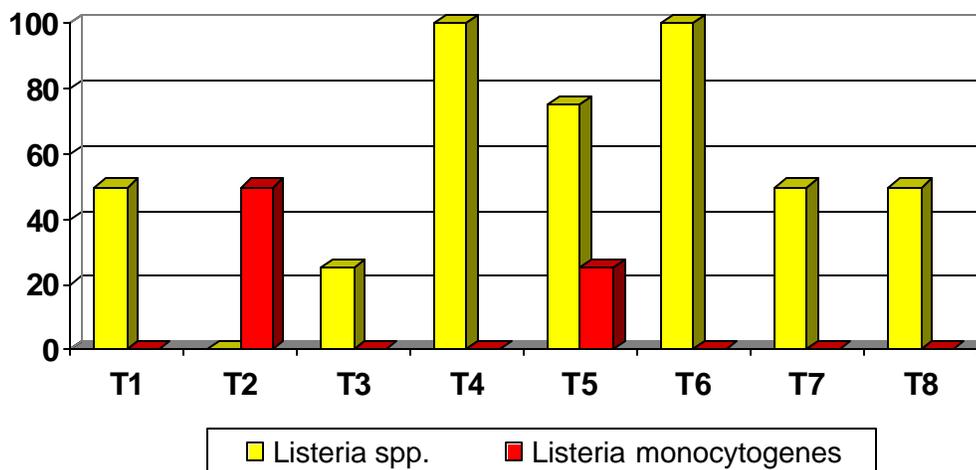


Figura 2 – Identificação de *Listeria* spp e de *Listeria monocytogenes*, a partir de colônias típicas isoladas de silagens de capim-Tifton 85, em porcentagens de ocorrência nos tratamentos, na abertura do silo.

Com 15 dias de período de pós-abertura do silo, os teores de matéria seca variaram de 40,7 a 67,3% e os valores de pH de 4,97 a 8,36, esses valores de pH estão mais elevados que os anteriores devido à exposição ao ar neste período. 71,87% das amostras continham *Listeria* spp, sendo destas 12,5% eram *Listeria monocytogenes*, registradas nos tratamentos T2 (sem desidratação e com 5% de polpa) com 40,7% de matéria seca e pH 4,73 ; T3 (com desidratação de 1 hora e sem polpa) com 41,1% de matéria seca e pH 6,12 ; T4 (com desidratação de 1 hora e com 5% de polpa) com 45,4% de matéria seca e pH 6,28 e oT6 (com desidratação de 2 horas e com 5% de polpa) com 46,5% de matéria seca e pH 7,51, Figura 3.

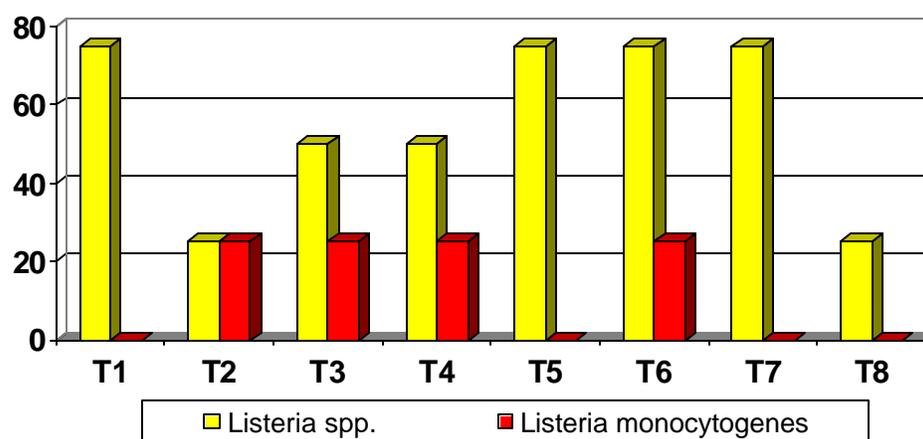


Figura 3 - Identificação de *Listeria* spp e de *Listeria monocytogenes*, a partir de colônias típicas isoladas de silagens de capim-Tifton 85, em porcentagens de ocorrência nos tratamentos, com 15 dias de pós-abertura do silo.

Com 30 dias após a abertura, os teores de matéria seca (54,6 a 74,8%) e pH (7,21 a 8,59) estavam ainda mais elevados, pois o tempo de exposição ao ar foi maior e foi detectado que 53,12% das amostras apresentavam *Listeria* spp., destas 9,37% eram *Listeria monocytogenes*, as quais apareceram nos tratamentos T2 (sem desidratação e com 5% de polpa) com 56,5% de matéria seca e pH 6,95 e T8 (com desidratação de 3 horas e com 5% de polpa) com 74,8% de matéria seca e pH 8,49, Figura 4.

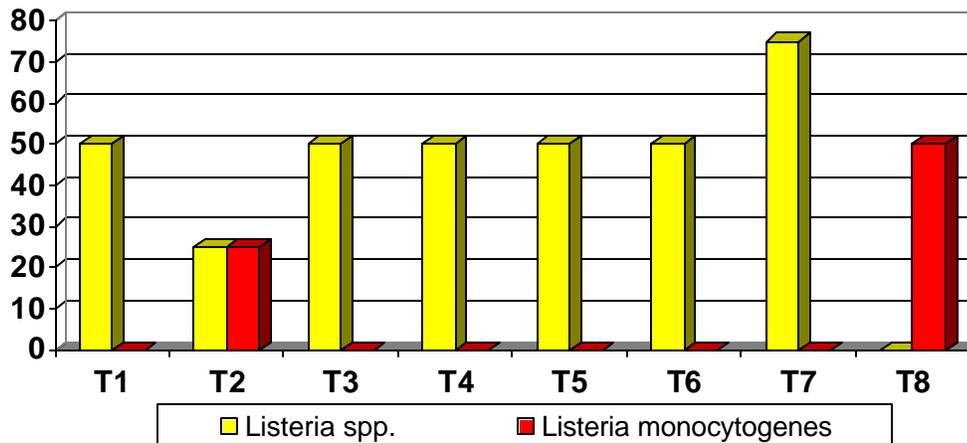


Figura 4 - Identificação de *Listeria* spp e de *Listeria monocytogenes*, a partir de colônias típicas isoladas de silagens de capim-Tifton 85, em porcentagens de ocorrência nos tratamentos, com 30 dias de pós-abertura do silo.

A presença de *Listeria* spp. e de *L. monocytogenes* foi detectada na abertura dos silos e durante todo o processo de armazenamento, indicando que o padrão de fermentação inadequado das silagens com alto conteúdo de matéria seca (Tabelas 2, 3) influenciou a ocorrência desta bactéria (Figuras 1, 2, 3, 4). É importante salientar, que mesmo nas silagens com maiores teores de matéria seca de 74,8% e pH de 8,59 sua presença ainda foi detectada. Porém CORROT (1998) relatou que em silagens com o pH elevado poderá ocorrer desenvolvimento de *Listeria*, salvo se o teor de matéria seca for muito elevado, ao redor de 70%. A contaminação com *Listeria* ocorre principalmente nas regiões periféricas do silo onde há alterações na conservação da silagem. Portanto a eliminação dessa silagem mal conservada pode evitar problemas de contaminação. Entretanto há relatos também de que a *L. monocytogenes* resiste a um amplo intervalo de pH, variando de 5,0 a 9,6. Em algumas situações especiais, foi relatada a ocorrência de microrganismos em pH 4,3 (PAPAGEORGIU & MARTH, 1989) e pH 4,8 (CONNER et al., 1986). FENLON (1985) mencionou que a bactéria era capaz de manter-se viável em pH 4,0 ou inferior, em silagem de boa qualidade.

FENSTERBANK et al. (1984) encontraram 48 tipos de *Listeria* isoladas de

animais doentes (27 cabras, 19 ovelhas, 2 vacas) de 33 fazendas e 40 tipos foram isolados da silagem ingerida por esses animais que foram estudados. A *Listeria* foi isolada mais freqüentemente de silagens de baixa qualidade do que aquelas de excelente qualidade, embora a listeria tenha sido encontrada em 11 das 31 silagens de excelente qualidade com valor de pH entre 3,6 e 4,0. Discordaram destes resultados RYSER et al. (1997) que verificaram o efeito do pH na distribuição da listeria em silagens de milho, feno e na forragem verde. Esses autores observaram que 83%, ou seja, 107 das 129 das amostras de silagem de milho de alta qualidade (pH 3,8-4,2) continham *listeria*. A silagem de baixa qualidade é prontamente reconhecida pela aparência; contudo esse experimento demonstrou que uma silagem de milho de alta qualidade (pH 3,8-4,2) pode conter *Listeria* spp, incluindo tipos de *Listeria monocytogenes* de grande importância nos casos de listeriose originada por alimentos.

A *Listeria monocytogenes* sobrevive dependendo de um fino ajuste entre características físico-químicas e microbiológicas, exemplo: tensão de oxigênio, matéria seca, pH, tipo de gramínea, qualidade microbiológica. De maneira geral, em todas as gramíneas ensiladas, com concentração de oxigênio de 1,0% ou mais, sustentam o crescimento da *Listeria monocytogenes*, este nível de crescimento foi dependente principalmente da taxa e qualidade de fermentação. Em silagens de gramíneas de muito baixa qualidade, com fermentação láctica restrita, a sobrevivência da *listeria* foi prolongada em condições anaeróbias (DONALD et al., 1995).

A maioria dos casos de listeriose surge da ingestão de alimentos contaminados e no Reino Unido a doença é particularmente comum em ruminantes que ingerem silagem. Embora os padrões de listeriose sejam facilmente reconhecidos, tais como, encefalites, abortos e septicemia, os aspectos epidemiológicos e patogênicos da infecção em ruminantes permanecem pouco entendidos. A invasão de células nervosas periféricas e a rápida entrada no cérebro é postulado como única característica de sua virulência, mas ainda é necessário maiores investigações desse fenômeno. Em quatro casos de oftalmielite em bovinos, a *Listeria monocytogenes* foi isolada do esfregaço ocular, no qual a expectativa era de que se encontrasse a *Moraxella bovis*. A silagem

esporulada e estocada, da qual a *L. monocytogenes* foi isolada, foi considerada como a mais provável fonte de infecção. O isolamento inicial da *Listeria monocytogenes* e sua descrição datam de 1926, mostrando sua predominância mundial e associação com sérias doenças numa grande variedade de animais, inclusive o homem (LOW & DONACHIE, 1997).

No trabalho de prevenção da *Listeria monocytogenes* de STAHL et al. (1996) foi discutida a dificuldade de se prevenir a presença desta bactéria patogênica em produtos alimentícios. Uma completa organização da produção pelos fazendeiros seria necessária para controlar o problema. A *Listeria* pode ser contaminante do leite cru. A silagem tem sido a maior fonte de ocorrência de *Listeria* no leite. Neste caso, a fonte de contaminação em fazendas produtoras de leite é a silagem e deve ser avaliada e a prática de higiene também.

OSTLING & LINDGREN (1993) trabalharam com a concentração inibitória mínima de ácido láctico não dissociado, ácido acético e fórmico, avaliando 23 tipos de enterobactéria e 2 tipos de *Listeria monocytogenes*. O valor da concentração inibitória mínima foi levemente menor em condições anaeróbias quando comparados com condições aeróbias. A influência dos prótons na inibição foi observada para ácido acético com baixos valores de pH. O ácido acético não dissociado foi mais eficiente na inibição da *Listeria monocytogenes* comparando com as enterobactérias. O ácido inorgânico (HCl) inibiu a maioria das enterobactérias com pH 4,0; alguns tipos contudo foram capazes de iniciar o crescimento com pH 3,8. Os resultados indicam que os valores de ácido não-dissociados que ocorrem na silagem de pH 4,1-4,5 são suficiente para proteger a forragem do crescimento de enterobactérias e *Listeria monocytogenes*.

A espécie *L. monocytogenes* foi identificada na silagem sem desidratação e com 5% de polpa cítrica em todos os tempos (abertura, 15 e 30 dias após a abertura). FENLON et al. (1996) estudaram a incidência de *Listeria monocytogenes* e a contaminação nos alimentos e no início do processamento, verificaram que os animais que se alimentaram somente de feno ou dietas manufaturadas não tinham níveis detectáveis de *Listeria* nas excretas. Contudo os animais que se alimentaram de

silagem, que é freqüentemente contaminada por *Listeria*, comumente a excretavam. SANAA et al. (1993) avaliaram 128 fazendas produtoras de leite, num estudo controle para verificar a associação de vários fatores de risco suspeitos para a contaminação do leite cru por *Listeria monocytogenes* e encontraram que a baixa qualidade da silagem (pH > 4.0), inadequada higiene da área e das vacas, incorreta desinfecção da ordenhadeira, insuficiente limpeza dos estábulos estão significativamente associadas com a contaminação do leite por *Listeria*. Maior atenção no preparo da silagem e melhor higiene na ordenha são importantes fatores para se diminuir o risco de contaminação do leite por este agente.

A espécie patogênica de *Listeria*, a *L. monocytogenes* não ocorreu no campo, ocorreu somente na silagem onde as condições de pH elevado e baixa concentração de ácidos orgânicos devido ao alto teor de matéria seca, permitiu a entrada de ar no sistema, propiciando o seu desenvolvimento. Os valores de pH aumentaram com a abertura dos silos, tornando-os menos densos e mais susceptíveis aos danos causados pela exposição ao ar, promovendo a deterioração aeróbia. O desenvolvimento de microrganismos indesejáveis como: bactérias aeróbias, bacillus, coliformes, fungos e leveduras podem degradar açúcares residuais e o ácido láctico produzido durante a fase anaeróbia, resultando em aumento de pH e instabilidade das silagens (McDONALD et al., 1991, BALSALOBRE et al., 2001).

3. Ocorrência de fungos

A forragem proveniente do campo, antes da ensilagem apresentou os seguintes gêneros de fungos, típicos de campo: *Helminthosporium*, *Nigrospora*, *Epicoccum*, *Phoma*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Pithomyces*, *Alternaria*, *Aspergillus* , conforme a Figura 6.

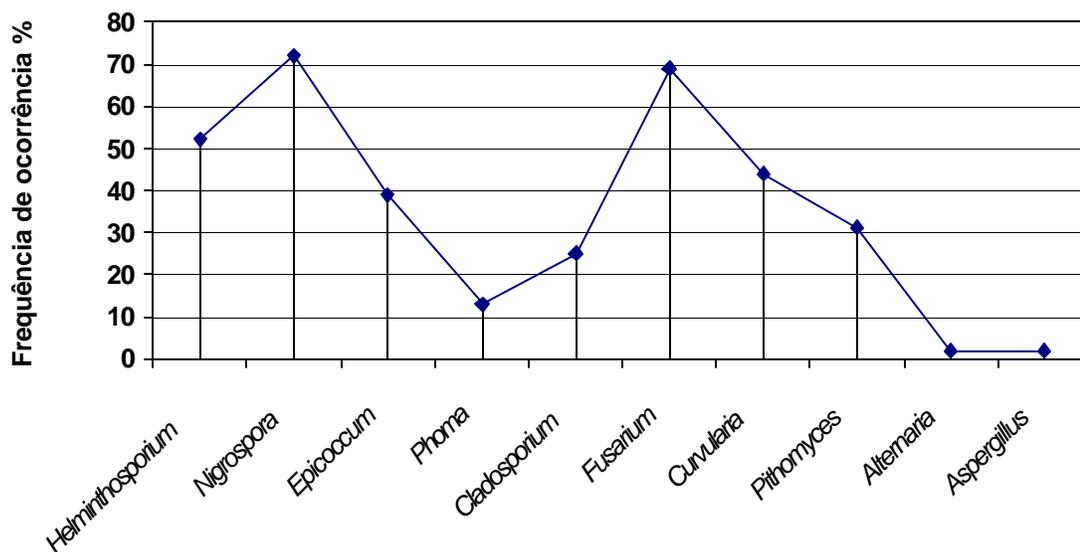


Figura 6 – Identificação dos gêneros dos fungos isolados de silagem de capim-Tifton 85 em porcentagem de ocorrência no campo

No material proveniente do campo, abertura dos silos e no período de exposição ao ar de 15 e 30 dias observou-se a incidência dos gêneros patogênicos *Fusarium*, *Phthomyces*, e *Penicillium*, Figura 7.

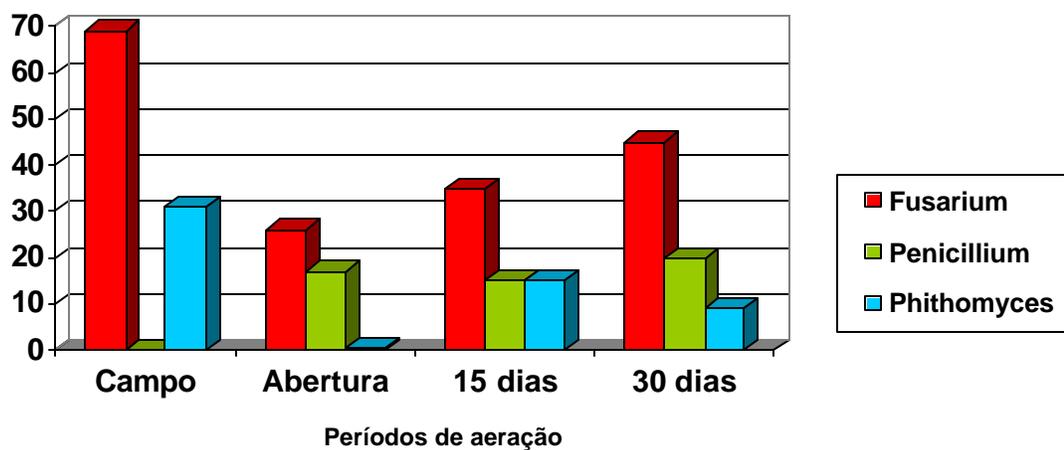


Figura 7 – Frequência de Ocorrência dos gêneros de fungos patogênicos isolados na forragem e nas silagens de capim-Tifton 85 avaliadas em diferentes períodos de aeração

Para HLODVERSSON e KASPERSSON (1986) estes fungos são encontrados em forragem armazenada em condições inadequadas. De maneira semelhante REIS et al. (1997) observaram a ocorrência de fungos dos gêneros *Cladosporium*, *Curvularia*, *Aspergillus* e *Penicillium* nos fenos de grama paulista (*Cynodon dactylon* (L.) Pers), enfardados com diferentes conteúdos de água. Todavia, segundo esses autores, com o armazenamento durante 30 dias, observou-se diminuição na incidência de *Curvularia* (fungo de campo) e aumento de *Aspergillus* e *Penicillium*, fungos típicos de armazenamento. Os fungos, principalmente espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, crescem em silagens onde há penetração de ar, com formação de toxinas, as quais podem acarretar prejuízos aos animais quando ingeridas (MAHANNA, 1994).

Na abertura dos silos foi detectada a presença dos gêneros *Penicillium* e *Fusarium*, o gênero *Pithomyces* apareceu em mínimas proporções. Os teores de matéria seca variaram de 39,1 a 63,9% e pH de 4,68 a 5,68, com baixa concentração de ácidos orgânicos, Figura 8.

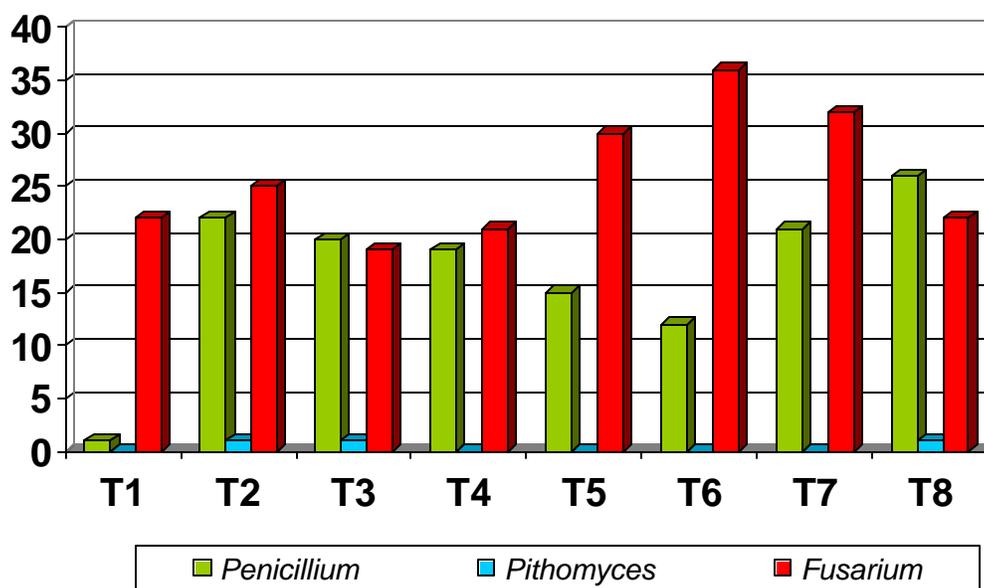


Figura 8 - Identificação dos gêneros dos fungos patogênicos isolados de todos os tratamentos de silagem de capim-Tifton 85 em porcentagem de ocorrência na abertura do silo.

Com 15 dias a presença do gênero *Pithomyces* foi maior nos tratamentos que receberam 2 e 3 horas de sol, portanto com maior teor de matéria seca (variando de 40,7 a 67,3%) e pH (4,97 a 8,36), Figura 9.

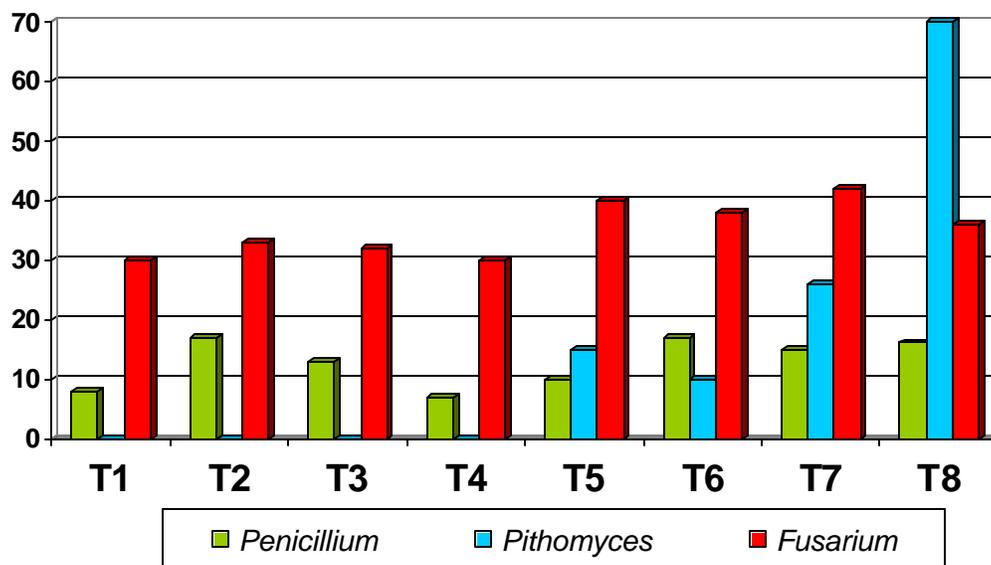


Figura 9 - Identificação dos gêneros de fungos patogênicos isolados de todos os tratamentos de silagem de capim-Tifton 85 em porcentagem de ocorrência com 15 dias de período de aeração.

Com 30 dias continuou a presença de *Penicillium* e *Fusarium*, porém o gênero *Pithomyces* começou a ser detectado nos tratamentos que receberam 1 hora de sol (58,8% de matéria seca e pH=7,85) e foi aumentando a proporção nos tratamentos com 2 horas de sol (67,4% de matéria seca e pH=8,09) e 3 horas de sol (71,7% de matéria seca e pH=8,59), Figura 10.

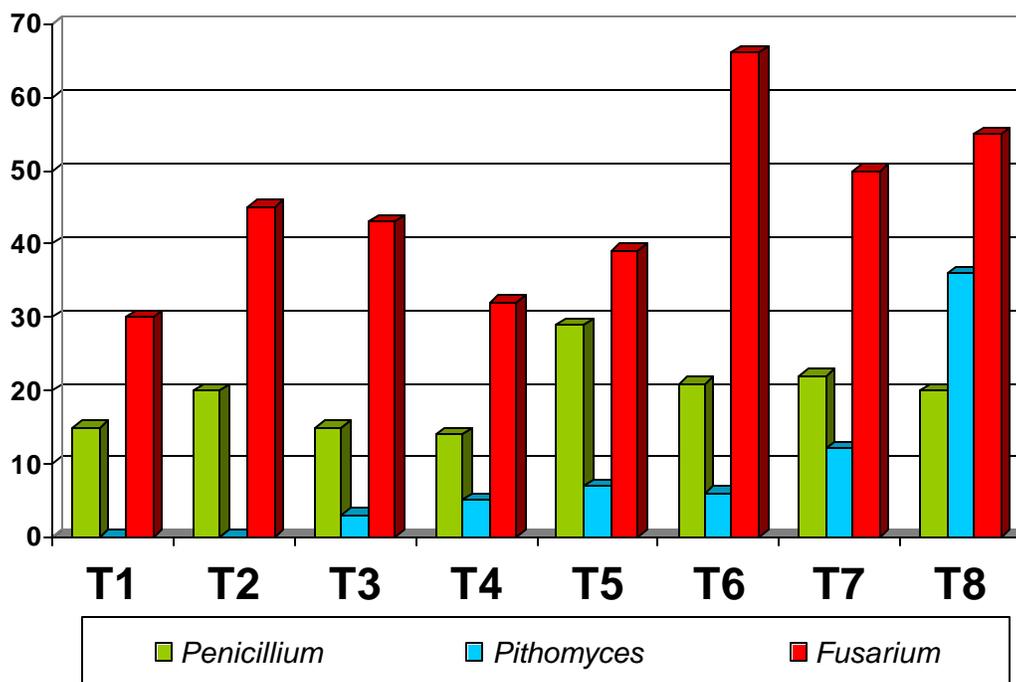


Figura 10- Identificação de gêneros dos fungos patogênicos isolados de todos os tratamentos de silagem de capim-Tifton 85 em porcentagem de ocorrência com 30 dias de período de pós-abertura

Observou-se nas silagens ocorrência de fungos e aquecimento com o prolongamento da exposição ao ar. Quando o silo é aberto, o ambiente que antes era anaeróbico passa a condição de aeróbico. Nesta condição, os microrganismos que permaneciam dormentes na ausência de oxigênio, multiplicam-se, resultando na deterioração da silagem. Na prática essa deterioração é geralmente manifestada pelo aumento na temperatura e pelo aparecimento de mofos. A taxa de deterioração varia entre as diferentes silagens (McDONALD et al., 1991). Os fungos mais encontrados em silagens são os do gênero *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Estes fungos necessitam de temperatura acima de zero, umidade acima de 20% e de oxigênio para se desenvolverem. Os principais substratos utilizados pelos microrganismos são os ácidos, etanol e os açúcares solúveis, resultando em aumento de pH e redução na digestibilidade e no conteúdo de energia (MUCK & SHINNES, 2001). A deterioração aeróbia da silagem está associada principalmente, com o desenvolvimento de fungos e

leveduras. Estes microrganismos apresentam alta resistência as variações do pH.

O crescimento de fungos ocorre em seguida ao crescimento de leveduras, resultando em dois picos de temperatura, que podem ser detectados durante a deterioração aeróbia. O primeiro pico, que pode ocorrer dois a três dias após a exposição aeróbia, é causado pelas leveduras, enquanto o segundo pico de temperatura, ocorrendo três a quatro dias depois, pode ser atribuído aos fungos. A ação desses microrganismos também está associada com um significativo aumento de pH, característico dos estágios avançados de deterioração (CASTRO, 2002). Os microrganismos aeróbios como fungos, leveduras e *Bacillus*, degradam o ácido láctico com facilidade, após a abertura do silo, gerando dióxido de carbono, etanol, ácido acético, além de grande liberação de calor (LINDGREN, 1999 E KUNG, 2000). Os ácidos láctico e acético e os carboidratos são as principais fontes de energia para os microrganismos envolvidos na deterioração das silagens (McDONALD et al., 1991).

Os elevados teores de matéria seca (Tabela 2), afetados pelo emurchecimento e adição de polpa cítrica contribuíram para elevação do pH, pois propiciaram a baixa formação de ácidos orgânicos (Tabela 3), pela dificuldade de compactação encontrada.

A compactação da silagem emurchecida deve ser feita exaustivamente durante todo o processo de enchimento do silo. Para forragens com elevados teores de matéria seca recomenda-se que sejam picadas em tamanhos menores e sejam distribuídas em camadas finas a fim de facilitar a compactação. No presente experimento o tamanho de partícula foi de 3 cm e o teor de matéria seca variou de 39,08 a 74,76 e houve dificuldade de compactação dos silos, o que facilitou a entrada de oxigênio na massa ensilada e presença de microrganismos indesejáveis.

O oferecimento de feno com alta incidência de fungos e a exposição a esporos fúngicos pode ser prejudicial à saúde dos animais, especialmente ruminantes jovens (MUCK et al., 1984; WITTENBERG et al., 1996)

Também NASCIMENTO et al. (1998) avaliando a qualidade do feno de alfafa, quanto à presença de fungos constataram que a ocorrência de fungos foi maior nos tratamentos em que a forragem não sofreu emurchecimento e permaneceu amontoadada

no galpão, os gêneros de fungos mais comuns foram: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizoctonia* e *Trichoderma*, sendo o gênero *Aspergillus* um potente produtor de micotoxinas.

Os alimentos mofados são menos palatáveis e podem reduzir a ingestão de matéria seca, isto leva a redução de ingestão de nutrientes, reduzindo o ganho de peso ou a produção de leite. Portanto o conhecimento de fatores microbiológicos relacionados com a confecção e utilização de silagens pode ajudar os produtores a manejar de forma adequada o uso de forragens conservadas. Isso seguramente resultará em maior eficiência de produção e melhor qualidade dos produtos.

Conclusões

A variação observada nas silagens avaliadas decorrentes do emurchecimento, adição de polpa cítrica peletizada e período de armazenamento causaram efeitos consistentes nas variáveis matéria seca, pH, nitrogênio amoniacal e ácidos orgânicos, mostrando que esses dois fatores influenciaram diretamente nos teores de matéria seca o que acarretou os altos valores de pH e baixos de N amoniacal e ácidos orgânicos.

O teor de matéria seca elevado (74,8%) não evitou a sobrevivência da *Listeria monocytogenes*, esta bactéria resistiu a condições de alto pH e baixos teores de nitrogênio amoniacal e ácidos orgânicos.

Pode se constatar que, após a abertura dos silos, as silagens de capim-Tifton 85 sofreram deterioração acentuada, possivelmente pela alteração no padrão de fermentação causado pelo alto teor de matéria seca, que propiciou a entrada de ar no sistema e o desenvolvimento de *Listeria spp*, *Listeria monocytogenes* e de fungos.

A presença de *Listeria spp* e de fungos patogênicos foi detectada no campo. Na abertura dos silos e durante todo o período de aeração de 15 e 30 dias além desses também foi detectada a presença de *Listeria monocytogenes*, evidenciando que a instabilidade aeróbia das silagens está relacionada com a presença destes microrganismos, oferecendo risco potencial para a saúde dos animais.

A Avaliação de fungos na forragem antes e após a ensilagem evidenciou os três grupos de fungos, classificados em: fungos de campo, fungos intermediários e fungos de armazenamento.

Referências Bibliográficas

- AOAC-ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 12ed. Washington D.C.:Association of Analytical Chemistry. 1975. 109p.
- BALSALOBRE, M.A.A. et al. Controle de perdas de silagem de gramíneas Tropicais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba, **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p.890-911.
- BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3 ed. Burgess: Publishing Company, 1972. 241p.
- BENACCHIO, S. Niveles de melaza en silo experimental de milho criollo (*Sorghum vulgare*). **Agronomy Tropical**, v.14, n.4, p.651-658, 1965.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Métodos analíticos para o controle de produtos de origem animal e seus ingredientes I, Métodos Microbiológicos. Brasília, 1993.
- CASTRO, F.G.F. **Uso de emurchecimento, inoculante bacteriano-enzimático ou ácido propiônico na produção de silagem de Tifton 85 (*Cynodon* sp.)**. 2002. 136p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2002.
- CONNER, D.E. et al. Effect of temperature, sodium chloride and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. **Applied Environment Microbiology** , v.52, n.1, p. 59-63, 1986.

- CORROT, G. **Qualité bacteriologique de l'enrubannage: spores butyriques et *Listeria*. Recolter & Conserver L'herbe aujourd'hui.** Paris: Association Française, 1998. 197p.
- CORSI, M.; MARTA JÚNIOR, G.B. Manejo de pastagens para produção de carne e leite. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 15., 1998, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1998., p.55-84.
- DONALD, A.S., FELON, D.R., SEDDON, B. The relationship between ecophysiology, indigenous microflora and growth of *Listeria monocytogenes* in grass silage. **Journal of applied Bacteriology**, v. 79, n.2, p. 141-148, 1995.
- DOYLE, M.P. Effects of environmental and processing condition on *Listeria monocytogenes* . **Food Technology** , v. 42, n.4, p. 169-71, 1988.
- EIROA, M.N. *Listeria monocytogenes* – características, ocorrência e desenvolvimento em alimentos. **Colet ITAL.**, v.20, n.1, p. 13-22, 1990.
- FENLON, D.R. Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. **Journal of applied Microbiology**, v.59, n.6, p. 537-43, 1985.
- FENLON, D.R.; WILSON,J.; DONACHIE, W. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of foods sources at primary production and initial processing. **Journal of applied Bacteriology**, v. 81, n.6, p.641-650, 1996.
- FENSTERBANK, R., AUDURIER, A., GODU, J. et al. *Listeria* strains isolated from sick animals and consumed silage. **Annual Research Veterinary** ,v.15, n.1, p.113-118, 1984.

FOOD RESEARCH INSTITUTE - University of Wisconsin – Madison. “**Fusarium Mycotoxins**” Disponível em:<<http://www.micotoxinas.com.br/boletim16.htm>>. Acesso em 27 ago. 2002.

HANLIN, B.T. **Illustrated genera of ascomycetes**. St Paul: APS Press., 1990, 263p.

HLODVERSSON, R. e KASPERSSON, A. Nutrient losses during deterioration of hay in relation to changes in biochemical composition and microbial growth. **Animal Feed Science**, v.15,n.12, p.149-165, 1986.

KUNG, L. Microbial and chemical additives for silages: effects on fermentation and animal response. In: WORKSHOP DE MILHO PARA SILAGEM, 2., 2000, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2000. P. 1-25.

LINDGREN, S. Can HACCP principles be of appliedd for silage safety? In: INTERNACIONAL SILAGE CONFERENCE, 7., 1999, Uppsala. **Proceedings...** Uppsala: Swedish University of Agricultural Science, 1999. p.51-66.

LOW, J. C. e DONACHIE, W. A review of listeria monocytogenes and listeriosis. **Veterinary Journal**, v.53, n.1, p.9-29, 1997.

LUCCA FILHO, O.A. Metodologia de testes de sanidade de sementes. In:----. **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill., 1987. p.276-298.

MAHANNA, B. Proper management assures high-quality feeds. **Feedstuffs**, Minneapolis, v.10, p 12-56, 1994.

McDONALD, HENDERSON, A.R. **The Biochemistry of Silage**. New York: John Wiley, 1981. 226p.

- McDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S.J.E. **The Biochemistry of Silage**. 2.ed. Marlow: Chalcombe Publications, 1991. 340p.
- MUCK, A.P.; GUYRE, P.; HOL BROOK, N. Physiological functions of glicocorticoides in stress and their relation to pharmacological actions . **Endocrinological Review**, v.5, n.1, p.25, 1984.
- MUCK, R.E.; SHINNES, K.J. Conserved forages (silage and hay): Progress and priorities. In: INTERNACIONAL GRSSLAND CONGRESS. XIX. 2001. São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba: Brazilian Society of Animal Husbandry. 2001.p. 753-762.
- NASCIMENTO, J.M., COSTA,C., ARRIGONI, M.B. et al. Método de fenação e tempo de armazenamento na composição bromatológica e ocorrência de fungos no feno de alfafa. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998. p.224-226.
- OFFICE OF INDIANA STATE CHEMIST (OISC) **“Mycotoxins in Feed grains” Current Guidelines for mycotoxins**. 2001. Disponível em:<<http://www.micotoxinas.com.br>>. Acesso em 28 ago. 2002.
- OSTLING, C.E. e LINDGREN, S.E. Inhibition of enterobacteria and *Listeria* growth by lactic, acetic and formic acids, **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, n.1, p.18-24, 1993.
- PEDREIRA, M.S; MOREIRA, A.L.; REIS, R.A.; COAN, R.M.; SILVEIRA, R.N.; AZEVEDO, P.T.; SEIXAS, P.F. Características químicas e fermentativas do Tifton 85 (*Cynodon*) ensilado com diferentes conteúdos de matéria seca e níveis de polpa cítrica. In: ANAIS DA REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., Piracicaba, 2001. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2001. P.100-102.

- POST, D. E. Food-borne pathogens-monograph number 2. *Listeria*. Technical Support Manager. **Oxoid Laboratories Co.** 1994. 25p.
- PAPAGEORGIU, D.K. & MARTH, E.H. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture ripening and storage of feta cheese. **Journal Food Protection**, v.52, n.2, p. 82-87, 1989.
- REIS, R.A.; PANIZZI, R.C., ROSA, B. et al. Efeitos da amonização na ocorrência de fungos, composição química e digestibilidade in vitro de feno de grama seda (*Cynodon dactylon* (L.) Pers). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.26, n.3, p.454-460. 1997.
- REIS, R.A.; PEREIRA, J.R.A. Produção de silagem pré-secada com forrageiras temperadas e tropicais. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, Maringá, 2001. **Anais...** Maringá: UEM, 2001. p.64-86.
- ROSENOW, E. M.; MARTH, E.H. Growth of *Listeria monocytogenes* in skimmed whole and chocolate milk and whipping cream during incubation at 4,8,13,21, and 35⁰ C. **Journal Food Protection**, v.50, p. 452-9, 1987.
- RYSER, E.T., ARIMI,S.M., DONNELLY, C.W. Effects of pH on distribution of listeria ribotypes in corn, hay, and grass silage. **Applied Environment Microbiology**, v. 63, n.9, p.3695-3697, 1997.
- SANAA, M., POUTREL, B., MENARD, J.L. Risk factors associated with contamination of raw milk by listeria monocytogenes in dairy farms, **Journal of Dairy Science.**, v.76, n.10, p.2891-2898, 1993.

- SENTHILKUMAR, K., UDAYAN, K., MANIAN, S. Successional pattern of mycoflora associated with litter degradation in a *Cymbopogon caesius* dominated tropical grassland. **Tropical Grass.**, v.27, n.27, p. 121-127. 1993.
- SCHELECH, W.F.; LAVIGNE, P.M.; BOURTULUSSI, R.A.; ALLEN, A.C. HALDANE, E.V.; WORT, A.J. Epidemic Listeriosis – Evidence for transmission by food. **New England Journal Medical**, v.308, p.203-206, 1983.
- SILVA, D.J. **Análise de Alimentos: Métodos químicos e biológicos.** Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 1990. 166p
- SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos.** 2.ed. São Paulo: Varela, 2001, 295p.
- SILVEIRA, A C. Técnicas para a produção de silagens. In: SIMPOSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGENS, 2., 1975, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ, 1975. p. 156-186.
- STEFANIE, J.W.H.; ELFERINK, O.; DRIEHUIS, F. Silage fermentation process and their manipulation. In: FAO ELECTRONIC CONFERENCE ON TROPICAL SILAGE, 1999, Rome. **Proceedings...** Rome: FAO, 2000. p.17-30.
- STHAL, V.; GARCIA, E., HEZARD, B. et al. Prevention of *Listeria monocytogenes* contamination on dairy farms and in the cheese industry. **Pathology Biology**, v. 44, n.9, p.816-24, 1996.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional Ecology of the Ruminant.** 2.ed. New York: Cornell University Press, 1994. 476p.

WELBOURN, J.L.; WILLIAMS JÚNIOR, J. New *Listeria* Control measures under consideration. **Scope Technology Bull Siliker Lab**, v.14, n.1, p. 1-7, .1999.

WITTENBERG, K.M., UNDI, M., BOSSUYT, C. Establishing a feed value for moulded hay. **Animal Feed Science and techonology**., v.60, n.3-4, p.301-310. 1996.

WOOLFORD, M.K. **The silage fermentation**. New York: Marcel Dekker, 1984. 350p.

CAPÍTULO 3 – Valor nutritivo do capim-Tifton 85 ensilado com diferentes conteúdos de umidade

RESUMO - O experimento foi conduzido na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- UNESP, Campus de Jaboticabal para avaliação do valor nutritivo do capim-Tifton 85 ensilado sem emurchecimento (umidade 60-70%) e com emurchecimento (umidade 40-50%) e com adição (5% na matéria natural) ou não de polpa cítrica. As amostragens foram efetuadas na abertura do silo (depois de 80 dias fechado) e aos 15 e 30 dias após a abertura, para avaliação da composição química e digestibilidade "in vitro" da matéria seca (DIVMS) das silagens. Foram avaliados os teores de N total, de nitrogênio insolúvel em detergente ácido (N-FDA), nitrogênio insolúvel em detergente neutro (N-FDN), nitrogênio amoniacal (N-NH₃), matéria seca (MS), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), hemicelulose e digestibilidade "in vitro" da matéria seca. Os dados foram analisados segundo o delineamento em blocos completos casualizados, em esquema de parcela subdividida, sendo que nas parcelas foram avaliadas as silagens submetidas ao emurchecimento e uso ou não de polpa cítrica e nas subparcelas os períodos de exposição ao ar, com quatro repetições. A análise dos teores de N-NH₃ / N total e de N total evidenciaram baixa produção de amônia nas silagens com alto teor de MS, provavelmente pela baixa atividade das bactérias do gênero *Clostridium*, preservando assim a fração PB. As frações N-FDN e N-FDA aumentaram devido ao aquecimento promovido por microrganismos aeróbios durante o período de aeração das silagens de alta matéria seca. Os teores dos componentes da fração fibrosa e a DIVMS das silagens de alta matéria seca não foram afetados pelo emurchecimento, adição de polpa cítrica e períodos de exposição ao ar.

Palavras-Chave: aditivos, silagem de capim, gramínea tropical, estabilidade aeróbia.

Introdução

A maioria dos sistemas de produção de ruminantes no Brasil são baseados na utilização de forrageiras tropicais, fato que merece relevância, pois a dinâmica de crescimento e produção de biomassa vegetal são controladas por variáveis edafo-climáticas, ocasionando uma estacionalidade da produção. Com o intuito de superar períodos críticos, algumas técnicas conservacionistas como a ensilagem e/ou fenação passam a ser importantes ferramentas para que os produtos de origem animal sejam competitivos no cenário.

O princípio da conservação de forragens, como a ensilagem, é baseado na fermentação anaeróbica, visando fornecer uma quantidade suficiente de ácido láctico para inibir microrganismos indesejáveis, bem como a atividade endógena de enzimas catalíticas, com o objetivo de manter as características do alimento próximas ao original.

Historicamente, o capim elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum) foi a primeira gramínea tropical perene de interesse para ensilagem, por apresentar elevado potencial de produtividade de matéria seca, quando bem manejada, e por se estabelecer em muitas regiões do país. Recentemente, com o aparecimento de novas introduções de gramíneas dos gêneros *Brachiaria*, *Cynodon*, *Panicum* e *Pennisetum* cresceu o interesse pela exploração destas, nas propriedades onde se pratica a conservação de forragens.

Entretanto o elevado teor de umidade contido nas plantas no momento ideal de corte para ensilagem, favorece o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, alterações nas frações protéicas, perdas por efluentes e redução no consumo voluntário de matéria seca. Devido à necessidade de se atenuar este efeito, a técnica do emurchecimento tem se mostrado como um método eficiente na elevação do teor de matéria seca.

As silagens de gramíneas tropicais passaram a ter projeção em planos nutricionais, nos últimos anos, devido ao surgimento e melhoria das condições de

colheita e processamento físico da forragem e estocagem. Os principais avanços tecnológicos que levaram à melhoria do sistema de conservação de forragens são descritos como sendo: melhoramento genético de plantas forrageiras associado às práticas de manejo de pastagens, surgimento de equipamentos de colheita com desempenho favorável, redução da área de plantio, custo e risco quando comparada à cultura tradicional, como a do milho.

Desta forma o trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos dos sistemas de conservação do capim-Tifton 85 ensilado com diferentes conteúdos de umidade: sem emurhecimento, emurhecida ambas sem e com a adição de polpa cítrica, e dos períodos de exposição ao ar, sobre o valor nutritivo das silagens

Material e Métodos

O experimento foi conduzido na FCAV-UNESP/ Jaboticabal para avaliar o valor nutritivo da forragem armazenada na forma de silagem e silagem emurhecida sem e com a adição de 5% de polpa cítrica peletizada.

A forrageira utilizada foi o capim-Tifton 85 (híbrido de *Cynodon*, PI 290884 originário da África do Sul com o Tifton 68 (*Cynodon nlemfuensis*) sendo o corte realizado no dia 16 de Abril de 2001, quando a forrageira estava com aproximadamente 40 dias de crescimento vegetativo e apresentava 10 a 20% de florescimento. A composição química da planta foi na MS foi PB (8,30%), N total (1,33), FDN (82,85%), FDA (34,85%).

O capim sofreu um emurhecimento que constitui-se na ceifa da forragem e exposição ao ambiente para desidratação no campo. Considerando os objetivos do estudo de se avaliar a ocorrência de microrganismos nas silagens de Tifton 85 contendo alto conteúdo de matéria e de verificar a possibilidade de colher e emurhecer e colher a forragem no mesmo dia, evitando maiores perdas de nutrientes e reidratação no período noturno, determinou-se os períodos de zero, 1, 2 e 3 horas de exposição ao sol para secagem. Com isso o teor de matéria seca observado foi

conseqüência desse tempo de exposição imposto à forragem e também pela adição de polpa cítrica peletizada. Os teores de matéria seca do material com zero, 1, 2 e 3 horas de exposição ao sol foi respectivamente 39,08%, 42,52%, 45,24% e 61,25%.

No galpão o capim sofreu picagem para se obter partículas com aproximadamente 3 cm para ser ensilado. Nos tratamentos que receberam a adição de polpa cítrica peletizada, esta foi adicionada na dose de 5% do peso verde, no momento do enchimento dos silos. A composição química da polpa cítrica peletizada foi (% MS) MS (88,24%), PB (6,74%), FDN (23,06%) e FDA (14,05%). A forragem foi compactada para a acomodação das camadas.

A forragem foi ensilada em tambores com diâmetro de 60 cm e altura de 90 cm. Com a acomodação final da forragem, os silos experimentais foram fechados e vedados com fitas plásticas auto-adesivas, na tentativa de evitar a entrada de ar. A seguir os silos foram armazenados em local protegido e à temperatura ambiente.

Os tratamentos avaliados foram: T1 –Tifton ensilado sem emurchecimento e sem polpa; T2 – Tifton ensilado sem emurchecimento e com 5% de polpa cítrica; T3 – Tifton ensilado com emurchecimento de 1 hora e sem polpa; T4 - Tifton ensilado com emurchecimento de 1 hora e com 5% de polpa;T5 - Tifton ensilado com emurchecimento de 2 horas e sem polpa; T6 - Tifton ensilado com emurchecimento de 2 horas e com 5% de polpa ; T7 - Tifton ensilado com emurchecimento de 3 horas e sem polpa; T8 - Tifton ensilado com emurchecimento de 3 horas e com 5% de polpa. Havia duas repetições de campo para cada tratamento.

No dia 03 de Julho de 2001 ocorreu a abertura dos silos, decorridos aproximadamente 80 dias do fechamento destes, eles foram abertos e em seguida realizou-se a amostragem, as amostras foram levadas para os laboratórios. No Laboratório de Nutrição Animal da FCAV/UNESP-campus de Jaboticabal realizou-se as análises de composição química e a determinação da digestibilidade "in vitro" da matéria seca (DIVMS).

As amostragens foram efetuadas no momento da abertura dos silos (80 dias após a ensilagem) e aos 15 e 30 dias após a abertura, foi retirada uma camada de 5

cm da parte superior do silo antes de cada amostragem para evitar que esta parte mais deteriorada influenciasse nas análises, à seguir camadas de 30 cm de silagem eram retiradas simulando a utilização de um silo do tipo poço em condições práticas. Após as amostragens nos dias especificados, o silo era fechado com lona plástica, vedado com tampa metálica a fim de proteger a silagem.

As amostras foram colocadas em estufas para a determinação da matéria seca a 55 ° C por 48 horas e em seguida a secagem foram moídas. Os teores de N total, N amoniacal e de proteína bruta (PB), segundo a AOAC (1975), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e hemicelulose, segundo os métodos descritos por SILVA (1990). Para a determinação do nitrogênio retido na fibra em fibra em detergente neutro (N-FDN) e na detergente ácido (N-FDA) foi utilizado 1 g de amostra da determinação da FDA e FDN, respectivamente e esta foi submetida à análise em equipamento Macro Kjeldahl, conforme método de KRYSHNAMOORTHY et al. (1983). A digestibilidade “in vitro” da matéria seca foi determinada pelo método de Tilley e Terry, citados por SILVA (1990), a adaptação do animal para esta análise foi feita com silagem de milho por 15 dias.

O delineamento utilizado foi em blocos completos casualizados, em esquema de parcelas subdivididas, sendo que nas parcelas foram avaliadas as silagens submetidas ao emurchecimento e uso ou não de polpa cítrica e nas subparcelas os períodos de exposição ao ar com quatro repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

A análise dos dados da Tabela 1 evidencia que ocorreu aumento no conteúdo de matéria seca ($P < 0,05$) das silagens em função da adição de polpa cítrica e do emurchecimento, o que pode ser devido ao o alto teor de matéria seca da polpa cítrica (88,24%) e da perda de umidade resultante do processo de secagem de 1, 2 e 3 horas de exposição ao sol.

Tabela 1- Teores de matéria seca (MS), nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e de nitrogênio total das silagens do capim-Tifton 85 submetidas a diferentes tratamentos

Tratamento	MS (%)			N Total			N-NH ₃ / N Total
	Período pós abertura (dias)			Período pós abertura (dias)			Abertura
	0	15	30	0	15	30	0
T1	39,1 Aa	40,70Aa	54,6Ab	1,4Ba	1,2Aa	1,3ABa	7,6 AB
T2	37,7Aa	40,7Ab	56,5ABc	1,2Aa	1,2Aa	1,4ABa	9,8A
T3	42,5Ba	41,1ABa	58,8Bb	1,3Aa	1,3Aa	1,2Aa	8,5AB
T4	42,7Ba	45,4BCb	66,1Cc	1,2Aa	1,3Aa	1,4Aba	8,6B
T5	45,2Ca	46,7Ca	67,4Cb	1,2Aa	1,3Aab	1,4Bb	4,7EF
T6	45,0Ca	46,5Ca	67,3Cb	1,3Ba	1,2Aa	1,4Ba	5,71E
T7	61,3Da	67,3Db	71,7Dc	1,4Ba	1,3Aa	1,3Ba	3,1FG
T8	63,9Ea	67,3Db	74,8Ec	1,4Ba	1,4Aa	1,5Ba	1,9G

- T1- Tifton ensilado sem emurchecimento e sem polpa
T2 - Tifton ensilado sem emurchecimento e com 5% de polpa
T3- Tifton ensilado com emurchecimento de 1 hora e sem polpa
T4--Tifton ensilado com emurchecimento de 1 hora e com 5% de polpa
T5- Tifton ensilado com emurchecimento de 2 horas e sem polpa
T6- Tifton ensilado com emurchecimento de 2 horas e com 5% de polpa
T7- Tifton ensilado com emurchecimento de 3 horas e sem polpa
T8- Tifton ensilado com emurchecimento de 3 horas e com 5% de polpa.

Médias seguidas de letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância

É importante salientar que apesar da adoção da prática de cobrir os silos após a retirada das camadas de 30 cm de silagem (abertura dos silos, 15 e 30 dias de exposição ao ar), simulando a utilização de um silo poço, tal procedimento pode ter influenciado os teores de matéria seca. Deve-se considerar, que a retirada apenas da camada superior para a análise, que era mais seca por estar mais exposta ao ar do que as camadas inferiores, e também devido a lixiviação de líquidos para a porção inferior dos silos, pode ter resultado em silagem com menor conteúdo de umidade. Contudo, deve-se considerar que este procedimento é o adotado nas condições de fazenda, onde na maioria das vezes o produtor não cobre os silos após a retirada da silagem, aumentando assim a exposição ao ar.

Com relação aos teores de matéria seca, verificou-se diferença significativa ($P < 0,05$) entre as silagens devido a esses fatores e também dos períodos de exposição ao ar. As silagens produzidas com forragem que receberam 3 horas de sol atingiram teor de matéria seca de 61,2 e 63,9% na abertura do silo e no período de armazenamento de 15 dias passaram para 67,3% e com 30 dias 71,7 e 74,8%. Cumpre salientar que esses valores comprometem todo o processo de fermentação característico que ocorre dentro do silo, pela dificuldade de compactação da silagem, causando baixa formação de ácidos orgânicos (Tabela 1).

De acordo com REIS & PEREIRA (2001) o ideal para o processo de ensilagem é que a forragem apresente teores de matéria seca entre 35 e 45%, sendo que para os teores de 40 a 45% é recomendável que a forragem seja picada em partículas menores, a fim de se conseguir uma melhor compactação

A adição de polpa cítrica peletizada poderia ser dispensada neste caso, pois neste estágio de maturidade do capim (40 dias de crescimento vegetativo) o teor de matéria seca apresentado foi 39,08%, pode ser considerado apropriado para a conservação da forragem na forma de silagem (WOOLFORD, 1984, McDONALD et al., 1991).

A análise conjunta das Tabelas 1 e 2, referentes aos dados de N amoniacal, N total e PB evidencia que houve pequena produção de amônia nas silagens com alto conteúdo de MS (Tabela 1). Tal fato pode ser explicado pela redução da proteólise devido ao aumento da pressão osmótica que tem ação inibitória sobre a atividade das bactérias do gênero *Clostridium*, preservando a proteína bruta. McDONALD et al. (1991) relataram que a técnica do emurchecimento possibilita a ensilagem de plantas forrageiras, com teor de matéria seca intermediário, num processo em que as fermentações indesejáveis são controladas através da diminuição da atividade da água ou elevação da pressão osmótica.

Nas silagens, um baixo teor de nitrogênio amoniacal, ou seja inferior a 10% do nitrogênio total, indica que o processo de fermentação não resultou em quebra excessiva da proteína em amônia, e nesta situação os aminoácidos constituem a maior

parte do nitrogênio não protéico (VAN SOEST, 1994). Ao contrário, um teor de nitrogênio amoniacal superior a 15% do nitrogênio total significa que a quebra de proteínas foi considerável.

WIERINGA (1960) destaca que os microrganismos do gênero *Clostridium* sp. são mais inibidos pela falta de umidade do que pela acidez do meio, podendo tolerar altos níveis de ácidos e hidrogênio quando em meio úmido, e que sua resistência é diretamente proporcional ao teor de umidade. É importante tentar inibir o crescimento de *Clostridium*, que são bactérias produtoras de ácido butírico, pois estas estão na forragem na forma de esporos e começam a se multiplicar assim que as condições do silo se tornam anaeróbias, os *Clostridium* degradam aminoácidos em uma variedade de compostos de baixo valor nutricional (McDONALD et al., 1991). As enterobactérias, anaeróbias facultativas, fermentam açúcares em ácido acético e também tem a habilidade em degradar aminoácidos, sendo que segundo WOOLFORD (1984), seu crescimento é inibido pela queda do pH decorrente da fermentação láctica.

O emurchecimento em gramíneas pode melhorar a qualidade da silagem, reduzindo ou eliminando perdas por efluentes, restringindo a fermentação, aumentando a pressão osmótica e melhorando a estabilidade aeróbica. Como resultado as silagens produzem pouco ácidos orgânicos e se estabilizam com pH mais alto. Em silagem bem preservada, carboidratos e proteínas são pouco afetados pela fermentação, proporcionando um bom alimento para o animal, geralmente palatável (VAN SOEST, 1994).

Os teores de proteína bruta encontrados nas silagens de capim-Tifton 85 neste experimento (Tabela 2) variaram de 7,4 a 9,1%. PEDREIRA et al. (2001) encontraram 8,3% de valor de proteína bruta para silagens de Tifton 85 aos 44 dias de crescimento. As silagens de gramíneas tropicais geralmente mostram teores de proteína abaixo de 6%, pois estes materiais são ensilados na maior parte das vezes em estágio fisiológico avançado. As plantas tropicais, além de apresentarem baixos teores de proteína, também apresentam baixos teores de nitrogênio como proteína verdadeira (solúvel). A proteína também pode ser afetada pela proteólise causada por microrganismos e ação

enzimática da planta.

Tabela 2 - Teores de proteína bruta (PB), de nitrogênio insolúvel em detergente neutro (N-FDN) e de nitrogênio insolúvel em detergente ácido (N-FDA) das silagens do capim-Tifton 85 submetidas a diferentes tratamentos

	PB (% MS)			N-FDN/NT			N-FDA/NT		
	Período pós abertura (dias)			Período pós abertura (dias)			Período pós abertura (dias)		
Silagens	0	15	30	0	15	30	0	15	30
T ₁	8,5 ABa	7,7 Aa	7,9 ABa	28,7 Aa	30,6 Ab	42,5 Ab	22,1Aa	29,8 Aa	40,9 Ab
T ₂	7,7 Aa	7,7 Aa	8,7 ABa	29,3 Aa	35,5 Ab	40,7 Ab	26,0 Aa	33,8 Ab	33,7 Ab
T ₃	7,8 Aa	8,3Aa	7,6 Aa	27,8 Aa	25,6 Aa	58,2 Ab	27,8 Aa	21,8 Aa	40,9 Ab
T ₄	7,8 Aa	8,3 Aa	8,7 ABa	27,4 Aa	31,1 Aab	32,8 Ab	25,8 Aa	28,0 Aa	30,7 Ab
T ₅	7,4 Aa	7,9 Aab	8,8 Bb	27,7 Aa	32,3 Ab	30,3 Ab	25,2 Aa	28,4 Aa	28,2 Aa
T ₆	7,9 ABa	7,7 Aa	8,5 ABa	23,0 Aa	35,5 Ab	34,8 Ab	23,0 Aa	30,6 Aa	32,6 Ab
T ₇	8,9 Ba	8,1 Aa	8,4 ABa	22,5 Aa	35,7 Ab	38,1 Ab	20,4 Aa	29,5 Aa	35,8 Ab
T ₈	8,5 Ba	8,5 Aa	9,1 Ba	25,7 Aa	33,1 Ab	35,9 Ab	24,3 Aa	27,2 Aa	34,5 Ab

T1- Tifton ensilado sem emurchecimento e sem polpa

T2 - Tifton ensilado sem emurchecimento e com 5% de polpa

T3- Tifton ensilado com emurchecimento de 1 hora e sem polpa

T4--Tifton ensilado com emurchecimento de 1 hora e com 5% de polpa

T5- Tifton ensilado com emurchecimento de 2 horas e sem polpa

T6- Tifton ensilado com emurchecimento de 2 horas e com 5% de polpa

T7- Tifton ensilado com emurchecimento de 3 horas e sem polpa

T8- Tifton ensilado com emurchecimento de 3 horas e com 5% de polpa.

Médias seguidas de letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância

A concentração de proteína bruta apresentou pequenas alterações entre os valores observados na planta (8,3%) e nas silagens avaliadas nos diferentes períodos de pós abertura (Tabela 2).

Tal fato, pode ser devido ao efeito do emurchecimento sobre a proteólise, uma vez que a baixa concentração de umidade impede a ação enzimática e atividade de *Clostridium* (WOOLFORD, 1984, MACDONALD et al., 1991).

A análise conjunta dos dados de PB, MS, N-NH₃ relacionados nas Tabelas 1 e 2 mostra que a porcentagem de N-NH₃ / N total diminuiu com o emurchecimento e adição de polpa cítrica, provavelmente devido à baixa proteólise oriunda da atividade de enzimas da planta ou mesmo proveniente daquelas produzidas pelas bactérias do gênero *Clostridium*, resultando na preservação da proteína bruta (WOOLFORD, 1984; McDONALD et al., 1991).

A colheita e estocagem de gramíneas e leguminosas como silagens ou fenos, é susceptível à alteração na composição bromatológica, uma vez que a perda dos vários componentes não são homogêneos e proporcionais. Durante a ensilagem, perde-se parte da fração proteína e por isso, é importante conhecer quanto de proteína é convertida em nitrogênio não protéico. As forragens submetidas ao emurchecimento prévio, geralmente têm sua fração protéica melhor preservadas que aquelas obtidas pelo corte direto. Contudo, o emurchecimento também promove uma considerável alteração na fração protéica decorrente da respiração da planta (LUCCI, 1997).

Na forragem fresca 75 a 90% do N total está na forma de proteína, constituindo principalmente peptídeos, aminoácidos livres, amidas, nucleotídeos e clorofila. Durante a ensilagem uma proteólise extensiva determina que 40 a 60% deste nitrogênio seja solubilizado em compostos nitrogenados não protéicos. A extensão da proteólise diminui com o aumento no conteúdo de matéria seca da silagem e com a redução do pH. Rápidas taxas de redução de pH são particularmente importante quando se ensila plantas com altos teores de proteína, como a alfafa, pois a atividade das enzimas proteolíticas é inibida quando o pH reduz de 4,5 a 4,0 (McDONALD et al., 1991; JASTER, 1995).

Não se observou diferenças ($P > 0,05$) nos conteúdos de N ligado a fração fibrosa (NIDN, NIDA) das silagens (Tabela 2). Contudo, registrou-se maiores valores ($P < 0,05$) de NIDN e de NIDA nas silagens que tiveram maior tempo de exposição ao ar durante 30 dias (Tabela 2).

Essas frações tendem a aumentar devido ao aquecimento promovido dentro do silo após a sua abertura pela alta atividade de microrganismos aeróbios. Assim, os

teores de NIDA refletem a ocorrência da reação de Maillard, ocasionando a diminuição do valor nutritivo através do decréscimo na disponibilidade de nitrogênio (VAN SOEST, 1994, REIS & PEREIRA, 2001).

Cumprе salientar que a fração de NIDA variou de 20,4 até 40,9% do N total das silagens (Tabela 2) evidenciando o decréscimo na disponibilidade do nitrogênio.

Silagens, geralmente com elevados teores de matéria seca, estão sujeitas a elevação de temperatura na massa ensilada. As condições de umidade e temperatura acima de 55 ° C são favoráveis à ocorrência de reações não enzimáticas entre os carboidratos solúveis e grupos amins dos aminoácidos, resultando em compostos denominados produtos da reação de Maillard (MOSER, 1980; VAN SOEST, 1994). A formação de produtos de Maillard em silagens superaquecidas promove diminuição acentuada na digestibilidade da proteína, uma vez que se pode observar aumentos consideráveis nos teores de nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) o qual é indisponível para os microrganismos do rúmen (VAN SOEST, 1994).

Após a abertura dos silos, o ambiente que antes era anaeróbio passa a condição de aeróbio, permitindo o crescimento de microrganismos aeróbios que causam deterioração nas silagens. Na prática essa deterioração é geralmente manifestada pelo aumento na temperatura e pelo aparecimento de mofos. A taxa de deterioração varia bastante entre as diferentes silagens (McDONALD et al., 1991). Algumas silagens apresentam pico de temperatura poucas horas após a exposição ao ar, enquanto outras silagens permanecem estáveis na presença de oxigênio por vários dias ou semanas.

A cor verde presente em silagens pré-secadas é alterada para vários tons de marrom, e a extensão das alterações na cor fornece indicação da intensidade do aquecimento no armazenamento e ocorrência da reação de Maillard.

Os elevados teores de matéria (Tabela 1) permitiram a entrada de oxigênio nos silos, o desenvolvimento de fungos sendo o causador do aumento da temperatura.

Segundo NUNES & BAPTISTA (2001) as modificações no valor nutritivo por essa reação incluem decréscimo na digestibilidade protéica, redução da

biodisponibilidade da lisina e de outros aminoácidos essenciais e mesmo, possivelmente, a formação de substâncias que podem ser inibidoras do crescimento microbiano, como por exemplo, a lisino-alanina. Pelo menos três mecanismos são responsáveis pelo déficit assim induzido: a implicação de uma cadeia lateral de aminoácidos na reação (bloqueamento do aminoácido), formação de ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas por condensação e uma diminuição global da digestibilidade da proteína. Logicamente, a consequência negativa mais óbvia da reação de Maillard nos alimentos é a diminuição do valor nutritivo das fontes de proteína.

A análise dos dados da Tabela 3 evidencia que os teores dos constituintes da parede celular não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) nas silagens avaliadas na abertura dos silos e aos 15 dias de exposição ao ar. Contudo, naquelas expostas ao ar por 30 dias, apesar de não se verificar diferenças estatisticamente significativas, observou-se aumento nos conteúdos de FDN e de hemicelulose.

De maneira geral, o processo de fermentação diminuiu os teores de FDN, provavelmente devido a hidrólise da hemicelulose acarretada pelo decréscimo dos valores de pH em decorrência da ensilagem (WOOLFORD, 1984). Por outro lado, observou-se teores mais elevados de FDA nas silagens (Tabela 3) comparado à planta FDA (34,85%) e maiores de FDN (82,85%) na planta do que nas silagens (Tabela 3), sendo tal fato devido ao efeito de concentração, uma vez que diminuindo FDN e expressando os dados em termos percentuais, tem-se aumento na fração que não foi alterada pelo processo fermentativo (McDONALD et al., 1991).

PEDREIRA et al. (2001) avaliando as características químicas e fermentativas do capim-Tifton 85, ensilados com diferentes teores de matéria seca, pela inclusão de diferentes percentuais de polpa cítrica ou pelo emurchecimento, verificaram que ambas as técnicas, associadas ou não, acarretaram aumento nos teores de matéria seca. Os teores de FDN diminuíram, enquanto os de FDA aumentaram, durante a fermentação de todas as silagens.

Tabela 3 - Teores de fibra em detergente neutro (FDN), de fibra em detergente ácido (FDA) e de hemicelulose das silagens do capim-Tifton 85 submetidas a diferentes tratamentos

	FDN (% MS)			FDA (% MS)			Hemicelulose (% MS)		
	Período pós abertura (dias)			Período pós abertura (dias)			Período pós abertura (dias)		
Silagens	0	15	30	0	15	30	0	15	30
T ₁	73,8 Aa	73,2 Aa	75,1 Ba	36,7 Ab	38,3 Ab	33,4 Aa	37,1Ab	34,8 Aa	42,6 Bb
T ₂	72,8 Aa	72,9 Aa	75,4 Ba	38,6 Ab	37,9 Ab	34,8 Ab	34,2 Aa	35,0 Aa	40,6 Bb
T ₃	72,6 Aa	74,4 Aa	72,0 Aa	38,0 Aa	36,3 Aa	36,7 ABa	34,6 Aa	38,1 Aa	35,3 Aa
T ₄	71,6 Aa	72,9 Aa	69,3 Aa	38,5 Aa	35,7 Aa	36,7 ABa	33,1 Aa	37,2 Ab	32,6 Aa
T ₅	72,5 Aa	71,5 Aa	75,1 Ba	38,6 Aa	35,6 Aa	38,4 Ba	33,9 Aa	35,8 Aa	36,7 Aa
T ₆	74,4 Aa	72,4 Aa	72,5 Aa	37,6 Aa	36,0 Aa	38,9 Ba	36,8 Aa	36,4 Aa	33,5 Aa
T ₇	74,5 Aa	74,4 Aa	77,7 Ca	38,3 Aa	37,5 Aa	37,4 ABa	36,2 Aa	36,9 Aa	40,3 Bb
T ₈	74,2 Aa	72,4 Aa	78,2 Ca	38,7 Aa	38,6 Aa	36,2 ABa	35,5 Aa	33,8 Aa	42,0 Bb

- T1- Tifton ensilado sem emurchecimento e sem polpa
T2 - Tifton ensilado sem emurchecimento e com 5% de polpa
T3- Tifton ensilado com emurchecimento de 1 hora e sem polpa
T4--Tifton ensilado com emurchecimento de 1 hora e com 5% de polpa
T5- Tifton ensilado com emurchecimento de 2 horas e sem polpa
T6- Tifton ensilado com emurchecimento de 2 horas e com 5% de polpa
T7- Tifton ensilado com emurchecimento de 3 horas e sem polpa
T8- Tifton ensilado com emurchecimento de 3 horas e com 5% de polpa.

Médias seguidas de letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância

O conteúdo de hemicelulose (Tabela 3), situa-se um pouco acima da amplitude de valores sugerida por McDONALD et al. (1991), que reportam que a hemicelulose contida nas gramíneas aumenta com a maturidade, apresentando variação de 10 a 30% na matéria seca.

O tempo de exposição ao ar teve pouca influência nos valores de FDN, FDA, hemicelulose.

No período de armazenamento, de acordo com a análise dos dados referentes

aos conteúdos de FDN, FDA e hemicelulose (Tabela 3), observa-se que não houveram alterações nas silagens avaliadas na abertura dos silos e 15 dias de exposição ao ar, contudo houve aumento no teor de hemicelulose nas silagens avaliadas aos 30 dias, provavelmente devido ao elevado valor de pH (8,5) que interrompeu a hidrólise ácida da hemicelulose.

De acordo com a Figura 1, os valores da digestibilidade “in vitro” da matéria seca foram em média 34,8% na abertura dos silos, 33,4% com 15 dias e 32,8% com 30 dias de exposição ao ar. Observa-se que as silagens produzidas apresentaram baixos valores de DIVMS, sendo tal fato relacionado com a alta proporção de NIDA e de componentes da fração fibrosa.

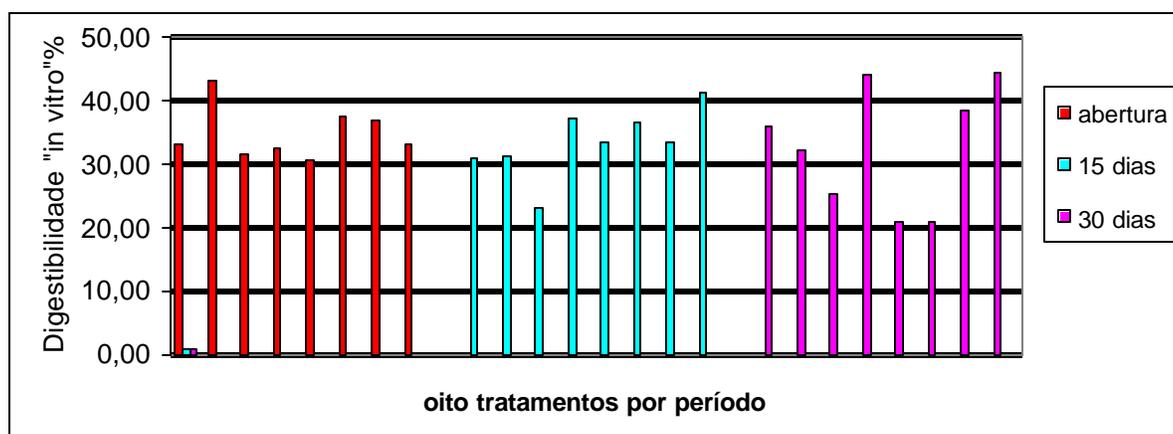


Figura 1- Valores médios de digestibilidade "in vitro" da matéria seca (DIVMS) das silagens de capim-Tifton 85, na abertura do silo e aos 15 e 30 dias de armazenamento

- T1- Tifton ensilado sem emurchecimento e sem polpa
- T2 - Tifton ensilado sem emurchecimento e com 5% de polpa
- T3- Tifton ensilado com emurchecimento de 1 hora e sem polpa
- T4--Tifton ensilado com emurchecimento de 1 hora e com 5% de polpa
- T5- Tifton ensilado com emurchecimento de 2 horas e sem polpa
- T6- Tifton ensilado com emurchecimento de 2 horas e com 5% de polpa
- T7- Tifton ensilado com emurchecimento de 3 horas e sem polpa
- T8- Tifton ensilado com emurchecimento de 3 horas e com 5% de polpa.

Os dados avaliados evidenciam que o alto conteúdo de MS das silagens não permitiu o eficiente processo de fermentação, levando a altos valores de pH o que

propiciou o desenvolvimento de microrganismo levando a diminuição no conteúdo celular, aquecimento da massa, e conseqüentemente formação de compostos nitrogenados indisponíveis, tendo como conseqüência o decréscimo na digestibilidade das silagens.

Devido ao aquecimento promovido dentro do silo após a sua abertura pela alta atividade de microrganismos aeróbios, os teores de NIDA tenderam a aumentar e estes refletem a ocorrência da reação de Maillard, ocasionando a diminuição do valor nutritivo através do decréscimo na disponibilidade de nitrogênio (VAN SOEST, 1994; REIS & PEREIRA, 2001).

O tamanho de partícula também pode influenciar nas perdas ocorridas de líquido intracelular, na forma de efluente no silo devido ao rompimento da parede celular e ao extravasamento do conteúdo celular (WOOLFORD, 1984).

O efeito do emurchecimento influi na digestibilidade (McDONALD et al., 1991). Quando a secagem é prolongada, as perdas de nutrientes digestíveis ocorre através de oxidação e lixiviação se as condições forem desfavoráveis.

A deterioração aeróbia das silagens também é indesejável devido a grande perda de nutrientes associada com a mesma, resultando em baixo consumo do material e até mesmo rejeição completa da silagem pelos animais (McDONALD et al., 1991).

Conclusões

A ensilagem do capim-Tifton 85 constitui-se numa opção interessante de volumoso, porém a variação no teor de matéria seca verificado neste trabalho deveu-se ao emurchecimento e adição de polpa cítrica, a qual poderia ter sido dispensada visto que o teor de matéria seca já se encontrava elevado.

A análise integrada dos parâmetros de compostos nitrogenados e fração fibrosa e digestibilidade “in vitro” da matéria seca, isto é, do valor nutritivo da silagem, evidenciaram que esses foram afetados diretamente pelo elevado teor de matéria seca das silagens o que acarretou baixos teores de N amoniacal e altos de N-FDN e N-FDA, conseqüentemente afetou a digestibilidade da matéria seca. A polpa cítrica não influenciou o valor nutritivo das silagens.

A maior eficiência da forragem emurcheçada juntamente com o tamanho de partícula de 3 cm, não foram suficientes para uma adequada compactação durante a ensilagem, o que ocasionou perdas indesejáveis na fermentação e provável aquecimento do silo no armazenamento.

Referencias Bibliográficas

AOAC-ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 12ed. Washington D.C.:Association of Analytical Chemistry. 1975. 109p.

JASTER, H.P. Legume and grass silage preservation. In: MOORE, K.J., KRAL, D.M., VINEY, M.K. **Post-harvest Physiology and Preservation of Forages**. Madison: Wisconsin, 1995. p. 91-115.

KRYSSHANAMOORTHY, U. et al. Evaluation of a mathematical model of rumen digestion and in vitro simulation rumen proteolysis to estimate the rumen-undegraded nitrogen content of feedstuffs. **British Journal Nutrition**, v. 50, n. 23, p. 555, 1983.

LUCCI, C.S. **Nutrição e Manejo de Bovinos Leiteiros**. São Paulo: Manole, 1997. p.169.

McDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S.J.E. **The Biochemistry of Silage**. 2.ed. Marlow: Chalcombe Publications, 1991. 340p.

- MOSER, L.C. Quality of forage as affected by post-harvest storage and processing. In: ---- **Crop quality storage and utilization**. Madison: ASA/CSSA, 1980.p. 227-260.
- NUNES, C.S., BAPTISTA, A.O. Implicações da reação de Maillard nos alimentos e nos sistemas biológicos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.96, n.538, p.53-59.
- PEDREIRA, M.S. et al. Características químicas e fermentativas do Tifton 85 (*Cynodon*) ensilado com diferentes conteúdos de matéria seca e níveis de polpa cítrica. In: ANAIS DA REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., Piracicaba, 2001. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p.100-102.
- REIS, R.A.; PEREIRA, J.R.A. Produção de silagem pré-secada com forrageiras temperadas e tropicais. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, Maringá, 2001. **Anais...** Maringá: UEM, 2001. p.64-86.
- SILVA, D.J. **Análise de Alimentos: Métodos químicos e biológicos**. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 1990. 166p
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2.ed. New York: Cornell University Press, 1994. 476p.
- WIERINGA, G.W. Some factors affecting silage fermentation. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 1960, Berkshire. **Proceedings...** Berkshire, 1960. p. 497-502.
- WOOLFORD, M.K. **The Silage Fermentation**. New York: Marcel Dekker, 1984. 350p.