

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

Óleo funcional na dieta de vacas leiteiras

**ELMESON FERREIRA DE JESUS
MÉDICO VETERINÁRIO**

2015

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

Óleo funcional na dieta de vacas leiteiras

Elmeson Ferreira de Jesus

Orientador: Prof. Dr. Francisco Palma Rennó

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

2015

J58o Jesus, Elmeson Ferreira
Óleo funcional na alimentação de vacas leiteiras / Elmeson
Ferreira de Jesus. -- Jaboticabal, 2015
xviii, 80 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientador: Francisco Palma Rennó
Banca examinadora: Arlindo Saran Netto, Jefferson Rodrigues
Gandra, Rosemary Lais Galati, Mauro Dal Secco de Oliveira
Bibliografia

1. Antimicrobiano. 2. Desempenho produtivo. 3. Monensina. 4. Óleo
funcional. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 636.087:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela seção técnica de aquisição e tratamento da informação –
serviço técnico de biblioteca e documentação - unesp, câmpus de jaboticabal.



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

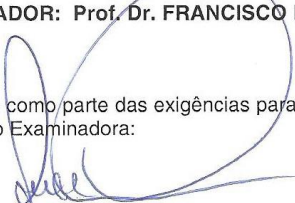
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ÓLEO FUNCIONAL NA DIETA DE VACAS LEITEIRAS

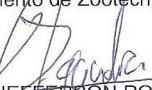
AUTOR: ELMESON FERREIRA DE JESUS

ORIENTADOR: Prof. Dr. FRANCISCO PALMA RENNÓ

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. FRANCISCO PALMA RENNÓ
Departamento de Zootecnia / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de Pirassununga


Prof. Dr. ARLINDO SARAN NETTO
Departamento de Zootecnia / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de Pirassununga


Prof. Dr. JEFFERSON RODRIGUES GANDRA
Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados/MS


Profa. Dra. ROSEMARY LAIS GALATI
Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá/MT


Prof. Dr. MAURO DAL SECCO DE OLIVEIRA
Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 11 de dezembro de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Elmeson Ferreira de Jesus nascido em 06 de agosto de 1983, em Novo Cruzeiro-MG, filho de Leontino Ferreira dos Santos e Nidiva Pereira Batista, concluiu o ensino médio no ano de 2002 na Escola Agrotécnica Federal de São João Evangelista EAFSJE – MG. Em março de 2004, ingressou no curso de Medicina Veterinária pela Universidade Metodista de São Paulo (UMESP) e em julho de 2009, iniciou o curso de Mestrado em Ciências pela Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), na área de concentração Nutrição e Produção Animal, sob a orientação do prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, com conclusão no dia 31 de Agosto de 2011. No dia 01 de setembro de 2011 passou a integrar a equipe do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL/FMVZ-USP). Em março de 2012, ingressou no curso de Doutorado em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Francisco Palma Rennó. Durante o doutorado realizou estágio pelo programa Doutorado Sanduíche no exterior com duração de 8 meses na Ohio State University sob orientação do Prof. Dr. Zhongtang Yu, na qual estudou *in vitro* as bactérias deaminadoras de aminoácidos e produtoras de amônia no rúmen.

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.” (Ayrton Senna)

E mesmo que meus passos sejam falsos, mesmo que meus caminhos sejam errados, mesmo que meu jeito de levar a vida incomode, eu sei quem sou... e sei pelo que devo lutar, e se você acha que meu orgulho é grande, é porque nunca viu o tamanho da minha fé.” (Tião Carreiro)

DEDICO

Aos meus pais Leontino Ferreira dos Santos e Nidiva Pereira Batista pela dedicação e amor por todos estes anos fazendo todo esforço para que eu seja uma pessoa melhor, tão necessária ao desenvolvimento como pessoa perante a sociedade, possibilitando meu crescimento e formação profissional.

A minha irmã Carla Ferreira Santos pelo apoio e auxílio imprescindível durante toda minha vida e principalmente acadêmica, e mais do que isso é a responsável por me tirar da zona de conforto da casa dos meus pais.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tornar tudo possível;

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, e ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade de realização do curso;

À Universidade de São Paulo, a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, e ao Departamento de Nutrição e Produção Animal pelo acolhimento durante o meu curso;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo, que gerou tranquilidade e possibilitou a dedicação intensa e exclusiva a este trabalho;

À empresa Oligo Basics, pela ajuda financeira na execução deste projeto.

Ao programa estágio de doutorado sanduíche no exterior por intermédio do Programa de Pós graduação em Zootecnia da FCAV/UNESP, pela oportunidade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, pela ajuda, competência, profissionalismo, ensinamentos, confiança, paciência, imprescindível apoio, e dedicação dispensada, que possibilitaram a geração dos resultados.

Professor Dr. Arlindo Saran Netto muito obrigado, para que tudo isso fosse possível.

À Professora e Coordenadora do Programa de Pós graduação em Zootecnia Dra. Izabelle Auxiliadora Molina de Almeida Teixeira, pela contribuição no desenvolvimento deste curso, sempre a disposição ao diálogo em eventuais problemas.

Ao Professor Zhongtang Yu (Universidade Estadual de Ohio) pela recepção e atenção prestada durante todo período nos EUA, paciência e pelos ensinamentos;

A Marjorye Kaori Kametani “pequena” minha namorada, pelo companherismo e apoio durante todo processo de elaboração deste trabalho;

Aos colegas de Mestrado e Doutorado Tiago Tomazi, Juliano Gonçalves, Marcos Arcari, Juliana Barreiro, Cristian Martins, Bruna Gomes, Alejandro Velasquez, Dannylo Oliveira, Flávio Perna, Nara Consolo, Maurício Martins, Maria Fernanda, Juliana Santos, Daniele Beuron, Juliane Diniz, Cristiane Cortinhas, Mariza França, Lenita Verdurico, Vitor Bettero, Roldolfo Mingoti, Cybele Araújo, Gustavo Calomeni, Rodrigo Gardinal, Gustavo Ferreira, Filipe Zanferari, Caio Takiya, Thiago Vendramini, Thiago Silva e Guilherme Gomes;

Aos estudantes de Iniciação Científica Vanessa Lacuna, Fernanda Ramos, Carlos Consentini, Victor Galvão, Artur Costa, Mariana Rentas, Brenda e Jéssica Bertoni;

Aos estagiários Mellory Martins, Ana Luiza, Camylla Pedrosa, Elisandra Maria, Maria Eduarda, Letícia que me ajudaram diretamente neste estudo e a todos que tive a oportunidade de conhecer e trabalhar no LPBL nos últimos anos muito obrigado;

Ao Diogo Martinelli, Nathália pelo apoio durante o todo tempo que passamos juntos;

Aos colegas da FCAV/UNESP Fábio Borba, Viviane Borba, Antônio Neto, Andressa Ribeiro, Elias San Vito, Pablo Castagnino, Erick Escobar, André Valente, Sabrina Saraiva, Fernando Alari, Gregory Caputti, Mariana Azenha, Rafael Leite, Diogo Soares, Rondineli Barbero, João Costa, Daiane Becker, Marco Monteiro, Matheus Moretti, Carlos Rabelo, Vitor Costa, Leandro Galzerano, Antônio Neto.

À Daniella Donato pela moradia em Jaboticabal e amizade de longa data.

Aos colegas Jefferson Gandra e José Esler pela oportunidade de conviver como alunos de pós-graduação e hoje professores. A meus colegas/companheiros/irmãos de moradia Rafael Barletta, Tiago Del Valle, Pablo Gomes, Gustavo Ferreira.

Aos amigos de faculdade Fábio Bigonha, Aurea Valentino, Juliana Moraes, Juliana Padinha, Leandro Terron, Camila Pugliesa, Isabella Ferreira, Andressa Pessolato, Sérgio Bom.

Aos funcionários do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite, dona Dalva (Malvina), Lupércio, Lucas, Denis, Shimith e todos os funcionários da empresa tercerizada (Hingilimp e/ou O.O. Lima).

A todos os professores do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP/USP) e do Departamento de Zootecnia (FCAV/UNESP) pela atenção e auxílio durante este curso; e aos funcionários da Secretaria da FCAV/UNESP, em especial Gabriela, Diego, Moyses e Márcia pelo apoio e atenção dispensadas;



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Utilização de aditivos na dieta de vacas lactantes", protocolado sob o CEUA nº 6134130415, sob a responsabilidade de **Francisco Palma Rennó e equipe; Francisco Palma Rennó** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) em reunião de 17/06/2015.

We certify that the proposal "Lactating dairy cows fed dietary additives", utilizing 24 Bovines (24 females), protocol number CEUA 6134130415, under the responsibility of **Francisco Palma Rennó and team; Francisco Palma Rennó** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo University (CEUA/FMZV) in the meeting of 06/17/2015.

Vigência da Proposta: de 04/2015 a 06/2015

Área: **Nutrição E Produção Animal**

Procedência: **Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite da FMVZ USP**

Espécie: **Bovino**

Gênero: **Fêmeas**

idade: **48 meses**

N: **24**

Linhagem: **Holandesas**

Peso: **580**

São Paulo, 22 de junho de 2015

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xv
1.INTRODUÇÃO	1
2.HIPÓTESE e OBJETIVOS	2
3.REVISÃO DE LITERATURA	2
3.1.Óleos essenciais.....	4
3.2.Composição do óleo funcional	5
3.3.Estudos de fermentação ruminal <i>in vitro</i> com óleos essenciais.....	7
3.4.Estudo <i>in vivo</i> com óleos essenciais na nutrição de ruminantes	10
3.5.Mecanismo de ação proposto para óleos essenciais.....	14
3.6.Ionóforo monensina sódica na alimentação de bovinos	17
3.7.Mecanismo de ação dos antibióticos ionóforos	19
3.8.Fermentação ruminal	20
4.MATERIAL e MÉTODOS	23
4.1.Local, instalações dos animais	23
4.2.Delineamento, dietas experimentais e análise de alimentos	24
4.3.Digestibilidade aparente total.....	27
4.4.Fermentação ruminal	28
4.5.Síntese de proteína microbiana	29
4.6.Produção e composição do leite	30
4.7.Parâmetros sanguíneos.....	30

4.8.Balanço de energia	31
4.9.Balanço de nitrogênio	31
4.10.Avaliação do escore de condição corporal e peso corporal	32
4.11.Análises estatísticas	32
5.RESULTADOS	34
5.1.Consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes	34
5.2.Fermentação ruminal	35
5.3.Síntese de proteína microbiana	39
5.4.Parâmetros sanguíneos	40
5.5.Produção e composição do leite	40
6.DISSCUSSÃO	43
6.1.Consumo e digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes	43
6.2.Fermentação ruminal	46
6.3.Síntese de proteína microbiana	50
6.4.Parâmetros sanguíneos	52
6.5.Produção e composição do leite	54
6.6.Balanço de nitrogênio	56
6.7.Balanço de energia	57
7.CONCLUSÃO	57
8.IMPLICAÇÕES	57
9.EXPERIÊNCIA NO EXTERIOR	58
10.REFERÊNCIAS	58
11.APÊNDICE	80

ÓLEO FUNCIONAL NA DIETA DE VACAS LEITEIRAS

RESUMO - O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da inclusão de óleo funcional composto de ácido anacárdico, cardol e cardanol (óleo da castanha de caju) e ácido ricinoleico (óleo de mamona) na dieta de vacas em lactação sobre consumo, digestibilidade aparente total da matéria seca e nutrientes, fermentação ruminal, produção e composição do leite, síntese de proteína microbiana, perfil metabólico, balanço de nitrogênio e energia. Foram utilizadas vinte e quatro vacas pluríparas da raça Holandês, das quais seis apresentavam cânula ruminal, com peso corporal médio de 618 ± 76 kg, $150,24 \pm 91,43$ dias em lactação e $29,1 \pm 4,01$ kg/dia de produção de leite no início do experimento. As vacas foram alocadas em oito Quadrados Latinos 3×3 , balanceados e contemporâneos, alimentadas com os seguintes tratamentos: 1) controle (CON), composto por dieta basal sem inclusão de aditivos; 2) óleo funcional (OF), com adição de 500 mg/kg da MS (Essential® Oligo Basics) e 3) monensina sódica (MON) com adição de 22 mg/kg da MS. Não houve efeito ($P > 0,05$) dos tratamentos sobre o consumo de matéria seca e nutrientes (kg/dia), coeficientes de digestibilidade e consumo em porcentagem do peso corporal. A inclusão de óleo funcional ou monensina sódica na dieta não alterou ($P > 0,05$) o pH, as concentrações de amônia, acetato e butirato, e a relação acetato: propionato no rúmen. No entanto, as inclusões de óleo funcional ou monensina sódica aumentaram ($P < 0,05$) a concentração de propionato ruminal e o tratamento óleo funcional aumentou ($P < 0,05$) a concentração total de ácidos graxos de cadeia ramificada. As vacas alimentadas com óleo funcional ou monensina sódica apresentaram aumento ($P < 0,05$) da produção de leite, mas a inclusão de monensina sódica reduziu ($P < 0,05$) o teor de gordura do leite. A inclusão de óleo funcional reduziu ($P < 0,05$) a concentração de ureia no sangue. A síntese de proteína microbiana e os balanços de energia e nitrogênio não foram influenciados pelos tratamentos ($P > 0,05$). A inclusão de óleo funcional ou monensina sódica nas dietas aumentaram a produção de leite e a concentração de propionato ruminal, sem alterar o consumo e a digestibilidade da matéria seca e nutrientes.

Palavras-chave: antimicrobiano, desempenho produtivo, monensina, óleo funcional

FUNCTIONAL OIL IN DAIRY COWS DIET

ABSTRACT - This study aimed to evaluate the effects of the inclusion of functional oil composed of anacardic acid, cardol and cardanol (cashew nut shell liquid and castor oil) and ricinoleic acid (castor oil) in diets of dairy cows on intake, total apparent digestibility of dry matter and nutrients, rumen fermentation, milk yield and composition, microbial protein synthesis, metabolic profile, and nitrogen and energy balance. Twenty-four multiparous Holstein cows (six cannulated in the rumen), with an average body weight of 618 ± 76 kg, 150.24 ± 91.43 days in lactation and milk yield of 29.1 ± 4.01 kg/day in the beginning of the study were evaluated. Cows were allocated into eight 3 x 3 Latin squares, balanced and contemporary, and fed with the following treatments: 1) control (CON), composed of basal diet without inclusion of additives; 2) Functional oil (FO) with addition of 500 mg/kg DM (Essential® Oligo Basics) and 3) monensin (MON) with addition of 18 mg/kg DM. There was no effect ($P>0.05$) of treatments on dry matter and nutrients intake (kg/day), digestibility and intake as percentage of body weight. The inclusion of functional oil or monensin in the diet did not affect ($P>0.05$) pH, ammonia, acetate and butyrate concentrations and acetate: propionate ratio in the rumen. However, the inclusions of functional oil or monensin increased ($P<0.05$) the concentration of ruminal propionate. In addition, functional oil treatment increased ($P<0.05$) total concentration of branched chain fatty acids. The cows fed diets with oil or functional monensin increased ($P<0.05$) the milk yield of dairy cows, but cows fed diets with monensin had lower ($P<0.05$) milk fat content. The addition of functional oil in the diet also reduced ($P<0.05$) the concentration of blood urea. The microbial protein synthesis, and energy and nitrogen balances were not affected by treatments ($P>0.05$). Inclusion of functional oil or monensin in the diets increased milk yield and concentration of ruminal propionate without changing intake and digestibility of dry matter and nutrients.

Key Words: antimicrobial, productive performance, monensin, functional oil

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AGCC	ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA
AGCCT	ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA TOTAL
AGCR	ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA RAMIFICADA
AGCRT	ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA RAMIFICADA TOTAL
AST	ASPARTATO AMINOTRANSFERASE
CMS	CONSUMO DE MATÉRIA SECA
CNF	CARBOIDRATO NÃO FIBROSO
EE	EXTRATO ETÉREO
EL	ENERGIA LÍQUIDA
ELI	ENERGIA LÍQUIDA DE LACTAÇÃO
ELm	ENERGIA LÍQUIDA DE MANTENÇA
ELG	ENERGIA LÍQUIDA DE GANHO
EPM	ERRO PADRÃO DA MÉDIA
FDN	FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO
GGT	GAMA GLUTAMIL TRANSFERASE
LPBL	LABORATÓRIO DE PESQUISA EM BOVINOS DE LEITE
MO	MATÉRIA ORGÂNICA
MM	MATÉRIA MINERAL
MS	MATÉRIA SECA
MON	MONENSINA SÓDICA
N	NITROGÊNIO
NDT	NUTRIENTES DIGESTÍVEIS TOTAIS
NH ₃	AMÔNIA
N-NH ₃	NITROGÊNIO AMONIACAL
OF	ÓLEO FUNCIONAL
PB	PROTEÍNA BRUTA
PIDA	PROTEÍNA INSOLÚVEL EM DETERGENTE ÁCIDO
PIDN	PROTEÍNA INSOLÚVEL EM DETERGENTE NEUTRO
PV	PESO VIVO
SPM	SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição bromatológica de ingredientes.....	25
Tabela 2 – Composição percentual da dieta basal e do concentrado	26
Tabela 3 – Efeito do óleo funcional sobre consumo e digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes de vacas leiteiras.	34
Tabela 4 – Efeito do óleo funcional sobre a fermentação ruminal de vacas leiteiras.	35
Tabela 5 – Efeito do óleo funcional sobre a síntese de proteína microbiana de vacas leiteiras.....	39
Tabela 6 – Efeito do óleo funcional sobre parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras	40
Tabela 7 – Efeito do óleo funcional sobre produção e composição do leite de vacas leiteiras.....	41
Tabela 8 – Efeito do óleo funcional sobre o balanço de nitrogênio de vacas leiteiras	42
Tabela 9 – Efeito do óleo funcional sobre o balanço de energia de vacas leiteiras ..	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Efeito do óleo funcional sobre o pH ruminal de vacas leiteiras, em diferentes tempos após fornecimento da alimentação matinal.	36
Figura 2 – Efeito do óleo funcional sobre concentração de N-NH ₃ ruminal de vacas leiteiras, em diferentes tempos após fornecimento da alimentação matinal.	36
Figura 3 – Efeito do óleo funcional sobre concentração ruminal de acetato mmol/L de vacas leiteiras, em diferentes tempos após fornecimento da alimentação matinal....	37
Figura 4 – Efeito do óleo funcional sobre concentração ruminal de propionato mmol/L de vacas leiteiras, em diferentes tempos após fornecimento da alimentação matinal.	37
Figura 5 – Efeito do óleo funcional sobre concentração ruminal de butirato mmol/L de vacas leiteiras, em diferentes tempos após fornecimento da alimentação matinal. ..	38
Figura 6 – Efeito do óleo funcional sobre concentração ruminal de AGCRT mmol/L de vacas leiteiras, em diferentes tempos após fornecimento da alimentação matinal. ..	38

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da população mundial e do consumo alimentar médio em decorrência do desenvolvimento econômico de países em desenvolvimento, tem se observado uma crescente demanda por alimentos. O leite, como alimento básico para alimentação humana e matéria-prima para produção de uma grande variedade de produtos, não foge a esta regra. Em 2015, a produção mundial de leite chegou a 805 milhões de toneladas (FAO, 2015).

O fornecimento de alimentos concentrados aumenta a quantidade de carboidratos não estruturais e, conseqüentemente, o teor energético da dieta, tal alternativa é utilizada para maximizar o desempenho produtivo dos ruminantes. No entanto, dietas ricas em concentrado podem alterar a fermentação ruminal e reduzir o pH do rúmen, situação que pode comprometer a digestibilidade da fibra e aumentar os riscos de transtornos metabólicos (VASCONCELOS et al., 2008).

Aditivos têm sido avaliados com o intuito de modular a fermentação ruminal e assim melhorar o desempenho do animal. Na década de 70, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso de antimicrobianos ionóforos nos Estados Unidos. Da mesma forma, países como Brasil, Austrália, Nova Zelândia e Canadá liberaram o uso destes produtos na alimentação de bovinos (NRC, 2001). Dentre os antimicrobianos, o ionóforo monensina sódica, desenvolvido inicialmente para ser usado como anticoccidiostático na alimentação de frangos (RICHARDSON et al., 1976), demonstrou maior potencial para ser utilizado na alimentação de ruminantes, com capacidade de alterar a fermentação ruminal destes animais (RUSSELL; STROBEL 1989). Segundo Thornton e Owens (1981), a monensina sódica aumenta a proporção molar de propionato ruminal. Além disso, há redução da degradação da proteína em amônia (DINIUS et al., 1976) e elevação do potencial de hidrogênio (pH) ruminal.

A União Europeia com base no princípio da precaução proibiu o uso de antibióticos promotores de crescimento na dieta de ruminantes. Diante disso, a busca por produtos naturais como alternativas aos antimicrobianos foi intensificada e atualmente o interesse no uso de compostos “naturais”, como os óleos funcionais têm aumentado na nutrição animal, especialmente na nutrição de ruminantes, tem

aumentado. A ênfase maior tem sido dada na modificação do padrão de fermentação ruminal e do metabolismo a fim de melhorar o desempenho animal e reduzir o impacto no meio ambiente. A complexidade estrutural e diversidade de plantas, entretanto, é um fator limitante no progresso de pesquisa nesta área do conhecimento (TEDESCHI et al., 2011).

A maioria dos dados disponíveis na literatura sobre óleos funcionais para ruminantes advém de estudos *in vitro* (MCINTOSH et al., 2003; NEWBOLD et al., 2004; CASTILLEJOS et al., 2005). No entanto, alguns estudos *in vivo* já foram realizados para avaliar a eficácia de óleos funcionais em manipular fermentação ruminal e melhorar a utilização de nutrientes e o desempenho de vacas leiteiras (BENCHAAR et al., 2006; BENCHAAR et al., 2008a; BENCHAAR; CHOUINARD, 2009).

Como resultado, de modo geral, tais estudos apontaram que óleos funcionais apresentam potencial para serem utilizados como aditivos alimentares modulares da fermentação ruminal e substitutos dos ionóforos nas dietas de vacas leiteiras, sem comprometer o desempenho animal.

2. HIPÓTESE e OBJETIVOS

A hipótese científica deste trabalho é que a utilização do óleo funcional (Essential® Oligo Basics), em dietas de vacas leiteiras melhora o padrão de fermentação ruminal e aumenta a produção de leite sem alterações no consumo e na digestibilidade dos nutrientes.

O presente estudo foi conduzido com objetivo de avaliar a inclusão do óleo funcional na dieta de vacas em lactação sobre o consumo e digestibilidade aparente total da matéria seca e nutrientes, fermentação ruminal, produção e composição do leite, síntese de proteína microbiana, balanço de nitrogênio e de energia.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Há muitos anos é conhecida a capacidade de ruminantes de converter material fibroso de plantas em alimentos nobres, como leite e carne. Durante muito tempo

vacas leiteiras obtinham grande parte dos nutrientes somente pelo consumo de forragem, deste modo, a produção por vaca era baixa e, conseqüentemente, a produção de leite era pouco explorada. No entanto, o cenário atual da seleção genética, manejo e nutrição têm elevado consideravelmente o desempenho animal (VANDEHAAR; ST-PIERRE, 2006). Neste sentido, o conhecimento de estratégias nutricionais para atender as exigências de vacas cada vez mais produtivas, de forma sustentável e econômica é um dos principais desafios dos profissionais envolvidos nesta cadeia produtiva.

Aplicar estratégias nutricionais na alimentação de ruminantes normalmente envolve o uso de tecnologias que permitam modular a fermentação ruminal, já que este é o principal local de digestão de nutrientes. Das altas exigências em energia e proteínas de vacas leiteiras, mais da metade são atendidas pela atividade dos microorganismos ruminais com a produção de ácidos graxos de cadeia curta e pelo fluxo de proteína microbiana para o duodeno.

Neste sentido, o processo de fermentação ruminal desempenha um papel importante na nutrição de ruminantes, pela relação simbiótica entre animal e microrganismos do rúmen, os quais fornecem aos ruminantes diversas vantagens nos processos digestivos e metabólicos (KOZLOSKI, 2011). O grau de complexidade das interações entre os diversos grupos de microrganismos que habitam o rúmen é tal que, ainda hoje, são desconhecidas algumas vias e a atuação dos microrganismos envolvidos. Apesar dos resultados de décadas de pesquisas sobre o metabolismo e a microbiologia do rúmen, ambos ainda são extensivamente estudados (KOZLOSKI, 2011; KAMRA, 2005). A possibilidade de entender e controlar alguns dos processos metabólicos do rúmen com o objetivo de atingir maior eficiência de utilização dos nutrientes é um conceito de grande relevância para nutricionistas e microbiologistas do rúmen.

Com base nessa possibilidade de modular a fermentação ruminal, o emprego de determinadas substâncias aditivas nas dietas, com destaque para os antibióticos ionóforos, é uma prática convencional na alimentação de ruminantes, cujo mecanismo de ação e os benefícios da sua utilização foram extensivamente estudados e elucidados. Porém, quando se trata da utilização de aditivos alternativos nas dietas, como os óleos essenciais, falta informações de pesquisas.

3.1. Óleo Funcional

Cresce a importância da segurança alimentar como atributo decisivo no momento da compra, com aumento da demanda por produtos sem o uso de antibióticos no sistema de produção animal e produzidos sob preceitos ambientais. Diante destas questões econômicas e de saúde pública, existe um crescente interesse científico por alternativas aos ionóforos antimicrobianos, e dentre as diversas opções, os compostos de plantas como os óleos essenciais têm grande potencial a ser explorado, visto sua reconhecida atividade antimicrobiana.

Os óleos essenciais são classificados como metabólitos secundários de plantas, responsáveis pelo odor e cor característico das mesmas. Podem ser extraídos de diversas partes, como raízes, colmos, casca, folhas, flores, sementes (KOHLERT et al., 2005). São caracterizados quimicamente como misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, os quais podem gerar sabores e/ou aromas. Não se misturam à água e podem ser extraídos de diferentes modos, como destilação a vapor, CO₂ supercrítico ou com utilização de solventes orgânicos (CALSAMIGLIA et al., 2007).

Óleos essenciais contêm dois grandes grupos químicos, terpenóides e fenilpropanóides, que apresentam mecanismos de ação antimicrobiana diferentes, dependendo da interação com a membrana celular (DAVIDSON; NAIDU, 2000; DORMAN; DEANS, 2000; BENCHAAR et al., 2008b).

Vários óleos essenciais com diferentes princípios ativos já possuem sua funcionalidade conhecida e os métodos para extração destes óleos são de fácil execução, tais como timol (extraído do tomilho – *Thymus vulgaris*), carvacrol (extraído do orégano – *Origanum sativum*), alina e alicina (extraído do alho – *Allium sativum*), citrol e citronolol (extraído de diversas plantas cítricas), mentol (extraído da menta – *Mentha piperita*), cinamaldeído (extraído da canela – *Cinnamomum zeylanicum*), o limoneno extraído da polpa cítrica) e o guaicol (extraído da resina do guáiaico ou óleo de cravo-da-índia) (VELLUTI et al., 2003; CASTILLEJOS et al., 2005). Outras plantas, como a canela, o alecrim, gengibre, coentro, eucalipto e pimenta e seus respectivos compostos possuem potencial para serem utilizados como moduladores da fermentação ruminal (BENCHAAR et al., 2008b).

Na planta estes metabólitos exercem atividade de proteção ao ataque dos fungos, bactérias e insetos. Esses mesmos óleos essenciais de plantas podem ser utilizados como aditivos alimentares, sendo definidos como óleos funcionais, cujos compostos podem ser incluídos diretamente na dieta de ruminantes ou pelos extratos retirados industrialmente (MORAIS et al., 2011). Esta classe de aditivo normalmente exercem um efeito antimicrobiano que pode alterar o crescimento e o metabolismo de diversas bactérias, incluindo bactérias presentes no rúmen. Como consequência, estes aditivos podem alterar a fermentação ruminal (VELLUTI et al., 2003; WALLACE, 2004).

3.2. Composição do óleo funcional

Conforme apresentado anteriormente, existem diversos óleos essenciais que apresentam potencial atividade sobre os microrganismos do rúmen. Langhout (2000) relata que os melhores resultados são obtidos quando óleos essenciais são utilizados em combinação de diferentes compostos de plantas. Dentre estas, pode se destacar a combinação dos compostos ácido anacárdico, cardol e cardanol (óleo da casca da castanha de caju) e ácido ricinoleico (óleo de mamona), os quais são utilizados de forma conjunta como óleo funcional (Essential® Oligo Basics) na nutrição de ruminantes.

O óleo da casca da castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.) é obtido de uma árvore nativa do Brasil que pode ser encontrada em quase todo território nacional, sendo o nordeste a região com maior área cultivada, com a maior produção nacional. Esta planta é também cultivada no leste da África e Índia, maior produtor mundial de castanha de caju e responsável por 50% das exportações mundiais do produto (PUREVJAV, 2011).

Existem duas formas de extração do óleo presente na casca da castanha de caju: a frio ou a quente. Extração a frio pode ser realizada pelo método de prensagem, com solventes ou extração supercrítica com dióxido de carbono (CO₂) é um solvente para extração comumente usado, pois reúne condições ideais de solvente, o qual é inerte, atóxico, de baixo custo e de fácil separação do produto extraído. A extração a

quente é o processo térmico mecânico em que a castanha de caju sofre ropimento da casca com liberação de alquifenóis presentes no mesocarpo (MARSIGLIO, 2012).

O óleo da casca da castanha de caju é considerado uma fonte natural de lipídeos fenólicos, composto por 65% de ácido anacárdico e o restante se divide em, cardanol, cardol, e as estruturas fenóis (HAMAD; MUBOFU, 2015).

O óleo de mamona (*Ricinus communis* L.), é extraído de uma planta que pertence à família Euphorbiaceae, que engloba um grande número de plantas nativas de regiões tropicais. De origem africana, a mamona foi introduzida no Brasil pelos portugueses durante a colonização. É uma planta de hábito arbustivo, com diversas colorações de caule, folhas e racemos (cachos), podendo ou não possuir cera no caule e pecíolo. A mamona apresenta entre 39,6-59,5% de óleo na semente (MACHADO et al., 2006).

O cultivo da mamona tem grande importância econômica e social principalmente para os estados do Nordeste, pela capacidade de produzir em condições de baixa precipitação pluviométrica e tem bom mercado consumidor (BELTRÃO et al., 2003). Segundo Severino et al. (2006), o Nordeste é responsável por mais de 90% da produção nacional. Seu óleo, é obtido por prensagem das sementes, contém cerca de 90% de ácido ricinoleico, o que confere ao óleo características únicas e permite uma ampla utilização na indústria (FERREIRA et al., 2002).

Há relatos sobre a presença de princípios tóxicos e alergênicos presentes na planta como um todo da mamona. Tokarnia et al. (1975) relatam com base na sintomatologia observada nos bovinos em experimento com folhas da mamona, que o princípio tóxico é diferente da ricina (responsável pela toxidade das sementes) que causa um quadro de distúrbio gastrointestinal.

A ricina é uma potente toxalbumina, quimicamente uma proteína que ocorre no endosperma da semente da mamona, a qual é totalmente ausente em outras partes da planta mamoneira (FREIRE, 2001). Esta toxina é insolúvel em óleo, com seu principal mecanismo de ação no organismo de aglutinar células vermelhas, seguida por hemólise intensa. Os animais domésticos apresentam diferentes graus de sensibilidade a ricina. Em geral a dose letal para mamíferos é de 150 a 200 mg/kg de peso corporal. Um aspecto interessante da ricina é sua capacidade de induzir

imunidade quando administrada repetidas vezes em doses reduzidas com intervalo de tempo (AFONSO; POTT, 2001).

Óleos funcionais têm sido estudados, entretanto há poucos trabalhos com ácido ricinoleico (óleo de mamona) e ácido anacárdico, cardol e cardanol (óleo da casca da castanha de caju), mas recentes estudos tem sido realizados com a associação destes compostos como produto comercial óleo funcional (Essential® Oligo Basics).

3.3. Estudos de fermentação ruminal *in vitro* com óleos essenciais

Pioneiros no estudo dos efeitos dos óleos essenciais *in vitro* sobre fermentação ruminal, Crane et al. (1957) relataram que limoneno e pineno foram eficazes em inibir a produção de metano.

Devido à presença de lipídios fenólicos com atividade antimicrobiana na composição do óleo da casca da castanha de caju, o ácido anacárdico, cardanol e o cardol, os mesmos podem causar mudanças no ecossistema ruminal, característica que o torna um eficiente modificador da fermentação ruminal (CORREIA et al., 2006; WATANABE et al., 2010). Após avaliarem a atividade antibacteriana do óleo da casca da castanha de caju *in vitro*, os pesquisadores relatam que as bactérias gram positivas (*Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Propionibacterium acnes*) são sensíveis aos componentes deste óleo essencial, enquanto que as gram negativas são resistentes (HIMEJIMA; KUBO 1991; PARASA et al., 2011). Da mesma maneira, Kubo et al. (1993) e Watanabe et al. (2010) observaram que o óleo da casca da castanha de caju atua principalmente contra bactérias gram positivas presentes no rúmen como *Streptococcus bovis*, *Eubacterium ruminantium*, *Lactobacillus ruminis*.

A redução do número de bactérias gram positivas induzidas pelo óleo da casca da castanha de caju, pode indiretamente promover o crescimento de bactérias gram negativas (resistentes a este óleo funcional), tais como *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Selenomonas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii*, envolvidas na produção de propionato (WATANABE et al., 2010). Portanto, o óleo da casca da castanha de caju ao induzir mudanças nas espécies bacterianas do rúmen melhora a eficiência da fermentação ruminal, o que significa na prática, aumentar a produção de propionato e reduzir a metanogênese (WATANABE et al., 2010).

Himejima e Kubo (1991) isolaram 16 compostos fenólicos a partir do óleo da casca da castanha de caju e observaram extensa atividade antimicrobiana sobre microrganismos. Entre esses compostos fenólicos o ácido anacárdio apresentou a maior atividade inibitória de bactérias gram positivas. Por outro lado o cardanol possui atividade tanto anti-inflamatória como antioxidante.

Marino et al. (2013) verificaram que a adição de 120 mg/L da mistura de extratos de casca de castanha de caju e óleo de mamona aumentou linearmente acetato, propionato e ácidos graxos voláteis totais sem qualquer efeito na digestibilidade *in vitro* ou produção de metano.

Por outro lado, em pesquisa *in vitro* com outro óleo essencial, o eugenol, Castillejos et al. (2005) observaram aumento da concentração total de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), mas não obtiveram mudança na proporção molar individual de AGCC, quando adicionaram dose de 1,5 mg/L de líquido ruminal em fermentadores de cultura contínua. Com a mesma técnica de fermentador de cultura contínua, Castillejos et al. (2006) relataram que 500 mg/L de timol reduziu a concentração de AGCC e a proporção molar de acetato:propionato, que não foi afetada nas concentrações de 5 e 50 mg/L.

McIntosh et al. (2003) observaram em estudo *in vitro* maior redução da taxa de produção de NH_3 quando a monensina sódica foi adicionada no líquido ruminal incubado, mas relataram que uso de óleo essencial também reduz a produção de NH_3 pela inibição da atividade do mesmo grupo de bactérias que são sensíveis a monensina sódica. Este grupo de bactérias, conhecidas como “hyper-ammonia-producing”, é caracterizado por apresentar alta atividade deaminativa e por ser responsável pela significativa proporção de amônia produzida no rúmen (RUSSELL et al., 1988). Em trabalho com uso da técnica de isolamento, foram identificadas duas bactérias, *Streptococcus* spp. e *Clostridium* spp., que produziam de 18 a 39 vezes mais amônia do que outras espécies ruminais conhecidas (RUSSELL et al., 1988). Ambas são gram positivas e requerem aminoácidos como fonte de crescimento (MCGUFFEY et al., 2001).

Resultados de pesquisas mostram que os efeitos dos óleos essenciais sobre a fermentação ruminal podem desaparecer ao longo do tempo (CARDOZO et al., 2004). Em sistema *in vitro* de fluxo contínuo, os óleos de canela, alho e anis (7,5 mg/kg MS

ou 0,22 mg/L) foram capazes de alterar o perfil de AGCC durante os seis primeiros dias de incubação, porém não foi observado este efeito após esse período (CARDOZO et al., 2004). Da mesma forma, o óleo de alho (300 mg/L) alterou a fermentação ruminal *in vitro* em incubações de 24 horas (BUSQUET et al., 2005b), mas doses de óleo de alho semelhantes à anterior (312 mg/L) não apresentaram efeito em experimento de maior duração em sistema *in vitro* de fluxo contínuo (BUSQUET et al., 2005a).

A inibição da fermentação ruminal do ponto de vista nutricional é indesejável. Contudo, o desafio está justamente em encontrar doses capazes de manipular positivamente a fermentação ruminal com pouco ou nenhum efeito inibitório sobre esta. É importante enfatizar que, mesmo para a monensina sódica, é comum observar reduções na degradação e da concentração total de AGCC *in vitro* em função da dose utilizada (VAN NEVEL; DEMEYER, 1977; RUSSEL; STROBEL, 1989).

De maneira geral, óleos essenciais não alteram o pH ruminal (NEWBOLD et al., 2004; CASTILLEJOS et al., 2007). No entanto, em experimento *in vitro*, a inibição da fermentação ruminal por altas doses e a consequente redução na concentração total de AGCC causou aumento do pH (CASTILLEJOS et al., 2006).

Vários estudos verificaram ausência da influência dos óleos essenciais sobre o metabolismo protéico ruminal, seja em sistema *in vitro* de fluxo contínuo (CASTILLEJOS et al., 2005, 2007) ou *in vivo* com vacas no terço inicial e médio de lactação (BENCHAAR et al., 2006, 2007).

Pesquisas *in vitro* apresentam limitações, pois muitos dos resultados obtidos *in vitro* não se repetiram quando conduzidos estudos *in vivo*. Este fato pode ser atribuído principalmente à dificuldade de conseguir *in vivo* as doses efetivas determinadas *in vitro*, outra questão esta relacionado à adaptação microbiana ao longo do tempo (CALSAMIGLIA et al., 2007; BENCHAAR et al., 2008a).

Desse modo, uma das limitações dos óleos essenciais é a viabilidade prática em fornecer aos animais as doses determinadas *in vitro*. Óleos essenciais podem apresentar cheiro e gosto acentuados, o que pode dificultar a aceitação pelo animal, e as doses necessárias *in vivo* podem causar efeito indesejáveis sobre o consumo animal, ou até mesmo ser impraticáveis (VILLALBA; PROVENZA, 2010).

Apesar disso, é provável que as doses determinadas *in vitro* são superiores às necessárias *in vivo*, pois a concentração de bactérias é muito menor *in vitro* do que em condições naturais. A ação de um composto é função de sua capacidade de interagir com as bactérias. Por isso, quanto menor a população de microrganismos, maior a dose necessária para observar efeito (CALSAMIGLIA et al., 2007).

É evidente que a degradação dos compostos no rúmen, a adaptação microbiana, a taxa de passagem, a volatilização e absorção pela parede ruminal são responsáveis por parte importante das diferenças entre ensaios *in vitro* e *in vivo* (VILLALBA; PROVENZA, 2010). Desta forma, para conseguir efeitos fisiológicos almejados, estes fatores salientam a necessidade de doses mais elevadas.

Os óleos essenciais são substâncias de difícil padronização, pois variam a concentração de vários compostos ativos. Desta forma, é esperado que estudos com ruminantes apresentem resultados inconsistentes ou contraditórios, independente dos resultados positivos observados *in vitro*.

3.4. Estudo *in vivo* com óleos essenciais na nutrição de ruminantes

Coutinho et al. (2014) realizaram estudo com doses de 120; 240 e 360 mg/kg da MS do óleo da castanha de caju em vacas leiteiras, e não observaram efeito sobre consumo e digestibilidade de nutrientes, bem como na produção e composição do leite das vacas suplementadas em relação as que receberam a dieta controle. Ainda, a utilização deste aditivo resultou em mudança no perfil de ácidos graxos do leite, o qual apresentou efeito linear decrescente para o ácido capróico (C6:0), linear crescente para o ácido palmitoleico (C16:1n-7) e quadrático para o ácido tridecanoico (C13:1n-5).

Estudo com vacas secas alimentadas com a inclusão de óleo da castanha de caju na dieta, os autores não observaram efeito sobre a digestibilidade e consumo de nutrientes (SHINKAI et al., 2012). Quanto aos efeitos sobre a fermentação ruminal, estes autores verificaram redução na produção de metano e menor concentração molar de acetato, aumento na concentração e molar de propionato, assim como o verificado por Van Nevel et al. (1971) e Watanabe et al. (2010) em estudo *in vitro*. Ainda o uso deste aditivo não influenciou o pH ruminal e nem nas concentrações de

nitrogênio amoniacal e lactato e, houve aumento das bactérias produtoras de propionato, principalmente as *Prevotella ruminicola* (SHINKAI et al. 2012).

Benchaar et al. (2006) realizaram um estudo com a adição de óleo essencial mistura composta de óleo de timol, limoneno, e guaiacol (Crina® Ruminants; 0 vs 2 g/d) e de monensina sódica (0 vs 350 mg/dia) na dieta de vacas no terço médio de lactação encontraram aumento do pH ruminal para as vacas que receberam óleos essenciais (6,50 vs 6,39) e menor concentração de N-NH₃ no rúmen de vacas suplementadas com monensina sódica (12,7 vs 14,3 mg/100mL). Os autores não observaram efeito das dietas sobre concentração de AGCC total e proporção destes individualmente, sobre produção e composição do leite, digestibilidade aparente da MS, MO e FDN. Por outro lado, os autores relatam que vacas alimentadas com monensina sódica tiveram maior digestibilidade aparente total da proteína bruta (PB; 65,0 vs 63,6%) quando comparadas às não suplementados.

Em outro estudo com Crina® Ruminants, Benchaar et al. (2007) utilizaram doses de 0 e 750 mg/kg de Crina® Ruminants na dieta de vacas no início da lactação alimentadas com silagem de milho e alfafa. Os autores não observaram efeito do óleo essencial sobre a produção de leite (28,85 e 27,95 para óleo essencial e controle, respectivamente) o CMS, a concentração ruminal de nitrogênio amoniacal (N-NH₃), e consideraram tendência de aumento do pH ruminal (6,40) para as vacas que receberam óleo essencial em relação as vacas da dieta controle (6,30). No mesmo estudo, relataram redução da proporção molar de acetato e aumento de propionato quando a dieta a base de silagem de milho foi substituída por silagem de alfafa com redução da concentração de AGCC.

Vendramini (2015) conduziu um estudo com vacas no terço médio de lactação, alimentadas com silagem de milho e suplementadas com diferentes aditivos (monensina sódica na dose de 24 mg/kg da MS, Crina® Ruminants na dose de 1,2 g/animal/dia e quitosana na dose de 150 mg/kg do peso vivo). As vacas submetidas aos diferentes tratamentos não apresentaram efeito sobre a produção (31,26 kg/dia) e composição do leite e CMS. As vacas do tratamento Crina® Ruminants reduziram a excreção de N fecal (g/dia) em relação aos demais aditivos; a inclusão de monensina sódica e quitosana reduziram a concentração de acetato ruminal (mmol/L) comparado

a dieta controle; e o tratamento com monensina sódica aumentou o propionato ruminal comparado a dieta óleo essencial (30,67 vs 26,25 mmol/L, respectivamente).

Gandra et al. (2012) avaliaram doses crescentes de ácido ricinoleico (óleo de mamona) em novilhos (0, 1, 2 e 4 g/animal/dia) e observaram que ácido ricinoleico não alterou o CMS. Afirmaram também que o ácido ricinoleico tem um futuro promissor na nutrição de ruminantes como potencial modulador da fermentação ruminal e com possível aumento da performance produtiva de ruminantes. Gandra et al. (2014) conduziram um estudo com vacas no terço médio da lactação e adicionaram 0 e 2 g/animal/dia de ácido ricinoleico em dieta a base de silagem de milho e observaram aumento da produção e do teor de gordura do leite, mesmo com redução do CMS.

Coneglian (2009) avaliou a suplementação em novilhos com 1, 2, 4 e 8 g/dia de óleo funcional (Essential® Oligo Basics) ou 2 g/dia de monensina sódica na dieta com silagem de milho e relação volumoso concentrado 20:80. Não houve efeito das dietas avaliadas sobre o CMS, concentração de N-NH₃ ruminal, propionato, butirato e AGCC totais.

Jedlicka et al. (2009) avaliaram novilhos confinados suplementados com diferentes aditivos monensina sódica (223 mg/dia) e óleo funcional (Essential® Oligo Basics) em duas doses (250 e 500 mg/dia), além da associação destes dois aditivos e da dieta controle sem aditivo, não foi observado efeito das dietas sobre o CMS dos novilhos.

Devant et al. (2012) estudaram a utilização de 0,5 g do óleo funcional (Essential® Oligo Basics) por kg de concentrado para novilhos e observaram que animais suplementados com aditivos apresentaram aumento no consumo e ganho de peso. O aditivo ainda tendeu a melhorar a integridade da parede do rúmen e diminuir a prevalência de abscessos hepáticos. Purevjav et al. (2013) em estudos com novilhos Angus confinados alimentados com diferentes doses 250 mg/kg da MS e 500 mg/kg da MS de óleo funcional (Essential® Oligo Basics) e 223 mg/animal/dia de monensina sódica, não observaram diferença na prevalência de abscessos hepáticos dos novilhos que receberam a inclusão do óleo funcional em relação a dieta controle, mas os novilhos que tiveram a adição de monensina sódica na dieta apresentaram menor índice de abscessos hepáticos. Estes autores relataram também que a inclusão de

óleo funcional ou monensina sódica na dietas de novilhos confinados não alterou o consumo de matéria seca (CMS).

Valero et al. (2014) compararam o efeito do própolis e o óleo funcional (Essential® Oligo Basics) com novilhos mestiços Aberdeen Angus x Nelore e não observaram diferença sobre o CMS. Resultados diferentes foram obtidos por Silva (2014) ao comparar a inclusão de monensina sódica nas doses 30 e 40 mg/kg da MS e virginiamicina 25 mg/kg da MS mais monensina sódica 30 mg/kg da MS e óleo funcional Essential® Oligo Basics na dose de 400 mg/kg da MS, em bovinos da raça Nelore castrados em confinamento e com mudança abrupta da dieta, observou maior consumo nos novilhos que receberam o óleo funcional. Zawadzki (2013) encontrou maior consumo em bovinos confinados que tiveram inclusão de óleo funcional Essential® na dieta em relação aos novilhos da dieta controle, mas o consumo não diferiu em relação aos novilhos que tiveram parte do milho substituído por glicerina ou pela associação de glicerina e o óleo funcional Essential®.

Estudo conduzido com vacas no terço médio de lactação, alimentadas com 58% de silagem de milho e 42% de concentrado e com as seguintes dietas: controle sem aditivos; suplementada com 30 mg/kg da MS de monensina sódica; 0,5 g/kg da MS de óleo funcional (Essential® Oligo Basics) e uma mistura destes tratamentos. Os autores observaram que as vacas alimentadas com óleo funcional apresentaram aumento do CMS (15,3 vs 16,67 kg/dia) e as vacas que receberam o tratamento monensina reduziram o consumo (16,89 vs 15,57 kg/dia) quando comparados a dieta controle sem aditivo. Os autores relataram também que as vacas alimentadas com óleo funcional apresentaram aumento da produção de leite, proteína e gordura em kg/dia em relação as demais dietas. Já as vacas do tratamento monensina sódica não apresentaram efeito sobre a produção de leite, mas apresentaram redução da gordura em porcentagem e kg/dia, em relação as demais dietas (MARTINS et al., 2015).

Diante do exposto, vale ressaltar que o óleo funcional (Essential® Oligo Basics) é um aditivo com grande potencial para uso na dieta de ruminantes como modulador da fermentação ruminal, porém ainda existem poucos estudos na literatura para afirmar de maneira conclusiva seus efeitos. Segundo Benchaar et al. (2007), algumas questões precisam ser avaliadas, como por exemplo a interação do óleo essencial com o tipo de alimento, dose a ser incluída na dieta e o seu mecanismo de ação.

3.5. Mecanismo de ação proposto para óleos essenciais

Estudos indicam que os óleos essenciais possuem ação contra vários tipos de microrganismos, dentre eles bactérias, fungos e protozoários (BURT, 2004). A atividade antimicrobiana é atribuída a um número de terpenoides e compostos fenólicos (CHAO; YOUNG, 2000).

As ações estão em sua maioria associadas à membrana celular, como o transporte de elétrons e gradiente de íons, translocação de proteínas, fosforilação e reações dependente de enzimas (ULTEE et al., 1999; DORMAN; DEANS, 2000). Porém o exato mecanismos que proporciona aos óleos essenciais suas propriedades antimicrobianas não são bem compreendidos (LAMBERT et al., 2001).

A presença do grupo hidroxila nos compostos fenólicos é fundamental para a existência da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (ULTEE et al., 2002). Por isso, a estrutura química é a responsável pelo modo de ação e atividade antimicrobiana de cada óleo essencial (DORMAN; DEANS, 2000). Todavia, a posição da hidroxila no anel fenólico parece ser menos importante, já que o timol e o carvacrol apresentaram atividades semelhantes frente a variadas bactérias (ULTEE et al., 2002). Contudo, já foram constatadas diferenças na ação do timol e carvacrol contra espécies gram-positivas e gram-negativas (DORMAN; DEANS, 2000).

Em geral, os compostos fenólicos interagem com as proteínas por meio de pontes de hidrogênio e interações iônicas ou hidrofóbicas (PRESCOTT et al., 2004). Outro mecanismo existente é a redução da concentração interna de ATP sem aumento proporcional na concentração externa, o que transparece a ideia de menor síntese ou maior hidrólise do mesmo (ULTEE et al., 2002).

As ATPases são enzimas conhecidas por se localizarem na membrana citoplasmática, constituída por moléculas de lipídios. Os possíveis mecanismos de ação sugeridos podem ser divididos: 1) hidrocarbonetos lipofílicos podem se acumular na dupla camada de lipídios da membrana celular, o que pode alterar as interações entre proteínas e lipídios; 2) é possível que óleos essenciais possam interagir diretamente com os sítios hidrofóbicos das proteínas da membrana (JUVEN et al., 1994).

Acredita-se que óleos essenciais tem sua atuação em enzimas envolvidas nos processos de regulação de energia e de síntese de componentes estruturais. Como exemplo, o óleo de canela (cinamaldeído ou 3-fenil-2-propenal) e seus componentes foram eficientes em inibir a enzima aminoácido-descarboxilase de *Enterobacter aerogenes* (WENDAKOON; SAKAGUCHI, 1995). Diante disso, substâncias fenólicas como o cinamaldeído não são capazes de desintegrar a membrana externa ou causar depleção de ATP. Acredita-se que o grupo funcional carbonil (R1-CO-R2) possa ser o responsável por se ligar às proteínas, inibindo a ação da aminoácido-descarboxilase (WENDAKOON; SAKAGUCHI, 1995).

Ao levar em consideração a grande quantidade de substâncias químicas presentes nos óleos essenciais, é esperado que a atividade antimicrobiana não seja mediada por apenas um único mecanismo específico, pode haver sinergia entre os mecanismos de ação encontrados nos diversos metabólitos (CARSON et al., 2002; BAKKALI et al., 2008). A exemplo disso, a atividade antimicrobiana ruminal exercida pelo óleo de alho é mais potente do que a atividade de seus componentes isolados (BUSQUET et al., 2005a). Neste sentido, os efeitos aditivos ou antagônicos também são possíveis de ocorrer (BURT, 2004).

Óleos essenciais são substâncias hidrofóbicas, com capacidade de interagir com lipídios da membrana celular e das mitocôndrias das bactérias. Isto ocorre quando o óleo essencial está na forma indissociada (mais hidrofóbica), o que em condições ruminais é favorecido pelo baixo pH (CALSAMIGLIA et al., 2007). A hidrofobicidade está diretamente relacionada à ação antimicrobiana (CALSAMIGLIA et al., 2007).

A membrana celular quando interage com óleo essencial ocorre uma alteração da sua estrutura, tornando-as mais fluidas e permeáveis (SIKKEMA et al., 1995), como consequência há o extravasamento de íons e conteúdos citoplasmáticos (LAMBERT et al., 2001; CARSON et al., 2002). O carvacrol, um dos terpenos mais estudados no ambiente ruminal, é capaz de dissolver a dupla camada fosfolipídica da membrana celular. Tais mudanças promovem a formação de canais na membrana, pois os óleos essenciais são capazes de separar os ácidos graxos uns dos outros. Estas distorções na estrutura física da membrana causam expansão e instabilidade, aumenta a fluidez e a permeabilidade passiva (ULTEE et al., 2002).

Segundo Burt (2004) compostos que contêm grupo hidroxila interagem com as proteínas da membrana celular da bactéria, o que leva à ruptura e morte desta. Ainda, as características dos ácidos graxos, como número de carbonos, comprimento da cadeia e tipos de ligação estão envolvidos com a atividade antimicrobiana e antifúngica. Novak et al. (1961) verificaram que o ácido ricinoleico inibiu o crescimento da bactéria gram positiva *Micrococcus pyogenes* e fungos *Alternaria* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp.

Os óleos essenciais são mais efetivos contra bactérias gram positivas, na qual a membrana celular interage diretamente com componentes hidrofóbicos do óleo essencial (SMITH-PALMER et al., 1998; CHAO; YOUNG, 2000; CIMANGA et al., 2002; BURT, 2004), embora em menor expressão seus efeitos sobre as gram negativas também são relatados (GRIFFIN et al., 1999).

A camada externa das gram negativas é rica em lipopolissacarídeos, o que promove proteção extra contra várias substâncias (RUSSELL, 2002), incluindo óleos essenciais e ionóforos. Naik et al. (2010) demonstraram que bactérias gram positivas foram mais sensíveis ao óleo essencial de capim cidreira do que as gram negativas.

A membrana externa das bactérias gram negativas confere apenas proteção parcial, pois não é totalmente impermeável a compostos hidrofóbicos. Substâncias como o carvacrol e timol tem baixo peso molecular e podem interagir com a água via pontes de hidrogênio e por difusão, essas substâncias passam pela parede externa através dos lipopolissacarídeos ou proteínas da membrana, chegando à dupla camada fosfolipídica da parede celular interna da bactéria gram negativa (GRIFFIN et al., 1999). Este é um dos principais fatores que conferem ao carvacrol uma potente atividade antimicrobiana. Ao observar os efeitos de alguns óleos essenciais sobre bactérias gram negativas representa uma limitação, pois esta característica reduz a seletividade e aumenta a dificuldade de manipulação da fermentação ruminal (CALSAMIGLIA et al., 2007).

O ácido anacárdico, cardanol, cardol são os principais compostos do óleo da casca da castanha do caju, são alquil fenóis poli-insaturados, sendo os grandes responsáveis pela ação antimicrobiana, com mecanismo de ação semelhante aos ionóforos (NAGABHUSHANA et al., 1995) e antimicrobiana (HEMSHEKHAR et al., 2011). Esta atividade antimicrobiana ocorre principalmente sobre bactérias gram

positivas *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus* (LIMA et al., 2000; KUBO et al., 2003; MUROI et al., 2004). O composto em maior quantidade no óleo da casca da castanha de caju é o cardanol, que tem atividades anti-inflamatória e antioxidante (AMORATTI et al., 2001; TREVISAN et al., 2006).

3.6. Ionóforo monensina sódica na alimentação de bovinos

Após a Segunda Guerra Mundial, antibióticos produzidos para fins militares foram testados como aditivos na alimentação de aves e levaram a um aumento no desempenho produtivo (STOKSTAD; JUKES, 1950). Destes, destacaram-se os ionóforos, que são produtos da fermentação de actinomicetos, produzidos principalmente pelas bactérias do grupo *Streptomyces sp*, em especial pelo *Streptomyces cinnamonensis* (RICHARDSON et al., 1976). Atualmente existem diversos tipos de ionóforos, como monensina sódica, salinomicina, narasina, tetronasina, lisocelina, lasalocida, dianemicim, laidlomocina, nigercim e gramicidim. Entretanto, monensina sódica, lasalocida, narasina e salinomicina, têm sido os mais utilizados na produção animal e nas pesquisas, demonstrando benefícios como o controle da acidose ruminal clínica e subclínica (MCGUFFEY et al., 2001; TEDESCHI et al., 2011).

Na década de 1970 foi aprovado o uso do antibiótico ionóforo como aditivo alimentar para ruminantes. Apesar da monensina sódica ser inicialmente desenvolvida como anticoccidiostático na produção de aves (RUSSELL; STROBEL, 1989), estudos demonstraram que quando utilizada na alimentação de ruminantes, pode melhorar a eficiência alimentar pela alteração dos parâmetros de fermentação ruminal (RICHARDSON et al., 1976).

Em relação ao metabolismo de N, vacas que recebem ionóforos na dieta podem apresentar melhor desempenho produtivo, pois ocorre uma redução da degradação de proteína devido à seleção das bactérias fermentadoras de aminoácidos no rúmen (RUSSELL, 1988). Outros autores sugerem que a monensina sódica apresenta maior efeito sobre deaminação do que na proteólise da proteína ruminal (CHEN; RUSSELL, 1989; CHEN; RUSSELL, 1991).

Gandra et al. (2012) conduziu um estudo com vacas no terço médio da lactação, alimentadas com silagem de milho e doses crescentes de monensina sódica nas dietas (0, 24 e 48 mg/kg da MS) e observaram redução linear do CMS e resposta quadrática sobre produção de leite, e observaram uma maior eficiência produtiva quando a dose utilizada foi de 24 mg/kg de matéria seca da dieta.

A dose de monensina sódica para vacas leiteiras nas diferentes fases da lactação e alimentadas com diferentes tipos de volumosos pode variar em até 48 mg/kg da MS (GALLARDO et al., 2005; OELKER et al., 2009; GRAINGER et al., 2010; GANDRA, et al., 2012). Doses superiores a estas não são recomendadas, pois podem causar redução no desempenho produtivo (PLAIZIER et al., 2000).

Duffield et al. (2008b), em estudo metanalítico, observaram que o uso de monensina sódica em vacas leiteiras reduz em 0,3 kg/dia o CMS e em 0,13% o teor de gordura no leite. Porém, observaram também aumento de 0,7 kg/dia na produção de leite e 2,5% de melhora na eficiência alimentar. De acordo com estes autores, os estudos apresentavam significativa heterogeneidade para estas respostas. Ipharraguerre e Clark (2003) revisaram 14 experimentos com dose igual ou menor que 350 mg/animal/dia ionóforos e também observaram redução de 0,3 kg/dia no CMS, que representa 1,5% a menos do CMS comparado as vacas da dieta controle e aumento na produção de leite de 0,7 e 1,5 kg de leite/dia para dietas de baixa e alta forragem, respectivamente.

Phipps et al. (2000) conduziram um experimento com vacas leiteiras no terço médio de lactação, alimentadas com silagem de capim e com inclusão de monensina sódica nas doses 0; 150; 300; e 450 mg/animal/dia. Não observaram efeito das vacas que receberam as diferentes dietas sobre a produção de leite (25,0; 27,8; 27,5 e 26,5 kg/dia, respectivamente), porém relataram que houve redução do conteúdo de gordura de 3,90; 3,58; 3,44 e 3,44% respectivamente.

Ghorbani et al. (2011) avaliaram a utilização de monensina sódica (0 e 350 mg/animal/dia) na dieta, contendo diferentes teores de PB (19,5; 21,4 e 23,4% da MS) para vacas no início de lactação e não observaram efeito sobre o CMS. As vacas apresentaram aumento da digestibilidade da FDN, FDA e PB com o aumento da inclusão de PB na dieta.

Acredita-se que a melhora da digestibilidade da proteína bruta com a utilização de ionóforos esteja relacionada com sua menor taxa de deaminação (RUSSELL; STROBEL, 1988). Dessa forma, peptídeos e aminoácidos podem ser convertidos em proteína microbiana por cepas bacterianas resistentes aos ionóforos (YANG; RUSSELL, 1993) e com melhor aproveitamento da proteína (RODRIGUES et al., 2001). Schelling (1984) relatou que o fato de haver maiores quantidades de proteína metabolizável pode maximizar a utilização de nitrogênio pelas bactérias.

3.7. Mecanismo de ação dos antibióticos ionóforos

Os inóforos são ácidos orgânicos com pKa que varia de 6,4 a 6,6, pouco solúveis em solução aquosa, cujo exterior da molécula é hidrofóbica, porém, são solúveis em solventes orgânicos e são altamente lipofílicos, também apresentam toxicidade às bactérias, protozoários e fungos e, geralmente, apresentam peso molecular de 500 a 2000 Dáltons (CORAH, 1991). Os ionóforos apresentam grande efetividade contra bactérias gram positivas, no entanto, têm pouca ação sobre bactérias gram negativas, que possuem uma membrana externa com porinas (canais de proteína) de tamanho limite cerca de 600 daltons. (NAGARAJA et al., 1997). De acordo com Russell e Wallace (1997), bactérias gram positivas não apresentam esta membrana externa.

O modo de ação dos ionóforos resulta na diminuição das bactérias ruminais gram positivas, com diversos impactos sobre o metabolismo dos ruminantes, incluindo a melhora do metabolismo energético e proteico. O aumento da participação de bactérias gram negativas no rúmen altera os produtos finais da fermentação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) pelo aumento da produção do propionato e redução da proporção molar de acetato. O propionato pode ser utilizado para gliconeogênese no fígado ou ser diretamente oxidado no ciclo de Krebs (DUFFIELD et al., 2008a).

As bactérias gram positivas são mais sensíveis aos ionóforos, porque estes são lipofílicos e alteram atividade de membrana. A camada de peptideoglicano que reveste bactérias gram positivas é porosa e permite que pequenas moléculas como ionóforos cheguem até membrana do citoplasma, onde é rapidamente dissolvido. Por outro lado, bactérias gram negativas apresentam na sua membrana externa uma camada de

lipopolissacarídeo que confere resistência às gram negativas, sendo assim menos afetadas pelos ionóforos (CALLAWAY et al., 2003).

A movimentação através das membranas biológicas é alterada, pois a monensina sódica, solúvel em lipídeos, desloca os íons carregados por facilitar o movimento dos mesmos através da membrana, formada por uma dupla camada de lipídeos (MCGUFFEY et al., 2001). Os mesmos autores citam que o cátion sódio (Na^+) está em maior concentração no meio extracelular (aproximadamente quatro a cinco vezes em relação ao potássio (K^+), por outro lado, Russell e Strobel (1989) relatam que no meio intracelular o K^+ é o cátion predominante.

Além da alta afinidade de Na^+ pela monensina sódica, esta poderá translocar K^+ e íons de hidrogênio (H^+). Portanto, quando a monensina sódica se liga a membrana celular, a primeira reação que pode ocorrer é o movimento de K^+ para fora e de Na^+ para dentro da célula pela diferença no gradiente de concentração. Após isso, pode ocorrer a segunda reação na qual a monensina sódica transloca Na^+ para dentro e H^+ para fora da célula (RUSSELL, 1987; NEWBOLD et al., 2013).

Normalmente a primeira reação ocorre em maior taxa em relação à segunda, pois para que ocorra a segunda reação é necessário que alguma molécula de monensina sódica se dissocie da célula. Deste modo, há o acúmulo de H^+ dentro da célula que causa redução do pH intracelular. Consequentemente, a célula exporta H^+ para fora e Na^+ para dentro da célula. Para manter o pH interno adequado, as bactérias do rúmen exportam H^+ acumulado dentro da célula através das bombas de sódio potássio ATPase e/ou próton ATPase, com gasto de energia neste processo (BAGG, 1997).

3.8. Fermentação ruminal

A fermentação dos ruminantes ocorre pela ação de bactérias presente no rúmen, as quais convertem os componentes dietéticos a ácidos graxos de cadeia curta, proteína microbiana, vitaminas, metano e dióxido de carbono, amônia, nitrato, etc (OWENS; GOETSCH, 1993).

A fermentação ruminal realizada pelos ruminantes lhes confere grande vantagem no aproveitamento de material fibroso em função da capacidade da microbiota ruminal de digerir componentes fibrosos, configurando-se como um dos

principais exemplos da natureza com tal capacidade. No entanto, a fermentação ruminal pode ser energeticamente ineficiente, pois parte considerável da dieta é convertida em metano e calor, não sendo utilizados pelo animal (CALLAWAY et al., 2003).

Para reduzir perdas no processo de fermentação ruminal e consequentemente melhorar o desempenho produtivo de ruminantes, é necessário atentar para as interações que existem entre o animal e o processo digestivo, com objetivo de maximizar a utilização dos nutrientes e consequentemente minimizarem custos produtivos.

Na nutrição de ruminantes, os carboidratos da dieta são fermentados pelos microrganismos do rúmen a AGCC e biomassa microbiana, que fornecem a maior parte da energia e proteína necessárias pelo animal (OWENS, 1988; STEWART; BRYANT, 1988). A produção da proteína microbiana é realizada pelos microrganismos presente no rúmen a partir das fontes de energia fermentável dos alimentos (aminoácidos, peptídios ou amônia) degradados no rúmen (VAN SOEST, 1994). Quando a disponibilidade de carboidratos é limitada, a fermentação da proteína dietética pode produzir um excesso de amônia que excede a capacidade de utilização dos microrganismos do rúmen e esta é excretada na forma de ureia principalmente pela via urinária (CHALUPA, 1976).

Thornton e Owens (1981), afirmaram que a monensina sódica reduz a relação entre as concentrações de acetato e propionato (C2:C3) com aumento da proporção molar de propionato, redução da proporção molar de acetato e da produção de metano, além de reduzir a degradação ruminal da proteína (DINIUS et al., 1976; RUSSELL; STROBEL, 1989; MARTIN et al., 2009). Vacas submetidas à acidose ruminal e tratadas com ionóforos mantiveram pH ruminal mais elevado e reduzida concentração de lactato quando comparadas às vacas que não recebem tal antimicrobiano (NAGARAJA et al., 1985).

Ao levar em consideração que a monensina sódica atua na seleção das bactérias gram negativas (RUSSELL; WALLACE, 1997), a produção de AGCC é modificada. As concentrações de AGCC são alteradas, de modo que há redução da proporção molar de acetato (MCGUFFEY et al., 2001), com consequente redução das produções de gás carbônico e metano (RUSSELL; STROBEL, 1989), e aumento da

proporção molar de propionato (NAGARAJA et al., 1981; BRODERICK, 2004; EIFERT et al., 2005; BENCHAAAR et al., 2006; GEHMAN et al., 2008; OELKER et al., 2009; GANDRA et al., 2012; APPUHAMY et al., 2013).

Em um experimento realizado com adição de monensina sódica na dose 24 mg/kg da MS para vacas no terço médio de lactação e alimentadas com silagem de milho na proporção volumoso:concentrado de 35:65, os autores observaram que houve redução de 19% da relação acetato:propionato e da produção de metano (SAUER et al., 1998).

Broderick (2004) avaliou vacas na fase inicial da lactação com produção de 35 kg de leite/dia, alimentadas com silagem de alfafa em diferentes dietas: controle sem aditivo e adição de 10 mg/kg da MS de monensina. Foi relatado que a monensina sódica não influenciou o CMS das vacas, mas observou que vacas alimentadas com monensina sódica tiveram aumento de 2,5 mg/dL na glicemia e de 10% na concentração molar de propionato, no entanto, relatou que adição de monensina sódica na dieta reduziu a produção de gordura do leite (3,15 vs 2,86%), que teve efeito direto na redução da produção de leite corrigida para 3,5% de gordura.

Em uma metanálise com 16 estudos publicados na literatura de bovinos de corte alimentados com adição do ionóforo monensina sódica, os autores relatam que em vários estudos analisados, apresentaram aumento consistente da proporção molar de propionato com uso de monensina sódica, além da redução da proporção molar de butirato e acetato (ELLIS et al., 2012). Observaram também que o efeito da monensina sobre a produção de metano é dose dependente e que estes resultados foram confirmados em revisão de literatura (BEAUCHEMIN et al., 2008).

Com o aumento do propionato ruminal pode haver maior disponibilidade de glicose para vacas em lactação com possível aumento da produção de leite, pois a glicose é um metabólito limitante para produção de lactose (HAYES et al., 1996).

Ipharraguerre e Clark (2003) observaram que dos 13 trabalhos compilados, apenas quatro resultaram em aumento significativo na concentração da glicose plasmática, além disso, o aumento da disponibilidade deste metabólito foi pequena (5,9%). Com o aumento do propionato ruminal pode haver maior disponibilidade de glicose para vacas em lactação com possível aumento da produção de leite, pois a glicose é um metabólito limitante para produção de lactose (HAYES et al., 1996).

O suprimento de glicose para glândula mamária é o principal determinante da produção de leite. Portanto, grandes quantidades de glicose são necessárias para atender o requerimento da glândula mamária para síntese de lactose, proteína e gordura do leite (REYNOLDS et al., 1994). Em um experimento realizado com vacas no terço médio de lactação alimentadas com silagem de milho na proporção 60% e 40% de concentrado, e apresentaram consumo de 15,6 kg/dia de MS e produção de 32 kg de leite/dia. Os autores estimaram que o requerimento de glicose para glândula mamária é de 2,3 kg/dia, e assumiram que 70% da glicose removida é usada na síntese de lactose do leite (REYNOLDS et al., 1988).

Em um estudo metanalítico os autores avaliaram os efeitos metabólicos da monensina sódica e observaram que este ionóforo aumenta a glicemia em 3% e a concentração sérica de ureia em 6%, sem influenciar as concentrações de colesterol, insulina, cálcio no sangue e de ureia no leite (DUFFIELD et al., 2008a).

O uso de ionóforos é muito bem sucedido sobre a manipulação da fermentação ruminal e contribui para o melhor desempenho do animal. A monensina sódica, por exemplo, é utilizada comercialmente na produção de ruminantes há muitas décadas. Com possíveis melhoras da eficiência alimentar, na redução da produção de metano e minimiza os riscos de ocorrência de distúrbios metabólicos (RUSSELL; STROBEL, 1989). No entanto, os ionóforos são classificados como antimicrobianos, o que faz seu uso ser cada vez mais questionado pelos consumidores.

4. MATERIAL e MÉTODOS

4.1. Local, instalações dos animais

O experimento foi conduzido nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), em Pirassununga - SP. O experimento a campo foi realizado no período de 07 de abril a 09 de junho de 2015.

Foram utilizadas 24 vacas da raça Holandês, pluríparas, com peso corporal de 618 ± 76 kg, $150,24 \pm 91,43$ dias em lactação e $29,1 \pm 4,01$ kg/dia de leite no início do

experimento e alojadas em estábulo tipo *free-stall*, com ventilação forçada, baias individuais de 17,5 m² de área e cama de areia.

Dessas 24, seis apresentavam canulas ruminais para avaliação da fermentação ruminal, as quais foram previamente preparadas cirurgicamente de acordo com os "Princípios Éticos da Experimentação Animal" recomendados pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.2. Delineamento, dietas experimentais e análise de alimentos

As vacas foram distribuídos em oito Quadrados Latinos 3 x 3, contemporâneos e balanceados. As variáveis utilizadas como critério para a seleção das vacas e alocação aos quadrados foram: presença de cânula ruminal, produção de leite, dias em lactação (DEL), peso corporal e escore de condição corporal (ECC) ao início do experimento.

Foi formulada uma dieta basal para atender as exigências nutricionais de uma vaca em lactação com aproximadamente 600 kg de peso corporal, conforme recomendações do NRC (2001). Foi formulada uma dieta basal, as demais diferem apenas quanto a inclusão dos aditivos 1) Controle (CON), dieta basal sem inclusão de aditivos; 2) Inclusão de 500 mg/kg da MS do óleo funcional (OF) composto pelo ácido anacárdico, cardol e cardanol (Óleo da casca da castanha de caju) e ácido ricinoleico (óleo de mamona) (Essential® Oligo Basics Agroindustrial Ltda Brasil, Cascavel – PR); 3) Inclusão de 22 mg/kg da MS de monensina sódica (MON; Rumensin® Elanco Saúde Animal, São Paulo – SP). Os respectivos tratamentos e água foram fornecidos a vontade durante todo período experimental. Os volumosos utilizados foram a silagem de milho (36,77%) e o pré secado de azevém (11,23%), totalizando 48% da matéria seca da dieta. O pré-secado de azevém foi picado antes do fornecimento para as vacas. Aproximadamente 180 kg de pré-secado foi picado, por 30 minutos, em um misturador total horizontal HSMT™ (DeLaval, Mogi Mirim, Brasil), acoplado a um trator MF4275 (Massey Ferguson, São Paulo, Brasil), acelerado à 1800 rotações por minuto.

No período matinal, enquanto as vacas eram ordenhadas (06:00 e às 16:00), às sobras foram retiradas e pesadas; volumosos e concentrado foram fornecidos duas vezes ao dia (08:00 e às 13:30), permitindo-se sobras entre 5 e 10% do fornecido.

Cada período teve duração de 21 dias, no qual os 14 primeiros foram utilizados para adaptação às dietas e os demais para coleta de dados.

Amostras dos ingredientes do concentrato foram coletadas somente uma vez. Em todos os períodos foram coletadas amostras de fezes, sobras, silagem de milho e pré-secado de azevém congeladas a -20°C e depois de cada período foram parcialmente secas em estufa com ventilação forçada (60°C/72h) e moídas em moinho de facas tipo Willey (Marconi® - MOD - 0,48) com o uso de peneira com crivos de 1 mm para posteriores análises. Composição bromatológica de ingredientes e percentual da dieta basal e do concentrato Tabelas 1 e 2 respectivamente.

Tabela 1 – Composição bromatológica de ingredientes

Composição	SM ¹	PS ²	MM ³	FGM ⁴	FT ⁵	FS ⁶	CS ⁷
MS ⁸	33,03	49,14	87,48	89,82	89,39	89,96	90,51
MO (%MS) ⁹	95,49	89,28	98,51	95,10	92,94	92,49	90,23
PB (%MS) ¹⁰	7,67	13,29	7,74	23,59	19,35	47,36	14,68
PIDN (%MS) ¹¹	1,33	3,33	0,81	0,79	0,80	1,31	0,33
PIDA (%MS) ¹²	1,20	2,15	0,35	0,29	0,13	0,83	0,86
EE (%MS) ¹³	2,31	2,52	3,79	3,53	2,57	3,74	2,13
CNF (%MS) ¹⁴	33,92	23,07	74,83	18,46	22,31	28,71	11,48
FDN (%MS) ¹⁵	52,92	53,73	12,97	50,31	49,51	13,97	62,28
FDA (%MS) ¹⁶	35,05	39,01	6,53	14,45	14,04	10,33	50,33
FDNi (%MS) ¹⁷	18,52	7,59	1,45	2,44	9,20	3,85	3,30
LIG (%MS) ¹⁸	4,55	3,24	2,44	1,56	4,23	2,48	8,51
MM (%MS) ¹⁹	4,51	10,72	1,49	4,90	7,06	7,51	9,77
NDT _{1x} ²⁰	65,51	61,18	86,70	73,54	65,77	79,95	51,31
ELL _{3x} (Mcal/kg) ²¹	1,49	1,38	2,00	1,68	1,49	1,84	1,14

¹Silagem de milho; ²Pré-secado; ³Milho moído; ⁴Farelo de glúten de milho; ⁵Farelo de trigo; ⁶Farelo de soja; ⁷Casca de soja. ⁸MS (matéria seca); ⁹MO (matéria orgânica); ¹⁰PB (proteína bruta); ¹¹PIDN (proteína insolúvel em detergente neutro); ¹²PIDA (proteína insolúvel em detergente ácido); ¹³EE (extrato etéreo); ¹⁴CNF (carboidrato não fibroso); ¹⁵FDN (fibra em detergente neutro); ¹⁶FDA (fibra em detergente ácido); ¹⁷FDNi (fibra em detergente neutro indigestível); ¹⁸LIG (lignina); ¹⁹MM (matéria mineral); ²⁰NDT_{1x} (nutrientes digestíveis totais calculados); ²¹ELL_{3x} (energia líquida).

Do 15º ao 21º dia de cada período, amostras das sobras de cada vaca foram coletadas, perfazendo uma amostra composta, que foram armazenadas à -20 °C até as análises. Todas as amostras descritas anteriormente foram analisadas quanto aos teores de matéria seca (MS; método 930.15; AOAC, 2000), matéria mineral (MM método 942.05; AOAC, 2000), extrato etéreo (EE; método 920.39; AOAC, 2000), proteína bruta (PB; N × 6,25; método 984.13; AOAC, 2000),

Tabela 2 – Composição percentual da dieta basal e do concentrado

Ingredientes (%MS)	Dieta	Concentrado
Silagem de milho	36,77	-
Pré secado de azevém	11,23	-
Milho moído	21,91	42,13
Farelo de glúten de milho	3,19	6,13
Farelo de trigo	4,00	7,69
Farelo de soja 48%	13,52	26,00
Casca de soja	4,98	9,58
Ureia	0,31	0,60
Sulfato de amônia	0,09	0,17
Calcáreo	1,21	2,33
Bicarbonato de sódio	0,81	1,56
Cloreto de sódio	0,18	0,35
Mistura mineral vitamínica ¹	1,80	3,46
<i>Composição bromatológica</i>		
Matéria seca (%)	64,14	89,37
Matéria orgânica (%MS)	90,88	87,97
Proteína bruta (%MS)	15,67	21,83
Proteína insolúvel em detergente neutro (%MS)	1,29	0,48
Proteína insolúvel em detergente ácido (%MS)	0,93	0,82
Extrato etéreo (%MS)	2,79	3,19
Carboidratos não fibrosos (%MS)	35,51	42,94
Fibra em detergente neutro (%MS)	36,91	21,96
Fibra em detergente ácido (%MS)	23,62	12,22
Fibra em detergente neutro indigestível (%MS)	9,11	2,79
Lignina (%MS)	3,55	2,91
Matéria mineral (%MS)	9,12	12,03
Nutrientes digestíveis totais ² _{1x}	68,30	72,18
Energia líquida (Mcal/kg) ³ _{3x}	1,56	1,66

¹Contém por kg de mistura mineral: 88,0 g de Ca; 42,0 g de P; 18,0 g de S; 45,0 g de Mg; 123,0 g de Na; 0,22 mg de Co; 22,0 mg de Cu; 20,0 mg de Cr; 35,0 mg de Fe; 1,20 mg de I; 28,0 mg de Mn; 0,70 mg de Se; 90,0 mg de Zn; 80,0 mg de Biotina; 7000 UI Vit A; 2000 UI Vit D; 50 UI Vit E. ²Nutrientes digestíveis totais ao nível de manutenção, calculado de acordo com equações do NRC, 2001. ³Energia líquida (Mcal/kg) três vezes a manutenção para vacas com produção em torno de 30 kg de leite/dia.

proteína bruta no resíduo de fibra em detergente neutro (PIDN), proteína bruta no resíduo da fibra em detergente ácido (PIDA), lignina (método 973.18; AOAC, 2000) e fibra em detergente neutro e ácido (FDN e FDA) determinados de acordo com Van

Soest (1991), com o uso de α -amilase e sem adição de sulfito de sódio ao detergente em sistema Tecnal[®] (Piracicaba, SP, Brasil).

Os teores de carboidratos não-fibrosos (CNF) foram estimados segundo HALL, 2000), sendo: $CNF = 100 - [(\%PB + \%EE + \%MM + \%FDN)]$.

Os nutrientes digestíveis totais foram calculados conforme equações de Weiss et al. (1992), descritas no NRC (2001), em que: $NDT_{1x} = CNFd + PBd + (EEd * 2,25) + FDNd - 7$, onde PBd, CNFd, FDNd e AGd representam o total destes nutrientes digestíveis para vacas em manutenção.

4.3. Digestibilidade aparente total

Para estimativa da digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes, amostras de fezes foram coletadas, a cada nove horas durante 3 dias consecutivos, o que equivale a uma amostragem representativa de 24 horas, com intervalo de coletas de 3 horas, compreendendo assim a variação diária da excreção. Foram homogeneizadas em amostras compostas de cada animal em cada período e submetidas as análises descrita anteriormente.

A excreção total de fezes e a digestibilidade da MS e dos nutrientes de cada animal foi estimada a partir da concentração do indicador interno fibra em detergente neutro indigestível (FDNi). Para obtenção do teor de FDNi nas amostras, utilizaram-se 4 repetições de cada amostra pré-seca, de alimentos, sobras e fezes, as quais foram acondicionadas em sacos de tecido não-tecido (TNT 100g/m²), com dimensões de 5 x 5 cm, segundo a relação de até 20 mg de matéria seca por centímetro quadrado de superfície (NOCEK, 1988).

As amostras foram incubadas por 264 horas no rúmen de duas vacas da raça Holandês, previamente adaptadas com concentrado a base de farelo de soja e milho moído e volumoso a base de silagem de milho e pré-secado de azevém, de acordo com a metodologia adaptada por Casali et al. (2008).

Após a retirada do rúmen, os saquinhos foram lavados com água corrente. Posteriormente, os saquinhos foram submetidos à lavagem em solução detergente neutro por uma hora (VAN SOEST, 1991), em equipamento analisador de fibra da Tecnal[®] (Piracicaba, SP, Brasil). Após este período foram lavados com água quente

e posteriormente com acetona e secos em estufa não ventilada (105°C por 4 horas), colocados em dessecador (20 sacos/dessecador), e pesados obtendo-se a concentração de FDNi. Não foi feito qualquer ensaio para estimar a taxa de recuperação do indicador e esta foi considerada como sendo de 100%.

4.4. Fermentação ruminal

As amostras de líquido ruminal foram coletadas no 16º dia de cada período experimental, em cinco pontos do rúmen (cranial, caudal, ventral, lateral direito e esquerdo) nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 horas após a alimentação matinal e a última coleta 24 horas depois, o pH ruminal foi determinado imediatamente após a coleta, com utilização de potenciômetro (MB-10, Marte Científica, Santa Rita do Sapucaí, Brasil). As amostras de líquido ruminal foram acondicionadas em caixa térmica e encaminhadas ao laboratório.

As quais foram centrifugadas a 3.000 x g por 15 minutos e posteriormente, 1,6 mL do sobrenadante foi pipetado em tubo do tipo eppendorf (Axygen® Brand Products, Nova York, EUA), contendo 0,4 mL de ácido fórmico P.A.; sendo arrolhados e congelados até a avaliação da concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), no Laboratório de Fermentabilidade Ruminal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos FZEA/USP.

As concentrações de AGCC no fluído ruminal foram mensuradas por cromatografia gasosa (GC-2014, Shimadzu, Tokyo, Japão) equipado com coluna capilar (Stabiliwax; Restek, Bellefonte, EUA) de acordo com método descrito por Erwin et al. (1961) e adaptado por Getachew et al. (2002). As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e centrifugadas a 14500 × g à 4°C por 10 min, e o sobrenadante (1 mL) foi transferido para um frasco seco e limpo contendo 100 uL do padrão interno (ácido 2-etil-butírico 100 mM, Chemservice, USA). O Hélio foi utilizado como gás de arraste (vazão 8,01 mL/min), o ar sintético como comburente (vazão 40 kPa) e o hidrogênio como combustível (vazão 60 kPa). A temperatura de operação utilizadas do injetor split/splitless e do detector de ionização de chamas foi de 250°C, da coluna de 145°C. O padrão externo foi preparado com ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico (Chemservice, USA). O software GC Solution (Shimadzu, Japão) foi utilizado para cálculo das concentrações de AGCC.

O nitrogênio amoniacal (N-NH₃) foi determinado pelo método fenol-hipoclorito (BRODERICK; KANG, 1980). Foram adicionados a tubos do tipo eppendorf (Axygen® Brand Products, Nova York, USA) contendo 0,8 mL de amostras de líquido ruminal e ácido sulfúrico a 0,5 mol/L, 0,4 mL de tungstato de sódio a 10%, e posteriormente as amostras foram centrifugadas a 1200 x g durante 15 minutos.

4.5. Síntese de proteína microbiana

As análises para estimativa da síntese de proteína microbiana foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal da FMVZ/USP. As amostras utilizadas para análise de alantoína no leite foram coletadas no 17º dia de cada período experimental. Uma alíquota de 10 mL de leite foi diluída com 5 mL de ácido tricloroacético a 25%, filtrada em papel-filtro de 50 µm para desproteinização e posterior avaliação das concentrações de ureia e alantoína. Alíquotas de 50 mL de urina *spot* foram obtidas de todas as vacas no 17º dia do período experimental, aproximadamente 4 horas após a alimentação, durante micção estimulada por massagem na vulva. A urina foi filtrada e alíquotas de 10 mL foram imediatamente diluídas em 40 mL de ácido sulfúrico a 0,018 mol/L para evitar destruição bacteriana dos derivados de purinas e precipitação do ácido úrico. Uma amostra de urina pura foi armazenada para determinação dos compostos nitrogenados totais e de creatinina.

O volume urinário total diário foi estimado dividindo-se o valor médio de excreção urinária diária de creatinina (24,05 mg/kg de PV de Chizzotti et al., 2008) pela concentração de creatinina nas amostras *spot*, de acordo com Oliveira et al. (2001). As concentrações de creatinina na urina foram determinadas por meio de *kits* comerciais (Creatinina cinética: cat.no. K-067; Bioclin®, CELM® São Caetano do Sul, Brasil), utilizando reação enzimática colorimétrica em analisador semi-automático SBA-200 (CELM® São Caetano do Sul, Brasil). As excreções urinárias de alantoína, ácido úrico (Ácido úrico líquido estável: cat. no. k-052) e alantoína do leite foram determinados por *kits* comerciais.

A excreção total de derivados de purinas (DP) foi calculada pela soma da excreção molar de ácido úrico excretado na urina, alantoína excretada na urina e no leite. Foram estimadas as purinas absorvidas, considerando-se a excreção endógena de 0,512*mmol/PV^{0,75}, a recuperação urinária de 0,70 encontradas por González-

Ronquillo et al. (2003). A síntese ruminal de compostos nitrogenados (N_{mic} , gN/dia) foi calculada com base nas purinas absorvidas (P_{abs} , mmol/dia), utilizando-se a equação (CHEN; GOMES, 1992): $N_{mic} = (70 \cdot P_{abs}) / (0,83 \cdot 0,116 \cdot 1.000)$, em que 70 é o conteúdo de N nas purinas (mgN/mol); 0,116 é a relação N purina: N total nas bactérias e 0,83, a digestibilidade intestinal das purinas microbianas.

4.6. Produção e composição do leite

As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia, às 06:00 e às 16:00 e produção de leite foi registrada eletronicamente (Alpro®, DeLaval, Tumba, Suécia). Do 16º ao 18º dia de cada período, amostras proporcionais das duas ordenhas diárias foram coletadas e analisadas imediatamente para proteína, gordura e lactose (LACTOSCAN®; Milkotronic®, Bulgária). A produção de leite foi corrigida para 3,5% de gordura segundo à fórmula (SKLAN et al., 1992):

$$PLC = (0,432 + 0,1625 \cdot \text{teor de gordura do leite}) \cdot PL$$

Em que: PLC: produção de leite corrigida; PL: produção de leite.

Para determinação da ureia e nitrogênio ureico no leite, as amostras de leite foram desproteinizadas da mesma forma que as amostras utilizadas na análise da alantoína. As análises da concentração de ureia no leite desproteinizado foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP, por meio de *kits* comerciais (Bioclin®, cat. n°. K-056) em equipamento SBA-200, da CELM® São Caetano do Sul, Brasil).

4.7. Parâmetros sanguíneos

As coletas de sangue foram realizadas no 15º dia de cada período por punção da veia e/ou artéria coccígea, as 06:00 da manhã. As amostras de sangue foram coletadas em tubos com vacuo de 10 mL, sem conservantes, para avaliação das concentrações séricas de glicose, ureia, e das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamil transferase (GGT). As amostras de sangue foram centrifugadas a 2000 x g durante 15 minutos, para a separação do soro. O soro centrifugado obtido foi transferido para cubetas de plásticos identificadas e armazenados a -20°C, até o procedimento das análises laboratoriais. As análises foram realizadas utilizando *kits*

comerciais (Glicose: cat. no. K-082; Ureia: cat. nº. K-056; AST: cat. nº. K-048; GGT: cat. nº. K-080; Bioclin®, Belo Horizonte, Brasil), e as leituras realizadas em analisador automático (SBA 200, CELM®, São Caetano do Sul, Brasil), no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP.

4.8. Balanço de energia

Para obtenção do consumo de energia bruta e avaliação da eficiência do uso de energia consumida, amostras de silagem e alimentos foram analisadas quanto ao teor de energia bruta em bomba calorimétrica, de acordo com Harvatine e Allen (2006). O consumo de energia digestível (CED) foi obtido por meio do produto dos coeficientes de digestibilidade da matéria seca observados e dos consumos de energia bruta, de acordo com os valores de energia obtidos para os ingredientes da dieta (HARVATINE; ALLEN, 2006).

O consumo de energia líquida (CELI_{3x}) foi calculado a partir dos teores de energia líquida nos alimentos, obtidos a partir da equação do NRC (2001), apresentada na seção consumo de matéria seca e nutrientes. A energia líquida de lactação foi estimada a partir da seguinte equação do NRC (2001):

$$ELI \text{ (Mcal/dia)} = PL \text{ (kg/dia)} \times (0,0929 \times G\% + 0,0547 \times P\% + 0,0395 \times L\%),$$

Onde: G% é teor de gordura no leite; P% é o teor de proteína do leite e L% é o teor de lactose. A energia líquida de manutenção foi estimada, de acordo com o NRC (2001), como $ELm = 0,08 \times PV^{0,75}$ e o balanço de energia (BE) obtido pela diferença entre o CELI e ELI+ELm. A eficiência de utilização de energia foi calculada pela relação da ELI e o CED e através da razão entre a soma da ELI e ELm e o CED.

4.9. Balanço de nitrogênio

No 17º de dia de cada período, 50 mL de amostras de urina *spot* foram coletadas de cada animal 4h após alimentação matinal e subamostras de 10 mL foram diluídas em 40 mL de ácido sulfúrico e congeladas para análises de ácido úrico, alantoína, creatinina e para determinação de N total.

As concentrações de ácido úrico e creatinina foram determinadas com uso de kits comerciais (Ácido úrico líquido estável: cat. no. k-052; Creatinina cinética: cat.no. K-067; Bioclin®), em aparelho SBA-200 CELM® São Caetano do Sul, Brasil. Para a realização dessa análise, 100 µL de urina foram diluídos em 4900 µL de água deionizada.

O volume urinário total diário, de forma similar ao obtido para a síntese de proteína microbiana, foi estimado dividindo-se o valor médio de excreção diária de creatinina, como 24,05 mg/kg de peso corporal (CHIZZOTTI et al., 2008) pelos valores observados de concentração de creatinina nas amostras spot (OLIVEIRA et al., 2001).

O consumo de nitrogênio foi estimado por meio do consumo de proteína bruta dividindo-se pelo fator de conversão de nitrogênio 6,25, obtendo-se a quantidade em gramas de nitrogênio consumido. O mesmo cálculo foi realizado com os valores de proteína bruta das fezes obtendo-se a excreção total de nitrogênio em g/kg MS.

A concentração de nitrogênio nas amostras de urina foi determinada de acordo com método (984.13; AOAC, 2000). Para as amostras de leite, o teor de nitrogênio foi obtido através do teor de proteína bruta da amostra com aplicação do fator 6,38 (NRC, 2001). O balanço de nitrogênio foi obtido subtraindo do total de nitrogênio consumido as excreções de nitrogênio na urina, fezes e leite, obtendo-se os valores de nitrogênio retido em gramas e em relação ao nitrogênio consumido.

4.10. Avaliação do escore de condição corporal e peso corporal

O escore de condição corporal (ECC) foi avaliado no sétimo dia de adaptação e no final de cada período e para mensuração da variação do peso corporal foram realizadas 5 pesagens por período, sempre após a ordenha e antes da alimentação matinal. O ECC foi realizada por 1 técnico treinado com uso do sistema 1 a 5 unidades, escore 1 para vacas muito magras e 5 vacas muito gordas, conforme metodologia proposta por Wildman et al. (1982) e desenvolvida por Edmonson et al., (1989).

4.11. Análises estatísticas

Os dados foram analisados usando o procedimento PROC MIXED (Versão 9.2, SAS Institute, Cary, NC 2010) de acordo com o modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + P_j + Q_k + A_l(Q_k) + e_{ijkl}$$

Em que: Y_{ijkl} = valor observado no animal l , pertencente ao quadrado k , no j -ésimo período, no qual recebeu o tratamento i ; μ = média geral; T_i = efeito fixo de tratamento i ; P_j = efeito fixo de período; Q_k = efeito fixo do quadrado; $A_l(Q_k)$ = efeito aleatório de animal dentro do quadrado e e_{ijkl} = erro experimental.

Quando significativos, os efeitos de tratamentos foram analisados pelo teste de diferença mínima significativa (PDIFF). As médias apresentadas foram ajustadas pela função LSMEANS e o método de Kenward e Rogers (1997) foi utilizado para a correção dos graus de liberdade.

As variáveis de fermentação ruminal (pH e concentrações de N-NH₃ e AGCC's) foram analisadas como medidas repetidas no tempo, pelo PROC MIXED do SAS 9.2. Foram considerados no modelo estatístico os efeitos de tratamento, período, quadrado, animal dentro de quadrado, além da interação entre tempo e tratamento. A metodologia de Akaike foi utilizada para determinar a matriz de covariância a ser utilizada. Estruturas de covariância testadas foram CS, CSH, UN, UN(1), AR (1), ARH (1), HF, TOEP, TOEPH e VC. Foi considerado o nível de significância de 0,05 em todas as análises realizadas. Fermentação ruminal (pH, N-NH₃, e AGCC).

$$Y_{ijklm} = \mu + T_i + P_j + Q_k + A_l(Q_k) + w_{ijkl} + TP_m + TP_m * T_i + e_{ijklm}$$

Medidas repetidas no tempo, onde:

Y_{ijklm} é o valor observado no m -ésimo tempo do animal l , pertencente ao quadrado k , no período j , no qual recebeu o tratamento i ; μ : média geral; T_i : efeito fixo do tratamento i ($i=1$ a 3); P_j : efeito fixo do período j ($j=1$ à 3); Q_k : efeito fixo do k -ésimo quadrado ($k=1$ à 2); $A_l(Q_k)$: efeito aleatório do animal l , pertencente ao quadrado k ($l=1$ à 6); w_{ijkl} : erro experimental da parcela; TP_m : efeito fixo do tempo de avaliação ($m=1$ à 10); $TP_m * T_i$: efeito fixo da interação entre o tratamento i e o tempo m e e_{ijklm} : erro experimental da subparcela. As estruturas de covariância testadas foram as mesmas descritas anteriormente.

5. RESULTADOS

5.1. Consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes

A inclusão de óleo funcional ou monensina sódica na dieta não afetou o consumo de matéria seca, matéria orgânica, extrato etéreo, proteína bruta, fibra em detergente neutro, carboidratos não fibrosos e nutrientes digestíveis totais ($P>0,05$; Tabela 3). Os consumos de FDN e MS em relação ao peso vivo também não foram influenciados pelos tratamentos ($P>0,05$).

Tabela 3 – Efeito do óleo funcional sobre consumo e digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes de vacas leiteiras.

Variáveis	Tratamentos ¹			Média	EPM ²	P-valor
	CON	OF	MON			
Consumo (kg/dia)						
Matéria seca	24,58	25,05	24,71	24,81	0,443	0,455
Matéria orgânica	22,46	22,88	22,57	22,66	0,406	0,470
Proteína bruta	3,93	4,02	3,96	3,97	0,071	0,395
Extrato etéreo	0,70	0,72	0,71	0,71	0,013	0,144
FDN ³	8,40	8,65	8,52	8,52	0,161	0,271
CNF ⁴	9,56	9,82	9,76	9,71	0,175	0,257
NDT _{1x} ⁵	16,80	17,13	16,89	16,96	0,300	0,447
Coeficiente de digestibilidade (g/kg)						
Matéria seca	0,675	0,670	0,674	0,673	0,006	0,746
Matéria orgânica	0,705	0,692	0,700	0,697	0,006	0,292
Proteína bruta	0,698	0,692	0,710	0,700	0,006	0,142
Extrato etéreo	0,849	0,841	0,833	0,841	0,005	0,441
FDN ³	0,632	0,616	0,618	0,622	0,006	0,299
Consumo (%PV)						
Matéria seca	3,89	3,97	3,90	3,93	0,066	0,302
FDN ³	1,33	1,37	1,34	1,35	0,023	0,235

¹Tratamentos: CON: controle; OF: óleo funcional; MON: monensina. ²EPM: Erro padrão da média; ³FDN: fibra em detergente neutro; ⁴CNF: carboidratos não fibrosos; ⁵NDT_{1x}: nutrientes digestíveis totais.

5.2. Fermentação ruminal

As vacas alimentadas com óleo funcional ou monensina sódica apresentaram pH e concentração de N-NH₃ ruminal similares as vacas não suplementadas (Tabela 4; Figuras 1, 2).

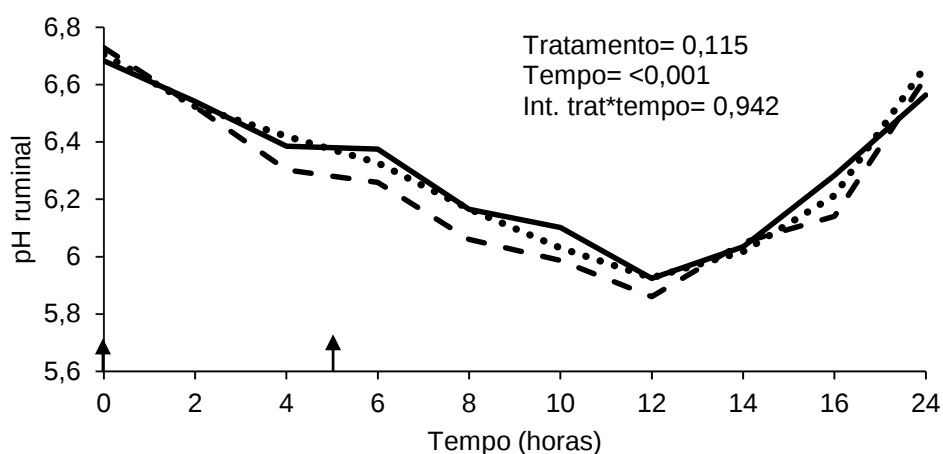
Tabela 4 – Efeito do óleo funcional sobre a fermentação ruminal de vacas leiteiras.

Parâmetros	Tratamentos ¹			Média	EPM ²	P-valor		
	CON	OF	MON			Dieta	Tempo	Int. trat*T
pH	6,31	6,25	6,30	6,29	0,026	0,115	<0,001	0,943
<i>mg/dL</i>								
N-NH ₃ ³	20,78	22,46	21,92	21,72	0,604	0,522	<0,001	0,740
<i>AGCC (mmol/100mmol)</i>								
Acético	61,07	60,71	61,12	61,02	0,170	0,970	<0,001	0,978
Propiônico	19,86 ^b	21,02 ^a	20,73 ^a	20,54	0,193	0,006	<0,001	0,999
Butírico	13,77	13,27	13,42	13,50	0,100	0,525	0,014	0,956
Valérico	1,47	1,50	1,46	1,48	0,017	0,397	<0,001	0,960
AGCRT ⁴	3,52	3,68	3,31	3,50	0,052	0,277	0,024	0,778
<i>AGCC (mmol/L)</i>								
Acético	84,19	83,39	79,04	82,35	0,931	0,366	<0,001	0,283
Propiônico	27,28 ^b	29,54 ^a	27,43 ^b	28,15	0,566	0,037	<0,001	0,919
Butírico	19,12	17,99	17,42	18,24	0,238	0,203	<0,001	0,235
Valérico	2,05	2,09	1,93	2,02	0,041	0,319	<0,001	0,810
AGCRT ⁴	4,90 ^a	5,03 ^a	4,27 ^b	4,73	0,095	0,004	<0,001	0,460
AGCCT ⁵	137,77	138,22	130,09	135,51	1,728	0,419	<0,001	0,335
C2:C3 ⁶	3,08	2,82	2,88	3,01	0,035	0,849	<0,001	0,969

¹Tratamentos: CON: controle; OF: óleo funcional; MON: monensina. ²EPM: erro padrão da média. ³N-NH₃nitrogênio amôniacal; ⁴AGCRT: ácidos graxos de cadeia ramificada total; ⁵AGCCT: ácidos graxos de cadeia curta total; ⁶C2:C3: relação acetato:propionato. Médias na mesma linha sobrepostas com letras semelhantes não diferem entre si pelo teste de diferença mínima significativa de Fisher à 5% de probabilidade.

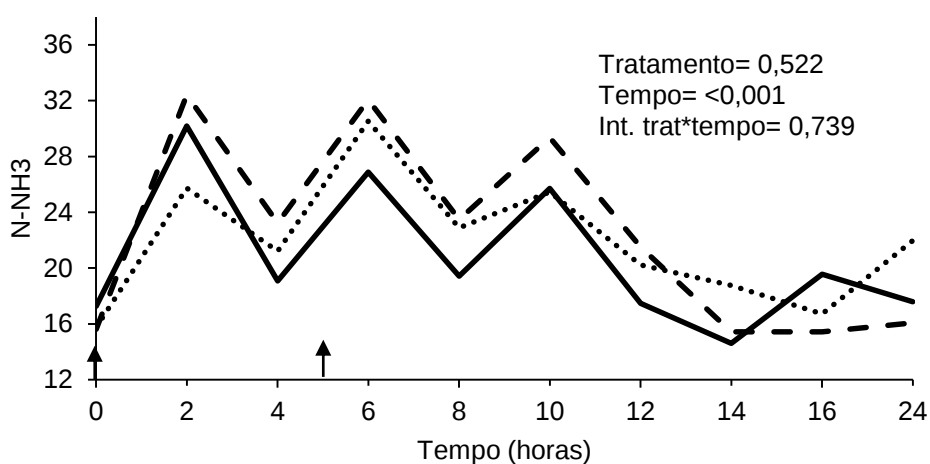
A inclusão de óleo funcional ou monensina sódica na dieta aumentou (P<0,05) a proporção de propionato ruminal (20,87 mmol/100mmol) em relação as vacas que receberam o tratamento controle (19,86 mmol/100mmol). Vacas alimentadas com óleo funcional apresentaram maior (P>0,05) concentração total de propionato ruminal

(29,54 mmol/L) em relação às que receberam os demais tratamentos (27,35 mmol/L; Figura 4). A inclusão de monensina sódica na dieta reduziu em 12,8 e 14,9% a concentração molar de AGCRT (4,27 mmol/L), em relação as vacas do tratamento controle (4,9 mmol/L) e com inclusão de óleo funcional (5,03 mmol/L), respectivamente (Figura 6). Não houve efeito ($P < 0,05$) dos tratamentos sobre a relação acetato:propionato (C2:C3; Tabela 4).



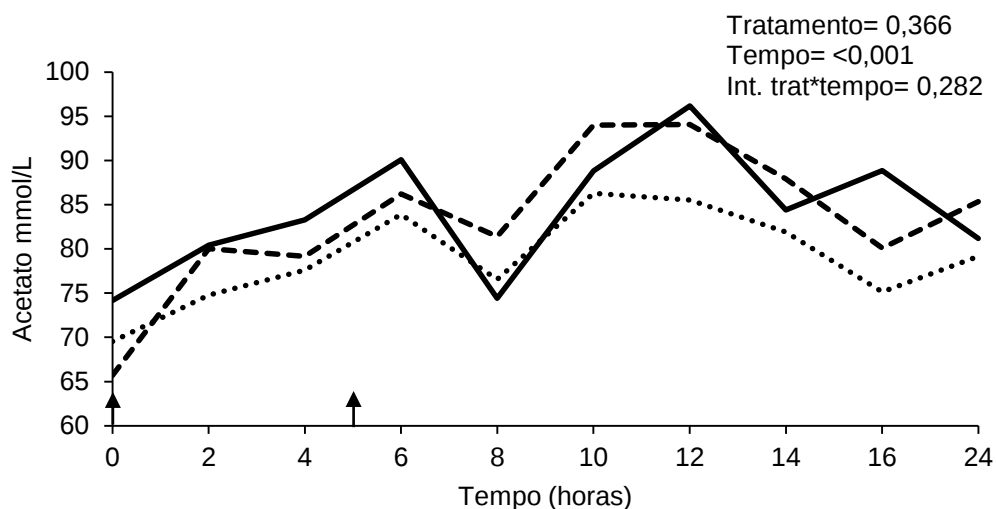
Controle (—); óleo funcional (— —) e monensina sódica (.....); horários de alimentação (↑).

Figura 1 – Efeito do óleo funcional sobre o pH ruminal de vacas leiteiras, em diferentes tempos após fornecimento da alimentação matinal.



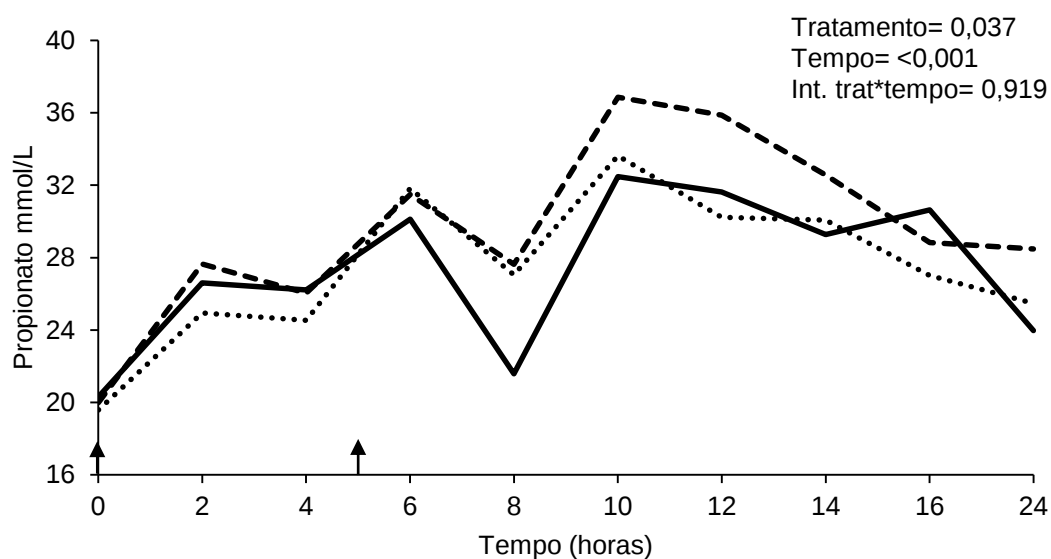
Controle (—); óleo funcional (— —) e monensina sódica (.....); horários de alimentação (↑).

Figura 2 – Efeito do óleo funcional sobre concentração de N-NH₃ ruminal de vacas leiteiras, em diferentes tempos após fornecimento da alimentação matinal.



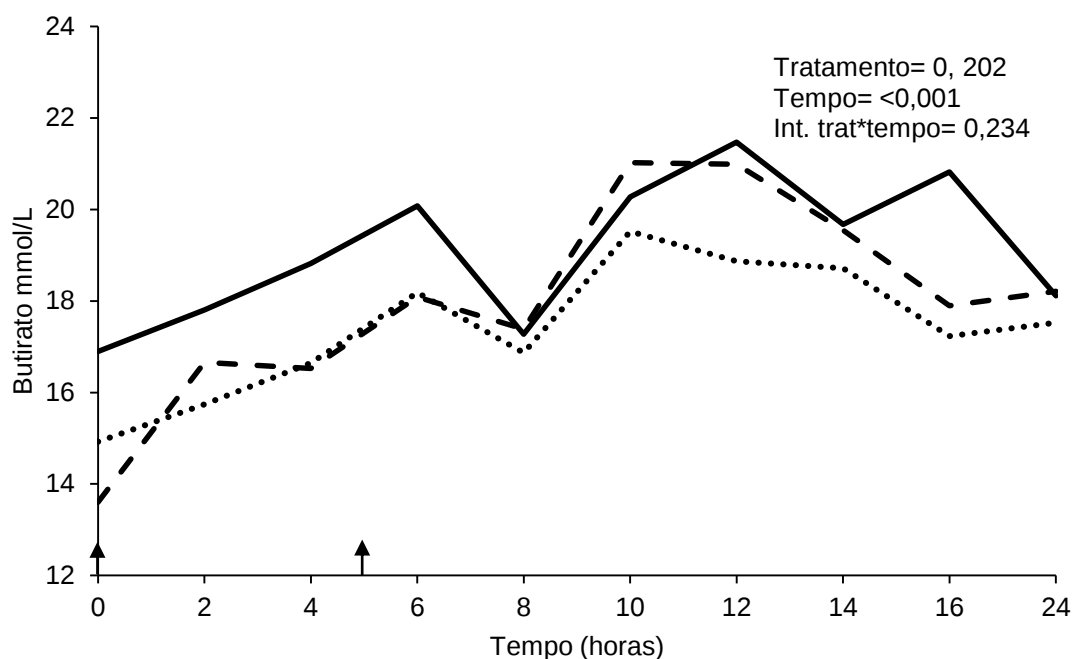
Controle (—); óleo funcional (---) e monensina sódica (.....); horários de alimentação (↑).

Figura 3 – Efeito do óleo funcional sobre concentração ruminal de acetato mmol/L de vacas leiteiras, em diferentes tempos após fornecimento da alimentação matinal.



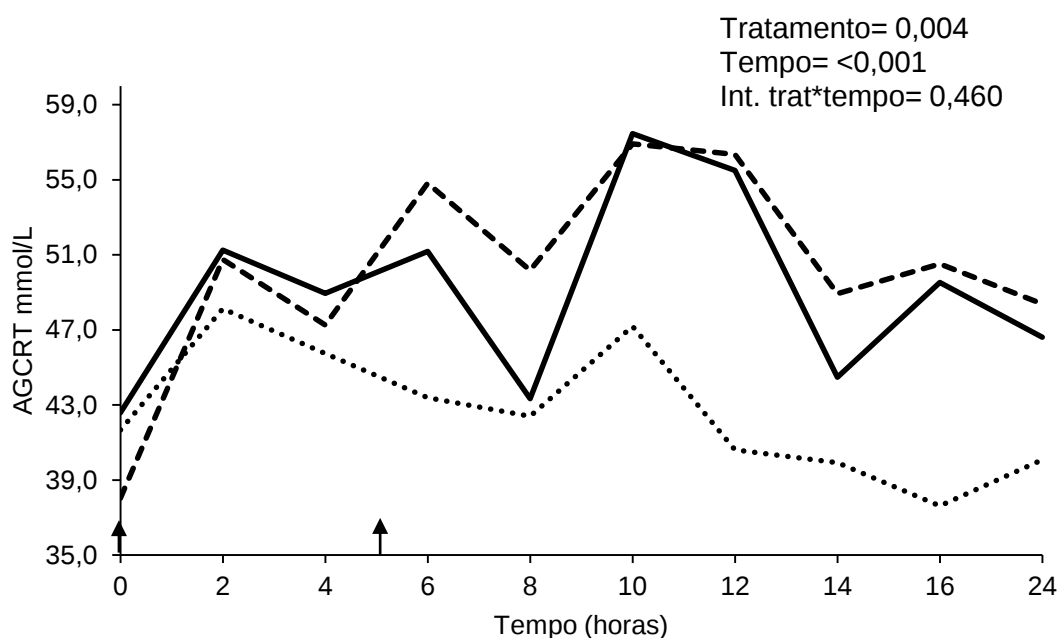
Controle (—); óleo funcional (---) e monensina sódica (.....); horários de alimentação (↑).

Figura 4 – Efeito do óleo funcional sobre concentração ruminal de propionato mmol/L de vacas leiteiras, em diferentes tempos após fornecimento da alimentação matinal.



Controle (—); óleo funcional (---) e monensina sódica (.....); horários de alimentação (↑).

Figura 5 – Efeito do óleo funcional sobre concentração ruminal de butirato mmol/L de vacas leiteiras, em diferentes tempos após fornecimento da alimentação matinal.



Controle (—); óleo funcional (---) e monensina sódica (.....); horários de alimentação (↑).

Figura 6 – Efeito do óleo funcional sobre concentração ruminal de AGCRT mmol/L de vacas leiteiras, em diferentes tempos após fornecimento da alimentação matinal.

5.3. Síntese de proteína microbiana

Não houve efeito ($P>0,05$) de óleo funcional ou monensina sódica sobre a excreção total de urina (L/dia), nitrogênio e proteína bruta microbiana e a eficiência de síntese de proteína microbiana em relação as vacas sem aditivos na dieta (Tabela 5).

Tabela 5 – Efeito do óleo funcional sobre a síntese de proteína microbiana de vacas leiteiras

Parâmetros	Tratamentos ¹			Média	EPM ²	P-valor
	CON	OF	MON			
		(L/dia)				
ETU ³	20,27	20,60	19,92	20,23	0,718	0,870
		Mmol/L				
Ácido úrico	2,78	2,89	3,16	20,23	0,718	0,411
Alantoína urina	16,84	18,86	18,83	18,18	0,935	0,510
Alantoína leite	0,22	0,24	0,22	0,23	0,018	0,749
		Mmol/dia				
Ácido úrico	51,67	56,48	57,82	55,30	2,760	0,612
Alantoína urina	339,99	366,46	379,19	361,88	21,872	0,639
Alantoína leite	6,21	6,62	6,05	6,29	0,512	0,826
Purinas totais	402,59	429,56	447,62	426,59	22,447	0,602
Purinas abs ⁴	482,69	521,69	546,33	516,91	32,054	0,608
		Porcentagem dos derivados purina				
Alantoína	85,85	84,98	84,35	85,04	0,959	0,633
		g/dia				
N microbiano	350,9	379,3	397,2	375,8	23,30	0,608
		mol/mol				
Al/Cre ⁵	2,57	2,75	2,80	2,71	0,165	0,739
Al+ÁcU/Cre ⁶	2,99	3,17	3,27	3,14	0,173	0,719
		Eficiência				
(gPB/kgNDT) ⁷	132,78	140,36	152,72	141,95	8,978	0,492
(gPB/kgMODR) ⁸	230,11	234,74	248,76	237,66	14,521	0,783
(gPB/McalEM) ⁹	42,46	45,42	49,86	45,91	2,797	0,387

¹Tratamentos: CON: controle; OF: óleo funcional; MON: monensina. ²EPM: erro padrão da média; ³ETU: excreção total de urina; ⁴Purinas abs: purinas absorvidas; ⁵Al/Cre: relação molar entre alantoína e creatinina na urina; ⁶Al+ÁcU/Cre: relação molar entre a soma de alantoína e ácido urico e a concentração de creatinina na urina. ⁷Gramas de proteína bruta microbiana por kg de nutrientes digestíveis totais. ⁸Gramas de proteína bruta microbiana por kg matéria orgânica degradável no rúmen. ⁹Gramas de proteína bruta microbiana por Mcal de energia metabolizável.

5.4. Parâmetros sanguíneos

A inclusão de óleo funcional ou monensina sódica não alterou ($P>0,05$) a concentração sanguínea de glicose, AST e GGT em relação às vacas que não receberam aditivos na dieta (Tabela 6). As vacas alimentadas com óleo funcional tiveram redução ($P<0,05$) da concentração de ureia sanguínea (34,21 mg/dL) em relação as vacas do tratamento controle (37,33 mg/dL) e com inclusão de monensina sódica (39,24 mg/dL), que não diferiram entre si.

Tabela 6 – Efeito do óleo funcional sobre parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras

Parâmetros	Tratamentos ¹			Média	EPM ²	P-valor
	CON	OF	MON			
	<i>mg/dL</i>					
Glicose	43,23	43,85	44,55	43,876	1,092	0,830
Ureia	37,33 ^a	34,21 ^b	39,24 ^a	37,100	0,902	<0,001
	<i>U/L</i>					
AST ³	66,92	70,80	68,58	68,764	1,167	0,173
GGT ⁴	29,10	29,51	30,62	28,357	2,417	0,417

¹Tratamentos: CON: controle; OF: óleo funcional; MON: monensina. ²EPM: erro padrão da média. ³AST: Aspartato aminotransferase; ⁴GGT: Gama glutamil transferase. Médias na mesma linha sobrepostas com letras semelhantes não diferem entre si pelo teste de diferença mínima significativa de Fisher à 5% de probabilidade.

5.5. Produção e composição do leite

Vacas alimentadas com óleo funcional ou monensina sódica apresentaram maior ($P<0,05$) produção de leite, proteína e lactose (kg/dia) em comparação às vacas do tratamento controle (Tabela 7). A produção de leite corrigida para 3,5% de gordura e secreção diária de gordura (kg/dia) não foram influenciados pelos tratamentos ($P>0,05$). De forma semelhante, não houve efeito dos tratamentos sobre eficiência de produção de leite (kg de leite/kg do CMS) e concentração de nitrogênio ureico do leite. Porém, vacas alimentadas com monensina sódica tiveram redução ($P<0,05$) da porcentagem de gordura do leite em comparação ao tratamento controle e redução da porcentagem de lactose comparado ao tratamento óleo funcional.

Tabela 7 – Efeito do óleo funcional sobre produção e composição do leite de vacas leiteiras

Parâmetros	Tratamentos ¹			Média	EPM ²	P-valor
	CON	OF	MON			
	kg/dia					
Produção de leite	25,92 ^b	27,13 ^a	27,17 ^a	26,69	0,659	<0,001
PLC 3,5%	26,54	27,39	27,03	26,99	0,683	0,188
Gordura	0,942	0,966	0,939	0,949	0,027	0,400
Proteína	0,780 ^b	0,808 ^a	0,813 ^a	0,800	0,020	0,006
Lactose	1,170 ^b	1,221 ^a	1,222 ^a	1,204	0,030	0,003
Eficiência ³	1,07	1,08	1,10	1,08	0,020	0,296
	Porcentagem					
Gordura	3,66 ^a	3,60 ^{a,b}	3,46 ^b	3,57	0,067	0,025
Proteína	3,01	3,01	3,00	3,00	0,013	0,475
Lactose	4,51 ^{a,b}	4,52 ^a	4,48 ^b	1,22	0,033	0,046
	mg/dL					
NUL ⁴	8,12	8,25	8,46	8,29	0,168	0,545

¹Tratamentos: CON: controle; OF: óleo funcional; MON: monensina. ²EPM: erro padrão da média. Eficiência (kg de leite/kg do CMS). ⁴NUL: nitrogênio ureico do leite. Médias na mesma linha sobrepostas com letras semelhantes não diferem entre si pelo teste de diferença mínima significativa de Fisher à 5% de probabilidade.

5.6. Balanço de nitrogênio e energia

O consumo de nitrogênio total, excreções de nitrogênio na urina e fezes e o balanço de N não diferiram ($P>0,05$) entre os tratamentos (Tabela 8). Entretanto, os tratamentos óleo funcional ou monensina sódica tiveram maior ($P<0,05$) secreção de nitrogênio no leite (g/dia). Os tratamentos não influenciaram as variáveis relacionadas ao balanço de energia ($P>0,05$; Tabela 9).

Tabela 8 – Efeito do óleo funcional sobre o balanço de nitrogênio de vacas leiteiras

Parâmetros	Tratamentos ¹			Média	EPM ²	P-valor
	CON	OF	MON			
Consumo (g/dia)						
Nitrogênio total	628,8	642,8	633,0	635,51	11,302	0,391
Excreção (Nitrogênio g/dia)						
Urinário	263,9	287,1	286,3	279,09	12,146	0,575
Fecal	190,2	186,3	180,8	185,05	4,820	0,476
Leite	122,2 ^B	126,7 ^A	127,5 ^A	125,48	3,123	0,006
Balanço (g/dia)						
Nitrogênio	36,55	40,68	38,40	32,20	13,690	0,762
Excreção (% Nitrogênio total consumido)						
Urinário	42,52	44,16	46,45	44,38	1,819	0,627
Fecal	30,73	29,52	28,75	29,66	0,664	0,221
Leite	19,72	19,78	20,19	19,90	0,371	0,418
Balanço (% Nitrogênio total consumido)						
Nitrogênio	5,60	6,54	2,27	4,80	2,103	0,642

¹Tratamentos: CON: controle; OF: óleo funcional; MON: monensina. ²EPM: erro padrão da média. Médias na mesma linha sobrepostas com letras semelhantes não diferem entre si pelo teste de diferença mínima significativa de Fisher à 5% de probabilidade.

Tabela 9 – Efeito do óleo funcional sobre o balanço de energia de vacas leiteiras

Parâmetros	Tratamentos ¹			Média	EPM ²	P-valor
	CON	OF	MON			
	Consumo (Mcal/dia)					
Energia Bruta	96,03	96,51	94,82	96,12	1,660	0,383
Energia Digestível	64,50	63,96	61,69	63,38	1,234	0,154
Energia Metabolizável	52,89	52,44	50,59	51,97	1,012	0,154
Energia Líquida	34,46	34,57	33,97	34,43	0,590	0,352
	Energia líquida (Mcal/dia)					
Balanço	6,09	5,92	5,67	5,90	0,432	0,767
Lactação	17,92	18,15	17,77	17,95	0,457	0,412
Mantença	10,15	10,19	10,16	10,17	0,106	0,350
	Mcal/Mcal					
EL _L /CED ³	0,28	0,28	0,29	0,28	0,006	0,596

¹Tratamentos: CON: controle; OF: óleo funcional; MON: monensina. ²EPM: erro padrão da média.

³Exigência de energia líquida de lactação pelo consumo de energia digestível (CED).

6. DISCUSSÃO

6.1. Consumo e digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes

Duffield et al. (2008b) em estudo metanalítico avaliaram os efeitos da utilização de monensina sódica sobre CMS em vacas leiteiras e relataram redução do consumo de matéria seca. No entanto, no presente estudo as vacas que foram alimentadas com óleo funcional ou monensina sódica apresentaram CMS similar às vacas que receberam o tratamento sem aditivo e não houve redução do consumo dos nutrientes avaliados. Ipharraguerre e Clark (2003) compilaram estudos com vacas em lactação e observaram que em 14 estudos, os quais avaliaram a inclusão de ionóforos em doses iguais ou inferiores a 350 mg/dia/animal, houve redução média de 0,3 kg/dia no CMS, o que representa 1,5% do consumo médio observado.

Os aditivos moduladores da fermentação ruminal podem atuar na redução do CMS, principalmente por aumentar a concentração de propionato ruminal (ALLEN, 2000). De acordo com este autor, os AGCC produzidos durante o processo fermentativo podem reduzir o consumo por aumentar a osmolaridade do ruminoretículo e pelos efeitos pós absorptivos, especialmente do propionato, os quais não estão completamente elucidados. Neste estudo, as vacas alimentadas com óleo funcional ou monensina sódica apresentaram maior concentração de propionato no rúmen ($P<0,05$; Tabela 4). De acordo com Allen (2014), o efeito metabólico do aumento de propionato foi observado em vacas leiteiras devido a oxidação hepática de propionato no fígado, o que pode reduzir o CMS, porém no presente estudo o aumento do propionato ruminal ($P<0,05$; Tabela 4) não foi suficiente para inibir o consumo. Ainda, como houve aumento ($P<0,05$) da produção de leite (Tabela 7) que provavelmente ocorreu em resposta ao aumento de propionato no rúmen e como a concentração total de AGCC não foi influenciada pelos tratamentos avaliados, presume-se que a osmolaridade ruminal não foi afetada.

O propionato contribui com 32 a 73% da gliconeogênese hepática, o qual é o principal precursor de glicose para o ruminante (SEAL; REYNOLDS, 1993). A concentração de propionato no rúmen está associada com os produtos finais do metabolismo de carboidratos e o balanço de energia em ruminantes (ELLIS et al., 2012). De acordo com Hayes et al. (1996), a utilização da monensina sódica na dieta

pode aumentar o propionato ruminal com possível aumento da gliconeogênese hepática, o que pode resultar em maior disponibilidade de glicose para o metabolismo animal.

No presente estudo, a glicemia das vacas não foi influenciada pela inclusão da monensina sódica ou óleo funcional na dieta ($P>0,05$; Tabela 6). O aumento do fluxo glicêmico sem alteração da concentração de glicose plasmática pode ser explicado pelo estímulo da liberação de insulina, o que pode resultar em menor concentração de glicose plasmática, com alteração da partição da glicose, priorizando órgãos com alta exigência, como a glândula mamária e o útero (ARIELI et al., 2001). Consequentemente, tem-se um aumento da captação de glicose pela glândula mamária com aumento da produção de leite ($P<0,05$; Tabela 7).

Tedeschi et al. (2003) relataram que a variabilidade do efeito da inclusão de monensina sódica sobre o consumo pode ser atribuída às diferenças na fase de lactação e que a redução no CMS é uma consequência do atendimento das exigências energéticas das vacas. Quando as vacas se encontram em balanço energético positivo (vacas de baixa produção ou no terço final de lactação) a inclusão de aditivos na dieta pode aumentar a disponibilidade de energia por unidade de alimento consumido, o que pode reduzir o consumo. Apesar das vacas do presente estudo estarem no terço médio de lactação a inclusão de monensina sódica ou óleo funcional na dieta não influenciou o consumo.

Eifert et al. (2005) estudaram o uso de monensina sódica (16 mg/kg da MS) na dieta de vacas no início da lactação, com produção média de 25 kg/dia e alimentadas com silagem de milho e não observaram diferença do CMS entre as vacas da dieta controle (17,3 kg/dia) e o tratamento com monensina sódica (17,8 kg/dia). Estes autores não observaram efeito da inclusão de monensina sódica na dieta sobre a produção do leite das vacas, provavelmente devido a dose utilizada e fase da lactação, já que as vacas apresentaram menor consumo do que no presente estudo (24,81 kg/dia). De forma semelhante, em estudo realizado com vacas no terço médio de lactação, ao avaliar a adição de monensina sódica ou lasalocida (24 mg/kg de MS), Martineau et al. (2007) não observaram efeito dos aditivos sobre o CMS (23,5 kg/dia), fermentação ruminal e produção de leite (36,6 kg/dia).

Akins et al. (2014) avaliaram a inclusão de monensina sódica (18 mg/kg) na dieta de vacas no terço médio de lactação contendo diferentes concentrações de amido e observaram aumento na produção de leite (41,1 vs 42,3 kg/dia), sem alterar o consumo (26,9 kg/dia). As vacas do presente estudo tiveram inclusão de monensina sódica e fase de lactação semelhantes, e, da mesma forma, não houve efeito dos tratamentos sobre o consumo (24,12 kg/dia da CMS).

Em um recente estudo conduzido para avaliar a adição de monensina sódica (30 mg/kg de MS) e óleo funcional (0,5 g/kg de MS de Essential®) na dieta de vacas no terço médio de lactação e alimentadas com silagem de milho, observou-se que o óleo funcional aumentou o CMS (15,3 vs 16,67 kg/dia) enquanto que a monensina reduziu o CMS (16,89 vs 15,57 kg/dia), quando comparados às dietas sem aditivo (MARTINS et al., 2015). O resultado de CMS do presente estudo é superior (24,12 kg/dia) devido principalmente a diferença de peso corporal médio (511 kg) e produção de leite (24,12 kg/dia) dos animais utilizados por Martins et al. (2015) e não houve diferença entre os tratamentos

De acordo com Mertens (1994), o CMS e a produção de leite são maximizados quando a ingestão de FDN é igual ou superior a $1,2 \pm 0,1\%$ do peso vivo para vacas no terço médio e final de lactação. Dietas excessivamente fibrosas limitam o consumo pelo enchimento ruminal mantendo o consumo de FDN (ALLEN, 2000). No presente estudo, o consumo de FDN das vacas não foi influenciado pelos tratamentos, os quais são ligeiramente superiores (1,37% do PV) aos valores preconizados por este autor. Este elevado consumo de FDN pode estar relacionado com a melhor digestibilidade da fibra dos alimentos volumosos utilizados, pois o pré-secado de azevém e a casquinha de soja são alimentos ricos em fibra, com baixo teores de lignina (Tabela 2).

Existem vários fatores que podem influenciar a digestibilidade aparente total dos nutrientes e o consumo em ruminantes alimentados com monensina sódica e/ou óleo funcional, que ainda não foram totalmente elucidados. É sempre importante considerar a fase da lactação, o volumoso, a produção de leite e a dose utilizada nestes estudos. No presente estudo não houve efeito dos aditivos sobre os coeficientes de digestibilidade da MS, MO, PB, EE e FDN ($P>0,05$; Tabela 3). De forma semelhante, Benchaar et al. (2006) estudaram a adição de óleo essencial (Crina

Ruminants[®]; 2 g/dia) e/ou monensina sódica (350 mg/dia) na dieta de vacas no terço médio de lactação e não observaram efeito dos aditivos sobre a digestibilidade da MS, MO e FDN. De acordo com Plaizier et al. (2000), a monensina sódica aumenta a digestibilidade aparente da FDN e FDA em vacas alimentadas com alta forragem, o que não ocorre em vacas alimentadas com dietas contendo alto teor de concentrado. Estes autores associaram o aumento da digestibilidade da FDN ao aumento do pH ruminal promovido pela adição de monensina. No presente estudo, foi utilizado 52% de concentrado na dieta e não foram observadas diferenças no pH ruminal com a utilização dos aditivos ($P>0,05$; Tabela 4, Figura 1).

Segundo Plaizier et al (2000), a adição de monensina reduz a degradação ruminal de proteínas da dieta e a concentração de amônia. De modo semelhante, Calsamiglia et al. (2007) descreveram que os óleos essenciais têm atividade antimicrobiana e que a monensina sódica tem capacidade de reduzir a deaminação e metanogênese. Com isso, há aumento do fluxo de proteínas para o intestino que podem ser digeridas e absorvidas, resultando em aumento da digestibilidade aparente total. Entretanto, no presente estudo não foi observado tal efeito. Gehman et al. (2008) e Oelker et al. (2009) também não observaram efeito ($P>0,05$) do uso da monensina sódica nas doses 20 e 16 mg/kg da MS em vacas no terço médio da lactação, alimentadas com silagem de milho como volumoso sobre a digestibilidade aparente total da MS e dos nutrientes.

6.2. Fermentação ruminal

O pH ruminal médio encontrado neste estudo pode ser considerado dentro da variação de 6,2 e 7,1, recomendada por Orskov (1988) para manter a motilidade ruminal e digestão da fibra, uma vez que em pH abaixo de 6,2 ocorreu inibição do crescimento das bactérias fibrolíticas. No presente estudo, a inclusão de óleo funcional ou monensina sódica na dieta não alterou o pH ruminal e consequentemente a digestibilidade da FDN não foi influenciada (Tabela 3). Hoover (1986) verificou em estudo *in vitro* que pH ruminal menor que 6,0 também pode reduzir a síntese de proteína microbiana (Tabela 5).

A manutenção do pH ruminal está diretamente relacionada à capacidade de produção de agentes tamponantes e à remoção dos AGCCs do ambiente ruminal (VAN SOEST, 1982). O menor pH ruminal (5,90; Figura 1), independentemente da inclusão de óleo funcional ou monensina sódica na dieta, foi observado 12 horas após a alimentação, o que sugere que os mecanismos fisiológicos de regulação do pH não foram influenciados pelos tratamentos avaliados.

Apesar do lactato ruminal não ter sido mensurado no presente estudo, houve uma estabilidade do pH ruminal, independente da inclusão dos aditivos nas dietas, uma vez que o teor de FDN utilizado na dieta basal (36,91%; Tabela 1) pode ter sido suficiente para manutenção da motilidade ruminal e ruminação das vacas (MERTENS, 2001).

Martineau et al. (2007) realizaram estudo com vacas leiteiras alimentadas com silagem de milho e inclusão de 24 mg/kg da MS de monensina sódica, com produção de leite média de 36,6 kg/dia, e não observaram diferenças entre os tratamentos sobre as variáveis de fermentação ruminal, com pH ruminal médio de 6,16 e concentração de N-NH₃ de 17,7 mg/dL. Este resultados são inferiores aos valores observados neste estudo com pH médio de 6,29 e N-NH₃ de 21,72 mg/dL.

Benchaar et al. (2006) realizaram uma pesquisa com adição de óleo essencial (Crina® Ruminants; 0 vs 2g/d) e de monensina sódica (0 vs 350 mg/dia) na dieta de vacas no terço médio de lactação e relataram aumento do pH ruminal para as vacas que receberam óleos essenciais (6,50) comparado a dieta sem óleo essencial (6,39) e menor concentração de N-NH₃ no rúmen de vacas que tiveram inclusão de monensina sódica na dieta (12,7 mg/100 mL), em relação a dieta sem aditivo (14 mg/100 mL). No presente estudo as vacas alimentadas com óleo funcional ou monensina sódica apresentaram pH e concentração de N-NH₃ no rúmen similares aos das vacas do tratamento controle.

A concentração de amônia no rúmen é importante para síntese de proteína microbiana (NAGARAJA et al., 1997). Satter e Roffler (1979) relatam que a concentração mínima de N-NH₃ deve ser 5 mg de NH₃/dL no líquido ruminal para não haver limitação da síntese microbiana, enquanto que para o máxima síntese microbiana são necessárias concentrações de 23 mg de N-NH₃/dL (MEHREZ; ORSKOV, 1978). A concentração média de 21,72 mg/dL de N-NH₃ no líquido ruminal

das vacas do presente estudo estão próximos ao valor estabelecido para máximo crescimento microbiano.

De acordo com Van Soest (1994), a monensina é eficiente em reduzir a degradabilidade ruminal da proteína, especialmente em dietas com alto teor de concentrado, com alta degradabilidade ruminal. No presente estudo, a concentração ruminal de NH_3 não foi influenciada pela inclusão de óleo funcional ou monensina sódica à dieta. No entanto, a concentração ruminal de ácidos graxos de cadeia ramificada foi reduzida com a inclusão de monensina sódica, o que não ocorreu com a utilização do óleo funcional (Tabela 4 e Figura 6). Mesmo com a redução do total de AGCRs, os quais são um indicativo do processo de síntese de proteína microbiana no rúmen, a mesma não foi influenciada pelo tratamento monensina (Tabela 5).

Calsamiglia et al. (2007) observaram que a utilização de Crina[®] Ruminants causa redução da concentração de ácidos graxos de cadeia ramificada e amônia, o que segundo estes autores sugere uma redução da deaminação no rúmen. Os ácidos graxos de cadeia ramificada originam-se da degradação ruminal da proteína dietética ou da reciclagem da proteína microbiana pela descarboxilação oxidativa de aminoácidos de cadeia ramificada (valina, leucina e isoleucina) (TEDESCHI et al., 2000). No presente estudo, a provável redução da degradação da proteína no rúmen no tratamento com monensina, pode ser indicada pela redução ($P < 0,05$) da concentração ruminal AGCR total (mmol/L; Tabela 4). Com a redução da degradabilidade ruminal e desaminação proteica da dieta com inclusão de monensina, há aumento da contribuição da proteína dietética na proteína microbiana. Segundo Verbic, (2002), como o perfil da proteína microbiana é melhor que o perfil da proteína não degradável no rúmen (PNDR) da dieta, neste caso pode ocorrer aumento da transaminação, resultando em aumento da concentração sérica de ureia (Tabela 6).

O provável aumento da degradabilidade da proteína dietética das vacas alimentadas com óleo funcional em relação às vacas que receberam monensina sódica parece não ter comprometido o suprimento de proteína metabolizável, ao considerar que a secreção de proteína no leite destas vacas, não diferiram entre si, mas foi superior a secreção das vacas que receberam o tratamento controle (Tabela 7).

As vacas alimentadas com a monensina sódica na dieta não tiveram alteração da concentração molar de propionato ($P>0,05$), no entanto, houve aumento da proporção molar do mesmo, sem diferir do óleo funcional ($P>0,05$; Tabela 4). A dieta com óleo funcional aumentou a concentração molar de propionato em relação os demais tratamentos e a proporção molar em relação ao tratamento controle ($P<0,05$). Vários estudos relatam aumento da concentração do propionato ruminal em vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo monensina sódica (NAGARAJA et al., 1981; BRODERICK, 2004; EIFERT et al., 2005; BENCHAAR et al., 2006; GEHMAN et al., 2008; OELKER et al., 2009; GANDRA et al., 2012; APPUHAMY et al., 2013; MCCARTHY et al., 2015). De acordo com McGuffey et al. (2001), as alterações do perfil fermentativo são efeitos das alterações da população bacteriana ruminal, devido a inibição do crescimento de bactérias gram positivas em detrimento das bactérias gram negativas. Assim, a suplementação com monensina sódica resulta na seleção de bactérias que produzem menos hidrogênio (H_2), acetato e butirato e mais propionato ruminal e adenosina trifosfato (RUSSELL; STROBEL, 1989). No presente trabalho, possivelmente, as mudanças dos parâmetros de fermentação ruminal com o uso de óleo funcional podem ter ocorrido por um mecanismo de ação semelhante ao da monensina sódica, o que pode justificar o aumento ($P<0,05$) do propionato ruminal (RICHARDSON et al., 1976; NAGARAJA et al., 1981).

Pesquisadores relatam em estudos que os óleos essenciais são efetivos contra bactérias gram positivas (SMITH-PALMER et al., 1998; CHAO; YOUNG, 2000; CIMANGA et al., 2002). Em estudo *in vitro* com uma mistura de óleos essenciais (orégano, alho e pimenta) foi relatado que estes composto reduziram a produção de uma das principais bactérias (*Butyrivibrio fibrisolvens*) responsáveis pela produção de acetato e butirato ruminal (PATRA; YU, 2015). Neste sentido, no presente estudo foi observado aumento de 8,28% na concentração do propionato ruminal e de 5,8% na proporção molar do propionato nas vacas que receberam óleo funcional em relação às vacas que receberam o tratamento controle. Este resultado sugere que o óleo funcional pode ter sido efetivo na seleção de bactérias gram positivas.

Neste estudo as vacas que receberam os tratamentos com óleo funcional ou monensina sódica não apresentaram efeito sobre a concentração ruminal do total de ácidos graxos de cadeia curta, acetato, butirato e valerato (Tabela 4). Ellis et al.

(2012), estudaram o efeito da dose de monensina sódica sobre a concentração ruminal de ácidos graxos de cadeia curta em bovinos de corte submetidos a dietas com alto teor de grãos e observaram que a cada 1 mg/kg de matéria seca de monensina sódica adicionada à dieta houve redução de 0,063 mol/100mol de acetato e aumento de 0,260 mol/100mol de propionato, sem efeito sobre a concentração total de ácidos graxos. Da mesma forma, no presente estudo, a adição de óleo funcional ou monensina sódica aumentou a proporção molar de propionato sem influenciar a concentração total dos AGCC's.

Em um estudo realizado por Broderick (2004), com vacas no terço inicial de lactação, a inclusão de monensina sódica na dieta (10,2 mg/kg da MS) reduziu as proporções molares de acetato e butirato ruminal, com aumento da proporção molar de propionato, sem afetar a concentração total de AGCC, o que resultou na redução da relação acetato:propionato, quando comparado ao tratamento controle. As reduções das proporções molares de acetato e butirato estão relacionadas ao aumento da proporção de propionato. No presente estudo, a inclusão de óleo funcional ou monensina sódica na dieta aumentou concentração de propionato ruminal (mmol/100mmol), porém não houve efeito sobre acetato e relação acetato:propionato no rúmen (Tabela 4).

Não houve interação entre tratamentos e tempo de coleta sobre as concentrações ruminais de acetato, propionato, butirato e AGCR total (Figuras 3, 4, 5 e 6). As maiores concentrações de AGCC's ocorreram entre 10 e 12 horas após a alimentação matinal. Na avaliação realizada às 8 horas, em relação àquelas realizadas às 6 e 10 horas após a alimentação, observou-se redução da concentração dos AGCC's no rúmen, provavelmente por esta avaliação coincidir com o horário de realização da ordenha no período da tarde.

6.3. Síntese de proteína microbiana

Variações na síntese de proteína microbiana estão associadas às mudanças no suprimento de energia e proteína para o animal, com consequência sobre o desempenho produtivo de vacas leiteiras (GONZÁLEZ-ROQUILLO et al., 2003). Em trabalho realizado com vacas leiteiras no terço médio de lactação, a inclusão de 16

mg/kg da MS de monensina sódica na dieta não influenciou a excreção total de derivados de purinas (297,6 mmol/dia) e a estimativa de PB microbiana (1168 g/dia; GEHMAN et al., 2008). Os resultados encontrados no presente estudo foram superiores aos apresentados por estes autores, com excreção total de 516,91 mmol/dia de derivados de purinas e estimativa de síntese de proteína microbiana de 2348,80 g/dia (Tabela 5).

Abdi et al. (2015) estudaram a inclusão de monensina sódica (24 mg/kg da MS) na dieta de vacas no terço médio de lactação com relação volumoso: concentrado 40:60. Assim como no presente estudo, os autores observaram que a inclusão de monensina sódica na dieta não influenciou o volume urinário, a excreção urinária de creatinina, derivados de purinas e a síntese de proteína microbiana ruminal. Resultados semelhantes foram observados por Ipharraguerre et al. (2005) e Gehman et al. (2008), os quais explicaram que foram coletadas amostras *spot* de urina, e que a excreção urinária foi estimada a partir da concentração de creatinina nas amostras e o peso corporal das vacas, da mesma forma que no presente estudo. As vacas que receberam monensina sódica apresentaram volume urinário similar aos que não receberam, o que pode ter contribuído para ausência de efeito da monensina sódica sobre a excreção dos derivados de purinas e, conseqüentemente, síntese de proteína microbiana ruminal.

Há poucos estudos sobre síntese de proteína microbiana e eficiência de síntese de animais alimentados com dietas contendo óleos essenciais. De acordo com Bach et al. (2005), a síntese de proteína microbiana pode ser influenciada por diversos fatores tais como concentração de carboidratos não fibrosos, proteína não degradável da dieta, pH ruminal, taxa de passagem e quantidade de matéria orgânica fermentada no rúmen. A dieta basal do presente estudo apresenta similar conteúdo de CNF e MO (Tabela 1) e pH ruminal (Tabela 4). Isso pode explicar porque os tratamentos não influenciaram a síntese de proteína microbiana ruminal.

Existem ainda outros fatores, como a alteração das populações de microrganismos ruminais que afetam as estimativas de síntese proteica quando as vacas são alimentadas com dietas contendo aditivos. Castro-Montoya et al. (2012) avaliaram os efeitos da adição de monensina sódica sobre a fermentação *in vitro* e observaram que a adição de monensina não influenciou a massa microbiana. No

entanto, houve aumento da relação entre proteína microbiana e bases purinas e, consequentemente, a concentração de bases purinas no meio foi reduzida. Estes autores associaram esta reduzida relação com os efeitos negativos da monensina sobre os protozoários, que, segundo Broderick e Merchen (1992) possuem aproximadamente metade do teor de purinas de bactérias. No presente estudo, foi utilizado um teor constante de purina na proteína bruta microbiana (11,6%) e portanto, se as observações de Castro-Montoya et al. (2012) se repetirem *in vivo*, a síntese microbiana pode ter sido subestimada.

6.4. Parâmetros sanguíneos

Em vacas lactantes a demanda de glicose é importante como fonte de energia e como contribuinte da síntese de lactose na glândula mamária (BICKERSTAFFE et al., 1974). Entretanto, no máximo 25% da disponibilidade total de glicose é absorvida e o restante seria obtido principalmente pela síntese hepática de propionato, lactato, aminoácidos e glicerol (YOUNG, 1977; GALINDO et al., 2011).

Segundo Duffield et al. (2008a), dependendo da fase de lactação e da dose de monensina sódica, a utilização deste aditivo nas dietas de vacas leiteiras pode resultar em aumento de 3% da concentração de glicose plasmática. No presente estudo não houve diferença para esta variável.

Nos ruminantes, o principal substrato para síntese de glicose é o propionato oriundo da fermentação ruminal de carboidratos (VAN SOEST, 1994). A alteração da fermentação ruminal com inclusão de aditivos na dieta pode aumentar a concentração de propionato no rúmen, o que aumenta a disponibilidade de propionato que chega ao fígado e que estimula a gliconeogênese com possível aumento dos níveis séricos de glicose (ELLIS et al., 2012). No entanto, a glicemia é regulada por um complexo sistema endócrino, no qual insulina, glucagon, catecolaminas, corticoesteróides e somatotropina atuam conjuntamente (MARQUEZ; RADEMACHER, 1999). Este controle hormonal faz com que a captação de glicose pelos tecidos e, principalmente, pela glândula mamária seja maior com o aumento da glicemia, reduzindo a utilização desta como indicador do metabolismo energético em vacas leiteiras (PAYNE e PAYNE, 1987). As vacas que receberam a inclusão de óleo funcional ou monensina

sódica no presente estudo apresentaram aumento da produção de leite e da secreção total de lactose ($P < 0,05$; Tabela 7), sem influenciar a glicemia ($P > 0,05$; Tabela 6).

Martineau et al. (2007) estudaram a inclusão de monensina sódica para vacas no terço médio de lactação, alimentadas com silagem de alfafa e gramíneas e relataram glicemia de 58,5 mg/dL. Da Silva et al. (2007) estudaram vacas no terço médio de lactação, alimentadas com silagem de milho e observaram concentração média de glicose plasmática de 66 mg/dL, ou seja, superiores a concentração média de glicose plasmática (43,87 mg/dL) encontrada neste estudo.

Para vacas alimentadas com óleo funcional houve redução significativa ($P < 0,05$) da concentração de ureia no sangue em relação às vacas que receberam os demais tratamentos (34,21 vs 43,89 mg/dL, respectivamente). De acordo com Green et al. (1999), Duffield et al. (1998), and Duffield et al. (2003), a inclusão de monensina sódica na dieta de vacas no início de lactação aumenta a concentração de ureia no sangue, o que pode estar associado ao aumento do fluxo de proteínas para o intestino delgado em função da redução da degradabilidade ruminal das proteínas (Hanson; Klopfenstein, 1979; Bergen; Bates, 1984). No presente estudo, a inclusão de monensina sódica reduziu a concentração de ácidos graxos de cadeia ramificada no rúmen (Tabela 4), o que indica redução da degradabilidade ruminal da proteína em relação a inclusão de óleo funcional.

Em uma metanálise para elucidar o efeito da monensina sódica sobre o metabolismo de vacas leiteiras, Duffield et al. (2008a) observaram aumento de 6% na concentração de ureia no sangue de vacas alimentadas com monensina sódica em relação as que receberam a dieta controle, o que não ocorreu no presente estudo. Além disso, a inclusão de óleo funcional reduziu a concentração sérica de ureia ($P < 0,05$; Tabela 6). Esta redução da concentração de ureia no soro de vacas alimentadas com óleo funcional pode estar associada ao aumento da produção de leite, sem alterações das concentrações de proteína e nitrogênio ureico no leite ($P > 0,05$; Tabela 7).

As concentrações plasmáticas das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e gamaglutamil transferase (GGT) não foram afetadas pela adição dos aditivos à dieta ($P > 0,05$; Tabela 6). Lassen (2007) descreveu que a AST pode ser utilizada como indicador de lesão hepática em ruminantes, pois a atividade

desta enzima aumenta em vacas com lesões hepáticas ou musculares e, portanto, a avaliação de uma enzima mais específica como a GGT é necessária na tentativa de identificar possíveis lesões hepáticas.

Como os resultados para AST e GGT no presente estudo foram semelhantes para os diferentes tratamentos, pode-se sugerir que os aditivos óleo funcional (Essential® Oligo Basics) ou monensina sódica não são tóxicos às vacas, o que demonstra segurança para suas utilizações. Outro estudo realizado com o mesmo óleo funcional também relatou a atoxidade deste composto (MARTINS et al., 2015).

6.5. Produção e composição do leite

A inclusão de óleo funcional ou monensina sódica na dieta das vacas aumentou a produção de leite ($P < 0,05$) em 1,22 kg/dia comparado à dieta controle (Tabela 7). McGuffey et al. (2001) revisaram 11 estudos com vacas suplementadas com monensina sódica e observaram aumento médio de 1,3 kg/dia na produção de leite, quando comparadas às que não receberam monensina sódica. Outras revisões relataram aumento de produção de leite de 1,5 kg/dia (IPHARRAGUERRE; CLARK, 2003) e 0,7 kg/dia (DUFFIELD et al., 2008b). O aumento médio de produção de leite (1,22 kg/dia) observado no presente estudo com a adição dos aditivos avaliados é semelhante aos observados nestas revisões.

A utilização de aditivos moduladores da fermentação ruminal altera a produção de leite por aumentar a concentração ruminal de propionato (ARIELI et al., 2001), que tem relação direta com a gliconeogênese hepática e com o aumento da síntese de lactose na glândula mamária (IPHARRAGUERRE; CLARK, 2003; ELLIS et al., 2012). A lactose é um dos principais componentes osmóticos do leite, pois com o aumento da secreção de lactose ocorre aumento da produção de leite ($P < 0,05$; Tabela 7).

Phipps et al. (2000) em estudo com vacas da raça Holandês no terço médio de lactação, avaliaram a inclusão de doses crescentes de monensina sódica (0, 150, 300 e 450 mg/dia) e observaram aumento médio de 2,6 kg/dia na produção de leite para as doses de 150 e 300 mg/dia e redução de 0,41% no teor de gordura do leite independentemente da dose de monensina adicionada na dieta. Estes autores associaram esta redução do teor de gordura à menor proporção molar de acetato no

rúmen. No presente estudo a inclusão de óleo funcional ou monensina sódica possivelmente não alterou a síntese de gordura e consequentemente a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura ($P>0,05$; Tabela 7), porém o tratamento monensina sódica reduziu o teor de gordura no leite ($P<0,05$; 3,66 e 3,46% para CON e MON, respectivamente).

A síntese e a secreção de gordura no leite ocorrem principalmente pela síntese de novo de ácidos graxos de cadeia curta, a partir do acetato e betahidroxibutirato, e da incorporação direta, especialmente de ácidos graxos de cadeia longa presentes na circulação sanguínea (Harvatine et al., 2009). Revisando os fatores que afetam o teor de gordura de vacas leiteiras, Maxin et al. (2011) observaram que de acordo com o aumento do acetato e butirato, ocorre redução do propionato, glicose e do teor de gordura no leite. No presente estudo, a redução do teor de gordura observado no tratamento com monensina sódica pode ser atribuída ao aumento da produção de leite e da proporção molar de propionato no rúmen e à redução da concentração ruminal de acetato (Tabela 4). A concentração de gordura no leite das vacas que receberam óleo funcional não diferiu ($P>0,05$) das vacas que receberam monensina sódica na dieta.

Martins et al. (2015) estudaram a adição de monensina sódica (30 mg/kg de MS) e/ou óleo funcional (0,5 g/kg de MS; Essential® Oligo Basics) na dieta de vacas no terço médio da lactação e relataram interação entre os efeitos dos aditivos para a produção de leite quando as vacas foram alimentadas com monensina sódica e óleo funcional. A inclusão do óleo funcional na ausência de monensina sódica aumentou a produção de leite em 2,16 kg/dia e na presença de monensina sódica, não influenciou a produção (20,05 kg/dia), enquanto que a monensina sódica não alterou a produção de leite, independentemente da inclusão do óleo funcional. O aumento da produção de leite observada por estes autores com a inclusão de óleo funcional também foi observado no presente estudo. Além disso, Martins et al. (2015) relataram que a monensina sódica reduziu o teor de gordura no leite, enquanto que o óleo funcional não influenciou, da mesma forma que no presente estudo.

Em estudo realizado com vacas na fase inicial da lactação, com produção média de 35 kg de leite/dia e alimentadas com silagem de alfafa foi avaliada a inclusão de 10 mg/kg da MS de monensina sódica (Broderick, 2004). Este autor observou

redução do teor de gordura no leite (3,15 vs 2,86%) e redução da produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (34,4 vs 32,2 kg/dia). Duffield et al. (2008b) relataram que a inclusão de monensina sódica reduziu o teor de gordura no leite em 0,12% e o teor de proteína, mas não alterou a produção de gordura. No presente estudo, a inclusão de óleo funcional não alterou ($P>0,05$) o teor de proteína no leite das vacas, mas aumentou ($P<0,05$) a produção de proteína e produção de leite. As vacas alimentadas com monensina sódica tiveram redução ($P<0,05$) do teor de gordura do leite, assim como relatado por estes autores.

A inclusão de óleo funcional ou monensina sódica na dieta não influenciou ($P>0,05$) a concentração de nitrogênio ureico no leite (NUL). De acordo com Chizzotti et al. (2007), o NUL pode ser utilizado como ferramenta para avaliar a adequação da nutrição proteica de vacas leiteiras. Butler (1998) relataram que quando o NUL é superior a 19 mg/dL pode reduzir a taxa de concepção em vacas leiteiras. Os resultados encontrados para os diferentes tratamentos no presente estudo foram de 8,29 mg/dL, apesar da redução da concentração plasmática de ureia (Tabela 6), provavelmente porque a principal via de excreção de compostos nitrogenados seja a urina (Tabela 8).

6.6. Balanço de nitrogênio

Poucos estudos têm relatado o efeito da monensina sódica sobre o balanço de nitrogênio em vacas leiteiras. Plaizier et al. (2000) e Ruiz et al. (2001) relataram que vacas alimentadas com monensina sódica apresentaram menor excreção fecal de N quando comparadas às vacas alimentadas com dieta controle sem inclusão de aditivo. Entretanto, assim como Benchaar et al. (2006), no presente estudo não houve diferença da inclusão dos diferentes aditivos na dieta das vacas sobre balanço de N. A excreção fecal de nitrogênio pode ser obtida a partir do consumo de nitrogênio (ou proteína bruta) e de sua digestibilidade aparente no trato total, os quais não foram afetados pela inclusão dos aditivos na dieta das vacas (Tabela 3).

A secreção de nitrogênio no leite aumentou ($P<0,05$) com a utilização dos aditivos em função do aumento da produção e da manutenção do teor de proteína no leite (Tabela 7). No entanto, a eficiência bruta de utilização do nitrogênio, obtida pela

relação entre o N secretado no leite e o N consumo, não foi influenciada pelas dietas avaliadas ($P>0,05$).

6.7. Balanço de energia

Não houve efeito dos aditivos avaliados sobre as variáveis relacionadas ao balanço de energia ($P>0,05$; Tabela 9). O consumo de energia não foi influenciado pelas dietas, da mesma forma que o consumo de matéria seca (Tabela 3), uma vez que a dieta basal era semelhante entre os tratamentos (Tabela 1).

A energia líquida utilizada para a produção de leite também não foi influenciada, pois apesar do aumento da produção de leite, os aditivos não afetaram a produção de gordura e a produção de leite corrigida (Tabela 7). A energia líquida utilizada para manutenção não foi influenciada, pois esta foi obtida a partir do peso corporal das vacas, o qual estava balanceado. Consequentemente, nem o balanço de energia, nem a eficiência de utilização da energia foram afetados pelos aditivos avaliados.

Gandra et al. (2012) avaliaram diferentes inclusões de monensina sódica (0; 24 e 48 mg/kg da MS) na dieta de vacas no terço médio de lactação e observaram redução linear do consumo de energia bruta, digestível, metabolizável e líquida de lactação. Mesmo sem observar alteração do peso corporal, os autores relataram ganho de eficiência, medida pela relação entre a energia líquida de lactação e o consumo de energia digestível. No presente estudo, não foi observado efeito dos aditivos sobre a eficiência de utilização da energia pelas vacas.

7. CONCLUSÃO

A inclusão de óleo funcional na dose de 500 mg/kg MS nas dietas aumentou produção de leite sem alterar a produção de leite corrigida e aumentou a concentração de propionato ruminal, sem modificar o consumo e a digestibilidade.

8. IMPLICAÇÕES

A utilização de óleo funcional (Essential® Oligo Basics) na dieta de vacas leiteiras, assim como a utilização de monensina sódica, aumentou a produção de leite

sem influenciar o consumo de vacas leiteiras com produção de 27 kg/dia. Embora os resultados produtivos sejam similares com uso de monensina sódica e óleo funcional, este último apresenta uma vantagem adicional com relação ao apelo social de biossegurança alimentar quando incluído nas dietas de vacas leiteiras, pois não é considerado um antibiótico.

Apesar de não ter sido realizado o custo do óleo diesel gasto pelo tratador durante a picagem do pré-secado de azevém, é importante levar em consideração o custo adicional no sistema de produção. Outro fator importante é o preço deste pré-secado adiquido no Paraná.

9. EXPERIÊNCIA NO EXTERIOR

A objetivo do estágio na Ohio State University (OSU) foi de aprender novas técnicas de biologia molecular aplicadas aos estudos de nutrição de bovinos para quantificar a síntese de proteína microbiana e consequentemente aplicar no Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite, porém por questões financeiras o Prof. Dr. Zhangtang Yu da OSU teve que mudar sua linha de pesquisa, a qual trabalhei em um estudo *in vitro* com bactérias ruminais envolvidas na deaminação de aminoácidos de origem da proteína dietética e produtoras de amônia no rúmen denominadas "hyper ammonia producing bacteria". Foram realizadas diversas tentativas para encontrar uma resposta que permitisse uma explicação biológica positiva ou negativa, mas o tempo de permanência não foi suficiente para alcançar este objetivo. Mesmo com contratempo esta viagem foi um divisor de águas na minha vida pessoal e acadêmica, acredito que o estudante de pós graduação deve fazer intercâmbio.

10. REFERÊNCIAS

ABDI, E.; FATAHNIA. F.; DEHGHAN BANADAKI, M.; AZARFAR, A.; MOSAVI, S. G. Effect of soybean roasting and monensin on microbial protein synthesis, ruminal parameters and plasma metabolites of lactating dairy cows. **Animal Production Science**, v. 55, p. 625–629, 2015.

AFONSO, E.; POTT, A. **Plantas no Pantanal tóxicas para bovinos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 32-33, 2001.

AKINS, M. S.; PERFIELD, K. L.; GREEN, H. B.; BERTICS, S. J.; SHAVER, R. D. Effect of monensin in lactating dairy cow diets at 2 starch concentrations. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 917–929, 2014.

ALLEN, M. S. Effects of Diet on Short-Term regulation of feed Intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1598-1630, 2000.

ALLEN, S. M.; PIANTONI, P. Carbohydrate nutrition managing energy intake and partitioning through lactation. **Vet Clin Food Anim** v. 30, p. 577–597, 2014.

AMORATTI, R.; PEDULLI, G. F.; VALGIMIGLI, L.; ATTANASI, O. A.; FILIPPONE, P.; FIORUCCI, C. SALADINO, R.. Absolute rate constants for the reaction of peroxy radical with cardanol derivatives. **Journal of Chemical Sciences**, v. 2, p. 2142-2146, 2001.

AOAC. **ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS**. Official methods of analysis. 17th edition. Gaithersburg, MD, USA, Association of Analytical Communities, 2000.

APPUHAMY, J. A. D. N; STRATHE, A. B.; JAYASUNDARA, S.; WAGNER-RIDDLE, C.; DIJKSTRA, J.; FRANCE, J. KEBREAB, E. Anti-methanogenic effects of monensin in dairy and beef cattle: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 1–13, 2013.

ARIELI, A.; VALLIMONT, J. E.; AHARONI, Y.; VARGA, G. A. Monensin and growth hormone effects on glucose metabolism in the prepartum cow. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2770–2776, 2001.

BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D. Nitrogen Metabolism in the Rumen, **Journal of Dairy Science**, v. 88, (E. Suppl.):E9–E21, 2005.

BAGG, R. Mode of action of ionophores in lactating dairy cattle. Usefulness of ionophores in lactating dairy cattle. In: SYMPOSIUM HELD, 1997, Ontario. **Proceedings...** Ontario:Ontario Veterinary College, 1997.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BEAUCHEMIN, K. A.; KREUZER, M.; O'MARA, F.; MCALLISTE, T. A. Nutritional management for enteric methane abatement: A review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 48, p. 21–27, 2008.

BELTRÃO, N. E. M.; MELO, F.B.; CARDOSO, G. D.; SEVERINO, L. S. **Mamona: Árvore do Conhecimento e Sistemas de Produção para o Semi-árido Brasileiro**. Campina Grande, PB: MAPA, p. 19, 2003.

BENCHAAAR, C.; CALSAMIGLIA, S; CHAVES, A.V.; FRASER, G. R.; COLOMBATTO, D.; MCALLISTER, T. A.; BEAUCHEMIN, K. A. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 209-228, 2008b.

BENCHAAAR, C.; CHOUINARD, P. Y. Short communication: Assessment of the potential of cinnamaldehyde, condensed tannins, and saponins to modify milk fatty acid composition of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 3392–3396, 2009.

BENCHAAAR, C.; MCALLISTER, T. A.; CHOUINARD, P. Y. Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or Yucca schidigera saponin extract. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 4765–4777, 2008a.

BENCHAAAR, C.; PETIT, H. V.; BERTHIAUME, R.; OUELLET, D. R.; CHIQUETTE, J.; CHOUINARD, P. Y. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 886-897, 2007.

BENCHAAAR, C.; PETIT, H.V.; BERTHIAUME, R.; WHYTE, T. D.; CHOUINARD, P. Y. Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 4352–4364, 2006.

BERGEN, W.G.; BATES, D.B. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. **Journal of Animal Science**, v. 58, p. 1465-1483, 1984.

BICKERSTAFFE, R., E. F. ANNISON, AND J. L. LINZELL. The metabolism of glucose, acetate, lipids and amino acids in lactating dairy cows. **Journal of Agricultural Science**, v. 82, p. 71–85, 1974.

BRODERICK, G. A, MERCHEN, N. R. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2618, 1992.

BRODERICK, G. A. Effect of low level monensin supplementation on the production of dairy cows fed alfalfa silage. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 359–368, 2004.

BRODERICK, G. A.; KANG, J. H. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. **J. Dairy Sci.**, v. 63, p. 64-75, 1980.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; CARDOZO, P.W.; KAMEL, C. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 2508-2516, 2005a.

BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 761-771, 2006.

BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; CARRO, M. D.; KAMEL, C. Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 4393-4404, 2005b.

BUTLER, W. R. Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2533-2539, 1998.

CALLAWAY, T. R.; EDRINGTON, T. S.; RYCHLIK, J. L.; GENOVESE, K. J.; POOLE, T. L.; JUNG, Y. S.; BISCHOFF, K. M.; ANDERSON, R. C.; DAVID J. NISBET. Ionophores: Their Use as Ruminant Growth Promotants and Impact on Food Safety. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 4 p. 43-51, 2003.

CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P. W.; CASTILLEJOS, L.; FERRET, A. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2580-2595, 2007.

CARDOZO, P. W.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 3230-3236, 2004.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 1914-1920, 2002.

CASALI, A. O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos *in situ*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 335-342, 2008.

CASTILLEJOS, L.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 2649-2658, 2006.

CASTILLEJOS, L.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; LOSA, R. Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from continuous culture system. **Animal Feed Science and Technology**, v. 119, p. 29-41, 2005.

CASTILLEJOS, L.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; LOSA, R. Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 132, p. 186-201, 2007.

CASTRO-MONTOYA, J. M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Effects of monensin on the chemical composition of the liquid associated microbial fraction in an *in vitro* rumen fermentation system. **Livestock Science**, v. 150, p. 414-418, 2012.

CHALUPA, W. Chemical control of rumen microbial metabolism. In: RUCKEBUSCH, Y.; THIVEND, P. **Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants**. Westport: ed. AVI Publishing Co, p. 325-347, 1980.

CHALUPA, W. Degradation of amino acids by the mixed rumen microbial population. **Journal of Animal Science**, v. 43, p. 828-834, 1976.

CHAO, S.C.; YOUNG, D.C. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, p. 856-62, 2000.

CHEN, G.; RUSSELL, J. B. More monensin-sensitive, ammonia producing bacteria from the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1052–1057, 1989.

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of technical details. (Occasional publication). Bucksburnd, Aberdeen: International Feed Research Unit; **Rowett Research Institute**, 1992. 21 p. (Occasional Publication).

CHIZZOTTI, M. L.; VALADARES FILHO, S. C.; VALADARES, R. F. D.; CHIZZOTTI, F. H. M.; MARCONDES, M. I.; FONSECA, M. A. Consumo, digestibilidade e excreção de uréia e derivados de purinas em vacas de diferentes níveis de produção de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 138-146, 2008.

CHIZZOTTI, M.L.; VALADARES FILHO, S.C.; TEDESCHI, L.O.; CHIZZOTTI, F.H.M.; CARSTENS, G.E. Energy and protein requirements for growth and maintenance of F1 Nellore x Red Angus bulls, steers and heifers. **Journal of Animal Science**, v. 85, p.1971-1981, 2007.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T. HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Correlation Between Chemical composition And Antibacterial Activity Of Essential Oils Of Some Aromatic Medicinal Plants Growing In The Democratic Republic Of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 213 – 220, 2002.

CONEGLIAN, S. M. **Uso de óleos essenciais de mamona e caju em dietas de bovinos**. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil.2009. 101p.

CORAH, L.R. Polyether ionophores: effects on rumen function in feedlot cattle. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 7, p. 127-132, 1991.

CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J M. Metabólitos secundários de espécies de anacardiaceae. **Química Nova**, v. 29, p. 1287-1300, 2006.

COUTINHO, D. A.; BRANCO, A. F.; SANTOS, G. T.; OSMARI, M. P.; TEODORO, A. L.; DIAZ, T. G. Intake, digestibility of nutrients, milk production and composition in dairy cows fed on diets containing cashew nut shell liquid. **Acta Scientiarum**, v. 36, p. 311-316, 2014.

CRANE, A.; NELSON, W. O.; BROWN, R. E. Effects of d-limonene and α -D-pinene on in vitro carbohydrate dissimilation and methane formation by rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 40, p. 1317-1323, 1957.

DA SILVA, D. C.; SANTOS, G. T.; BRANCO, A. F.; DAMASCENO, J. C.; KAZAMA, R.; MATSUSHITA, M.; HORST, J. A.; DOS SANTOS, W. B. R.; PETIT, H. V. Production performance and milk composition of dairy cows fed whole or ground flaxseed with or without monensin. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2928–2936, 2007.

DAVIDSON, P. M.; NAIDU, A. S. Phytophenols. In: Naidu, A. S. (ed), **Natural food Antimicrobial Systems**, p. 265-295, 2000.

DEVANT, M.; ARIS, A.; BACH, A.; TORRENT, J. Effect of a blend of castor oil and cashew nut shell liquid on performance, eating pattern, rumen health and carcass quality in Holstein bulls fed high-concentrate rations. **Journal of Animal Science**, v. 90, Supplement 3, p. 243, 2012.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308-316, 2000.

DUFFIELD, T. F., A. R. RABIEE, AND I. J. LEAN. A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 2. Production effects. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 1347-1360, 2008b.

DUFFIELD, T. F.; LEBLANC, S.; BAGG, R.; LESLIE, K.; TEN HAG, J.; DICK, P. Effect of a monensin controlled release capsule on metabolic parameters in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1171–1176, 2003.

DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; SANDALS, D.; LISSEMORE, K.; MCBRIDE, B. W.; LUMSDEN, J. H.; DICK, P.; BAGG, R. Effect of prepartum administration of monensin in a controlled-release capsule on postpartum energy indicators in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2354–2361, 1998.

DUFFIELD, T. F.; RABIEE, A. R.; LEAN, I. J. A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 1. Metabolic effects. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 1334-1346, 2008a.

EDMONSON, A. J.; LEAN, I. J.; WEAVER, L. D. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 68-78, 1989.

EIFERT, E. C.; LANA, R. P.; LANNA, D. P. D. Efeito do fornecimento de dietas com monensina sódica e óleo de soja no desempenho de vacas leiteiras na fase inicial de lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 2123-2132, 2005.

ELLIS, J. L.; DIJKSTRA, J.; BANNINK, A.; KEBREAB, E.; HOOK, S. E.; ARCHIBEQUE, S.; FRANCE, J. Quantifying the effect of monensin dose on the rumen volatile fatty acid profile in high-grain fed beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 2717–2726, 2012.

ERWIN, E.S.; MARCO, G.J.; EMERY, E.M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 44, p.1768-1771, 1961.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED STATES. **Food Outlook Biannual Report on global Food Markets**. Roma, ITA, p. 58-63, 2015.

FERREIRA, C.M.; ROSA, O. P. S.; TORRES, S. A.; FERREIRA, F. B. A.; BERNARDINELLI, N. Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. **Brazilian Dental Journal**, v.13, p.118-122, 2002.

FLACHOWSKY, G.; RICHTER, G. H. Growth promoters decrease Blue babies and nitrate-contaminated well water. Environ. Health N-excretion in fattening cattle. **Kraftfutter**, v 8, p. 37–39, 1991.

FREIRE, R.M.M. Ricinoquímica. In: AZEVEDO, D. M. de P.; LIMA, E. L. **O agronegócio da mamona no Brasil**, Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p. 295-335.

GALINDO, C. E.; OUELLET, D. R.; PELLERIN, D.; LEMOSQUET, S.; ORTIGUES MARTY, I.; LAPIERRE, H. Effect of amino acid or casein supply on whole-body, splanchnic and mammary glucose kinetics in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 5558–5568, 2011.

GALLARDO, M. R.; CASTILLO, A. R.; BARGO, F. Monensin for lactating dairy cows grazing mixed-alfalfa pasture and supplemented with partial mixed ration. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 644–652, 2005.

GANDRA, J. R.; NUNES GIL, P. C.; GANDRA, E. R. S.; DEL VALE, T. A.; BARLETTA, R. V.; ZANFERARI, F.; FERREIRA DE JESUS, E.; TAKIYA, C. S.; MINGOTI, R. D.; ALMEIDA, G. F.; PAIVA, P. G.; GOBESSO, A. A. O. Productive performance of simmental dairy cows supplemented with ricinoleic acid from castor oil. **Archivos de Zootecnia**, v. 63, p. 575-585, 2014.

GANDRA, J. R.; RENNO, F. P.; FREITAS JÚNIOR, J. E.; MATURANA FILHO, M.; BARLETTA, R. V. Balanço de nutrientes e perfil de ácidos graxos do leite de vacas leiteiras no terço médio e lactação suplementadas com monensina sódica. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, p. 1180-1196, 2012.

GEHMAN, A.; M.; KONONOFF, P. J.; MULLINS, C. R. ; JANICEK, B. N. Evaluation of nitrogen utilization and the effects of monensin in dairy Cows fed brown midrib corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 288-300, 2008.

GETACHEW, G.; CROVETTO, G.; FONDEVILA, M.; KRISHMAMOORTHY, U.; SINGH, B.; SPANGHERO, M.; STEINGASS, H.; ROBINSON, P.; KAILAS, M. Laboratory variation of 24h *in vitro* gas production and estimated metabolizable energy values of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 102, p. 169-180, 2002.

GHORBANI, B.; GHOORCHI, T.; AMANLOU, H.; ZEREHDARAN, S. Effects of Using Monensin and Different Levels of Crude Protein on Milk Production, Blood Metabolites and Digestion of Dairy Cows. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 24, p. 65-72, 2011.

GONZÁLEZ-ROQUILLO, M.; BALCELLS, J.; GUADA, J.A.; VICENTE, F. Purine derivative excretion in dairy cows: Endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic acid supply. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1282-1291, 2003.

GRAINGER, C., WILLIAMS, R.; ECKARD, R. J.; HANNAH, M. C. A high dose of monensin does not reduce methane emissions of dairy cows offered pasture supplemented with grain. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5300-5308, 2010.

GREEN, B. L., MCBRIDE, B. W.; SANDALS, W. D.; LESLIE, K. E.; BAGG, R.; DICK, P. The impact of the monensin controlled release capsule upon subclinical acidosis in the transition dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 333–342, 1999a.

GRIFFIN, S.G.; WYLLIE, S.G.; MARKHAM, J.L.; LEACH, D.N. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 14, p. 322-332, 1999.

HAMAD, F. B.; MUBOFU, E. B. Potential biological applications of bio-based anacardic acids and their derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 8569-8590, 2015.

HANSON, T. L. AND KLOPFENSTEIN, T. J. Monensin, protein source and protein levels for growing steers. **Journal Animal Science**, v. 48, p. 474 – 479, 1979.

HARVATINE, K. J.; ALLEN, M. S. Effects of fatty acid supplements on milk yield and energy balance of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1081–1091, 2006.

HARVATINE, K. J.; BOISCLAIR, Y. R.; BAUMAN, D. E. Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. **Animal**, v. 3, p. 40-54, 2009.

HAYES, D. P.; PFEIFFER, D. U.; WILLIAMSON, N. B. Effect of intraruminal monensin capsules on reproductive performance and milk production of dairy cows fed pasture. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1000-1008, 1996.

HEMSHEKHAR, M.; SINUTHA, K.; SEBASTIN SANTHOSH, M.; DEVARAJA, S.; KEMPARAJU, K.; VISHWANATH, B. S.; NIRANJANA, S. R.; GIRISH, K. S. An overview on genus *Garcinia*: phytochemical and therapeutical aspects. **Phytochemistry Review**, v. 10, p. 325–351, 2011.

HIMEJIMA, M.; KUBO, I. Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 418-421, 1991.

HINO, T. Action of monensin on rumen protozoa. **Nippon Chikusan Gakkaiho**, v. 52, p. 171–179, 1981.

HINO, T.; RUSSELL, J. B. Relative contributions of ruminal bacteria and protozoa to the degradation of protein in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 64, p. 248-261, 1986.

HOOVER, W. H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 40-44, 1986.

IPHARRAGUERRE, I. R.; CLARK, J. H. Usefulness of ionophores for lactating cows: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 106, p. 39-57, 2003.

IPHARRAGUERRE, I. R.; CLARK, J. H.; FREEMAN, D. E. Rumen fermentation and intestinal supply of nutrients in dairy cows fed rumen-protected soy products. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 2879–2892, 2005.

JEDLICKA, M. E.; PUREVJAV, T.; CONOVER, A. J. **Effects of Functional Oils and Monensin Alone or in Combination on Feedlot Cattle Growth and Carcass Composition**. 2009. 39p. Dissertação de mestrado (Animal Science) – Iowa State University, 2009.

JUVEN, B.J.; KANNER, J.; SCHVED, F.; WEISSLOWICZ, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 76, p. 626-631, 1994.

KAMRA, D. N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v. 89, p. 124 – 134, 2005.

KENWARD, M.; ROGER, J. Small Sample Inference for Fixed Effects from Restricted Maximum Likelihood. **Biometrics**, v. 53, p. 983-997, 1997.

KOHLERT, C.; VAN RENSEN, I.; MARZ, R.; SCHINDLER, G.; GRAEFE, E. U.; VEIT, M. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans. **Planta Medica**, v. 66, p. 495–505, 2000.

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes**. 3 ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2011. 212p.

KRAUSE, D. O.; RUSSELL, J. B. An rRNA approach for assessing the role of obligate amino acid-fermenting bacteria in ruminal amino acid degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 815-821, 1996.

KUBO, I.; MUROI, H.; HIMEJIMA M. Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 1016-1019, 1993.

KUBO, I.; NIHEI, K.; TSUJIMOTO, K. Antibacterial action of anacardic acids against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 51, p. 7624-7628, 2003.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P.; NYCHAS, G. J. E. A study of minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453-462, 2001.

LANGHOUT, P. New additives for broiler chickens. **Feed Mix-The International Journal on Feed, Nutrition and Technology**, v. 18, p. 24-27, 2000.

LASSEN, E.D. Avaliação laboratorial do fígado. In: THRALL, M.A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. cap. 23, p. 343-347.

LIMA, C.A.A.; PASTORE, G.M.; LIMA, E.D.P.A. Estudo da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) dos clones de cajueiro-anão precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação sobre microrganismos da cavidade bucal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, p. 358-362, 2000.

MACHADO GER, J.D.S.; LOPES, L.D., OLIVEIRA SILVA, R.M.D. **A perspectiva do biodiesel a partir do cultivo da mamona no Brasil**. XXVII Encontro Nacional de Engenharia de Produção (ENEGEP). Fortaleza-CE ABEPRO, 2006.

MARINO, C. T.; RUIZ-MORENO, M. J.; SCHULMEISTER, T. M.; CIRIACO, F. M.; HENRY, D. D.; MERCADANTE, V. R. G.; LAMB, G. C.; DILORENZO, N. Effects of extracts of cashew nut shell and castor oil on in vitro ruminal fermentation, gas production kinetics, and methane production. **Journal of Animal Science**, v. 91, E-Suppl. 2/*Journal of Dairy Science*, v.96, E-Suppl. 1, p. 237, 2013.

MARQUEZ, A. C.; RADEMACHER, M. A. Indicadores bioquímicos sanguíneos de los desequilibrios energéticos en ganado lechero. In: **Memórias del Seminario Internacional en Reproducción y Metabolismo de la vaca lechera**. Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Manizales, Columbia, 1999. p. 221-235.

MARSIGLIO, B.N. **Óleos funcionais em dieta de alto grão para ovinos e efeitos sobre a digestibilidade dos nutrientes, desempenho, características da carcaça e do músculo Longissimus dorsi**. 2012. 90p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.

MARTIN, C.; MORGAVI, D. P.; M. DOREAU, M. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. **Animal**, v. 4, p. 351-365, 2009.

MARTINEAU, R.; BENCHAAR, C.; PETIT, H. V. Effects of lasalocid or monensin supplementation on digestion, ruminal fermentation, blood metabolites, and milk production of lactating dairy cows. **Journal of dairy Science**, v. 90, p. 5714-5725, 2007.

MARTINS, M. F.; SARAN NETTO, A; LEME, P. R.; PINHEIRO, M. G.; TORRENT, J.; WELTER, K. C.; ARRUDA, I. Effects of funcional oils and monensin supplementation on ruminal fermentation and milk production and composition in Holstein cows under heat stress. **Journal of Animal Science**, v. 98, Suppl.2, (Abstr.), 2015.

MAXIN, G.; RULQUIN, H.; GLASSER, F. Response of milk fat concentration and yield to nutrient supply in dairy cows. **Animal**, v. 5, p. 1299-1310, 2011.

MAZZETTO, S. E.; LOMONACO, D.; MELE, G. Óleo da castanha de caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. **Química Nova**, v. 32, p. 732-741, 2009.

MCCARTHY, M. M.; YASUI, T.; RYAN, C. M.; PELTON, S. H.; MECHOR, G. D.; OVERTON, T. R. Metabolism of early-lactation dairy cows as affected by dietary starch and monensin supplementation. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 3351–3365, 2015.

MCGUFFEY, R. K.; RICHARDSON, L. F.; WILKINSON, J. I. D., Ionophores for dairy cattle: current status and future outlook. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p.194–203, 2001.

MCINTOSH, F. M.; WILLIAMS, P.; LOSA, R.; WALLACE, R. J.; BEEVER, D. A.; NEWBOLD, C. J. Effects of Essential Oils on Ruminal Microorganisms and Their Protein Metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5011-5014, 2003.

MEHREZ, Z.; ORSKOV, E. R. Protein degradation and optimum urea supplementary feed. **British Journal Nutrition**, v. 40, p. 337-345, 1978.

MERTENS, D. R. 1994. **Regulation of forage intake**. In: Forage Quality, Evaluation, and Utilization, G. C. Fahey, Jr, M. Collins, D. R. Mertens, and L. E. Moser, ed., American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, Madison, WI. p. 450–493.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 85, p. 1217-1240, 2002.

MERTENS, D.R. Physical effective NDF and its use in formulating dairy rations. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM BOVINOS DE LEITE, 2., 2001, Lavras. **Anais...** Lavras:UFLA-FAEPE, 2001. p. 25-36.

MORAIS, J. A. S.; BERCHIELLI, T. T.; REIS, R. A. Aditivos. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de Ruminantes**. 2 ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 565-599.

MUROI, H.; NIHEI, K.; TSUJIMOTO, K.; KUBO. I. Synergistic effects of anacardic acids and methicillin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Biorganic and Medical Chemistry**, v. 12, p. 583-587, 2004.

NAGABHUSHANA K. S.; SHOBHA, S. V.; RAVINDRANATH, B. Selective ionophoric properties of anacardic acid. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 807 – 810, 1995.

NAGARAJA, T. G., NEWBOLD, C. J.; VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER. D. I. **Manipulation of ruminal fermentation**. In: HOBSON, P.N. STEWART, C.S. (Eds). The Rumen Microbial Ecosystem. Blackie Academic e professional, p. 523-632, 1997.

NAGARAJA, T. G.; AVERY, T. B.; BARTLEY, E. E.; GALITZER, S. J.; DAYTON, A. D. Prevention of lactic acidosis in cattle by lasalocid or monensin. **Journal of Animal Science**, v. 53, p. 206–216, 1981.

NAGARAJA, T. G.; AVERY, T. B.; GALITZER, S. J.; HARMON, D. L. Effect of ionophore antibiotics on experimentally induced lactic acidosis in cattle. **American Journal Veterinary Research**, v. 46, p. 2444-2452, 1985.

NAIK, M. I.; FOMDA, B. A.; JAYKUMAR, E.; BHAT, J. A. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, p. 535-538, 2010.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requeriments of dairy cattle**. Seventh Revised Edition. Washington, D.C.: 2001. 381p.

NEWBOLD, C. J.; MCINTOSH, F. M.; WILLIAMS, P.; LOSA, R.; WALLACE, R. J. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 114, p. 105-112, 2004.

NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; WALKER-BAX, N. D. Potentiation by metal ions of the efficacy of the ionophores, monensin and tetronasin, towards four species of ruminal bacteria. **Fems Microbiol Letters**, v. 4, p. 161 – 167, 2013.

NOCEK, J.E. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility. A review. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 2051-2069, 1988.

NOVAK, A., G. CLARK, AND H. DUPUY. Antimicrobial activity of some ricinoleic acid and oleic acid derivatives. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 38, p. 321–324, 1961.

OELKER, E. R.; REVENEAU, C.; FIRKINS, J. L. Interaction of molasses and monensin in alfalfa hay or corn silage-based diets on rumen fermentation, total tract digestibility, and milk production by Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 270-285, 2009.

OLIVEIRA, A. S.; VALADARES, R. F. D.; VALADARES FILHO, S. C.; CECON, P. R.; RENNÓ, L. N.; QUEIROZ, A. C.; CHIZZOTTI, M. L. Produção de proteína microbiana e estimativa das excreções de derivados de purinas e de uréia em vacas lactantes alimentadas com rações isoproteicas contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-proteicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 1621-1629, 2001.

ORSKOV, E.R. **Nutrición proteica de los ruminantes**. Zaragoza, Acribia, 1988. 178p.

OWENS, F. N.; GOETSCH, A. L. 1993. Ruminal fermentation, In: **The Ruminant Animal: Digestive physiology and nutrition**. D. C. Church (Ed.) p. 145-171. Waveland press, New Jersey.

OWENS, F.N. Protein metabolism of ruminant animals. In: **The ruminant animal**. D.C. Church, ed. Waveland Press, Prospect Heights, IL. p. 227-249, 1988.

PARASA, L. S.; SUNITA. T.; RAO, K. B. Acetone extract of Cashew (*Anacardium occidentale*, L.) nuts shell liquid against Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by minimum inhibitory concentration (MIC). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 736-742, 2011.

PATRA, A. K.; YU, Z. Essential oils affect populations of some rumen bacteria *in vitro* as revealed by microarray (RumenBactArray) analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-13, 2015.

PAYNE, J. M.; PAYNE, S. **The metabolic profile test**. Oxford university press. New York, 1987. p. 233-236.

PHIPPS, R. H.; WILKINSON, J. I.; JONKER, L. J. Effect of monensin on milk production of Holstein-Friesian dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 2789-2794, 2000.

PLAIZIER, J. C.; MARTIN, A.; DUFFIELD, T. F.; BAGG, R.; DICK, P.; MCBRIDE, B. W.. Effect of a prepartum administration of monensin in a controlled-release capsule on apparent digestibilities and nitrogen utilization in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 2918–2925, 2000.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. Controle de microorganismos por agentes físicos y químicos. **Microbiología**. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, p. 145-162, 2004.

PUREVJAV, T. **Effects of functional oils and monensin on cattle finishing programs**. 106p. Dissertação em Fisiologia - Iowa State University, Ames, Iowa, 2011.

PUREVJAV, T.; HOFFMAN, M. P.; PAS, A. I.; CONOVER, A. J.; JEDLICKA, M. E.; PRUSA, K.; TORRENT, J.; PUSILLO, G. M. Effects of functional oils and monensin on cattle finishing programs. **The Professional Animal Scientist**, v. 29, p. 426–434, 2013.

REVENEAU, C.; RIBEIRO, C. V.; EASTRIDGE, M. L.; FIRKINS, J. L. Interaction of unsaturated fat or coconut oil with monensin in lactating dairy cows fed 12 times daily. II fatty acid flow to the omasum and milk fatty acid profile. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 2061-2069, 2012.

REYNOLDS C. K.; HUNTINGTON, G. B.; TYRRELL, H. F.; REYNOLDS, P. J. Net portal-drained visceral and hepatic metabolism of glucose, L-lactate and nitrogenous compounds in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 1803-1812, 1988.

REYNOLDS, C. K.; HARMON, D. L.; CECAVA, M. J. Absorption and delivery of nutrients for milk protein-synthesis by portal drained viscera. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2787–2808, 1994.

RICHARDSON, L. F.; RAUN, A. P.; POTTER, E. L.; COOLEY, C. O.; RATHMANCHER, R. P. Effect of monensin on rumen fermentation in vitro and in vivo. **Journal of Animal Science**, v. 43, p. 657-664, 1976.

RODRIGUES, P.H.M.; MATTOS, W.R.S.; MELOTTI, L. Monensina e digestibilidade aparente em ovinos alimentados com proporções de volumoso e concentrado. **Scientia Agrícola**, v. 58, p. 449-455, 2001.

ROGERS, M.; JOUANY, J. P.; THIVEND, P.; FONTENOT, J. P. The effect of short term and long term monensin supplementation and its subsequent withdrawal on digestion in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 65, p. 113–127, 1997.

RUIZ, R.; ALBRECHT, G. L.; VERBIC, L. O.; JARVIS, G.; RUSSELL, J. B.; FOX, D. G. Effect of monensin on the performance and nitrogen utilization of lactating dairy cows consuming fresh forage. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1717–1727, 2001.

RUSSELL, J. B. A proposed model of monensin action in inhibiting rumen bacterial growth: effects on ion flux and proton motive force. **Journal of Animal Science**, v. 64, p. 1507-1519, 1987.

RUSSELL, J. B. Mechanisms of ionophore action in ruminal bacteria. In: Symposium on animal health - scientific update on rumensin/tylan/micotil for the professional feedlot consultant, 1996, Amarillo. **Proceedings...** Amarillo: ELANCO, p. 315, 1996.

RUSSELL, J. B.; MARTIN, S. A. Effects of various methane inhibitors on the fermentation of amino acids by mixed rumen microorganisms in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 59, p. 1317-1329, 1984.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J. Effects of Additives on In Vitro Ruminal Fermentation: A Comparison of Monensin and Bacitracin, Another Gram-Positive Antibiotic. **Journal of Animal Science**, v. 66, p. 552-558, 1988.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J. Minireview: effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1-6, 1989.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J.; CHEN, G. The enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 872, 1988.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J.; CHEN, G. The enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 872, 1988.

RUSSELL, J. B.; WALLACE, R. J. Energy-yielding and energy-consuming reactions. In HOBSON, P. N. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. 2ed. Essex, England: Elsevier Science, p. 267-268, 1997.

RUSSELL, J.B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca, 2002. p. 119.

SATTER, L. D.; ROFFLER, R. E. Nitrogen requirements and utilization in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 58, p. 1212-37, 1979.

SAUER, F. D.; FELLNER, V.; KINSMAN, R. Methane output and lactation response in Holstein cattle with monensin or unsaturated fat added to the diet. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 906–914, 1998.

SAUER, F. D.; KRAMER, J. K. G.; CANTWELL, W. J. Antiketogenic effects of monensin in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 423-436, 1989.

SCHELLING, G.T. Monensin mode of action in the rumen. **Journal of Animal Science**, v. 58, p. 1518-1527, 1984.

SEAL, C. J.; REYNOLDS, C.K. Nutritional implications of gastrointestinal and liver metabolism in ruminants. **Nutrition Research Reviews**, v. 6, p. 185-208, 1993.

SEVERINO, L. S.; MILANI, M.; BELTRÃO, N. E. M. **Mamona: O produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006.

SHINKAI, T.; ENISHI, O.; MITSUMORI, M.; HIGUCHI, K.; KOBAYASHI, Y.; TAKENAKA, A.; NAGASHIMA, K.; MOCHIZUKI, M.; KOBAYASHI, Y. Mitigation of methane production from cattle by feeding cashew nut shell liquid. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 5308-5316, 2012.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 201-222, 1995.

SILVA, A. P. dos S. **Efeito da monensina, virginiamicina e dos óleos funcionais de mamona e caju em bovinos Nelores submetidos a mudança abrupta para dietas com elevado teor de concentrado**. Dissertação. 103 f. (Mestre em Qualidade e Produtividade Animal). Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

SKLAN, D.; ASHKENAZI, R.; BRAUN, A. Fatty acids, calcium soaps of fatty acids and cottonseeds fed to high yielding cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2463-2472, 1992.

SLYTER, L. L. Influence of acidosis on rumen function. **Journal of Animal Science**, v. 43, p. 899-910, 1976.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**. v. 26, p. 118-122. 1998.

STEWART, C. S.; BRYANT, M. P. The rumen bacteria. In: P.N. HOBSON (Ed.). **The Rumen Microbial Ecosystem**. p 21. Elsevier, Barking, Essex, UK, 1988.

STOKSTAD, E. L. R.; JUKES, T. H. Further Observations on the "Animal Protein Factor". **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 73, p. 523-528, 1950.

TEDESCHI, L. O.; CALLAWAY, T. R.; MUIR, J. P.; ANDERSON, R. C. Potential environmental benefits of feed additives and other strategies for ruminant production. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 291-309, 2011.

TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G.; RUSSELL, J. B. **Accounting for ruminal deficiencies of nitrogen and branched-chain amino acids in the structure of the Cornell net carbohydrate and protein system.** p. 224-238. In: Proceedings of Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers, Rochester, NY. New York State College of Agriculture & Life Sciences, Cornell University, 2000.

TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G.; TYLUTKI, T. P. Potential environmental benefits of ionophores in ruminant diets. **Journal of Environmental Quality**, v. 32, p. 1591-1602, 2003.

THORNTON, J. H.; OWENS, F. N. Monensin supplementation and *in vivo* methane production by steers. **Journal of Animal Science**, v. 52, p. 628-634, 1981.

TOKARNIA, C. H.; DÖBERREINER, J.; CANELLA, C. F. C. Intoxicação experimental em bovinos pelas folhas de *Ricinus communis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 10, p. 1-7, 1975.

TREVISAN, M. T.; PFUNDSTEIN, B.; HAUBNER, R.; WÜRTELE, G.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H.; OWEN, R. W. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p.188-97, 2006.

ULTEE, A.; BENNINK, M.H.J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1561-1568, 2002.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4606-4610, 1999.

VALERO, M. V.; PRADO, R. M. do; ZAWADZKI, F.; EIRAS, C. E.; MADRONA, G. S.; PRADO, I. M. do. Propolis and essential oils additives in the diets improved animal performance and feed efficiency of bulls finished in feedlot. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 36, p. 419-426, 2014.

VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. Effect of monensin on rumen metabolism *in vitro*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 34, p. 251-257, 1977.

VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I.; HENDERICKX, H. K. Effect of fatty acid derivatives on rumen methane and propionate *in vitro*. **Applied Microbiology**, v. 21, p. 365–366, 1971.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2. Ed. London. Constock Publishing Associates, USA, 476p, 1994.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminants**. Corvallis: O & Books, 1982. 373p.

VANDEHAAR, M. J.; ST-PIERRE, N. Major Advances in Nutrition: Relevance to the Sustainability of the Dairy Industry. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1280–129, 2006.

VASCONCELOS, J. T.; ELAM, N. A.; BRASHEARS, M. M.; GALYEAN, M. L. Effects of increasing dose of live cultures of *Lactobacillus acidophilus* (Strain NP 51) combined with a single dose of *Propionibacterium freudenreichii* (Strain NP 24) on performance and carcass characteristics of finishing beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 756-762, 2008.

VELLUTI, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Furarium proliferatum* in maize grain. **Food Microbiology**, v. 89, p.145–154, 2003.

VENDRAMINI, T. H. A. **Avaliação de Diferentes Aditivos na Alimentação de Vacas Leiteiras**. 2015. 79p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

VERBIC, J. Factors affecting microbial protein synthesis in the rumen with emphasis on diets containing forages. **Viehwirtschaftliche Fachtagung**, 24 - 25. April 2002.

VILLALBA, J.J.; PROVENZA, F.D. Challenges in extrapolating *in vitro* findings to *in vivo* evaluation of plant resources. In: VERCOE, P.E.; MAKKAR, H.P.S.; SCHLINK, A.C. (Ed.). ***In vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in**

ruminants: nuclear and related methodologies. London: Springer, cap. 11, p. 233-242, 2010.

WALLACE, R. J. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, p. 621–629, 2004.

WATANABE, Y.; SUZUKI, R.; KOIKE, S.; NAGASHIMA, K.; MOCHIZUKI, M.; FORESTER, R. J.; KOBAYASHI, Y. In vitro evaluation of cashew nut shell liquid as a methaneenhancing agent for ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5258-5267, 2010.

WEISS, W. P.; CONRAD, H. R.; PIERRE, N. R. S. T. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. **Animal Feed Science Technology**, v. 39, p. 95-110, 1992.

WENDAKOON, C. N.; SAKAGUCHI, M. Inhibition of Amino Acid Decarboxylase Activity of *Enterobacter aerogenes* by Active Components in Spices. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 280-283, 1995.

WILDMAN, E. E., JONES, G. M., WAGNER, P. E. A dairy body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p. 495-501, 1982.

YANG, C. M. J.; RUSSELL, J. B. Effect of monensin on the specific activity of ammonia production by ruminal bacteria and disappearance of amino nitrogen from the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 3250-3254, 1993.

YOUNG, J. W. Gluconeogenesis in cattle: Significance and methodology. **Journal of Dairy Science**, v. 60, p. 1–15, 1977.

ZAWADZKI, F. **Glicerina, antioxidantes e carotenóides sobre a qualidade e traçabilidade da carne de bovinos e ovinos.** Tese. 202 f. (Doutor em Zootecnia). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.

11. APÊNDICE

	Especificação Técnica Produto Acabado		Nº Doc.	QUA-ETPA.03
			Revisão	08
			Página	1 de 1
Elaboração	Gabriela Tavares	Qualidade	Data: 31/03/2015	
Aprovação	Lúcio A. L. de Oliveira	Diretor	Data: 31/03/2015	

1. Descrição do Produto, Indicação, Modo de Uso e Composição Básica

Produto: Essencial

Indicação: Aditivo Aromatizante destinado a fabricantes de produtos para alimentação animal.

Modo de Uso: Recomenda-se fazer uma mistura homogênea do produto com a ração, obedecendo à seguinte proporção de 1,5 kg por tonelada de ração. Para bovinos utilizar 0,5 gramas por quilo de matéria seca ingerida.

Composição Básica: LCC, Óleo de mamona, Vermiculita.

2. Apresentação do Produto, Validade e Condições para Armazenamento

Produto embalado em saco de papel Kraft multifoliado com uma lâmina interna de polietileno, com peso líquido de 15 kg.

Validade: 1 ano após data de fabricação.

Condições para armazenamento: Manter em lugar fresco, seco e protegido da luz solar. Para maior segurança manusear o produto com luvas de borracha. Evitar o contato do produto com o rosto e a pele.

3. Referências

Especificações internas (rotulagem e registro do produto).

Registro no MAPA: PR 08444-03001.

Diretiva 2002/32 CE do Parlamento Europeu e do Conselho

4. Níveis de Garantia

PARÂMETRO	ESPECIFICAÇÕES
Cardol	Mín. 40 g/kg
Cardanol	Mín. 200 g/kg
Ácido Ricinoleico	Mín. 90 g/kg

5. Plano de Amostragem

PARÂMETRO	ESPECIFICAÇÕES	PARÂMETRO	ESPECIFICAÇÕES
Arsênio	Máx. 2 mg/kg	Dioxina	Máx. 1 ng/kg
Cádmio	Máx. 1 mg/kg	Cardol	Mín. 40g/kg
Mercúrio	Máx. 0,1 mg/kg	Cardanol	Mín. 200 g/kg
Chumbo	Máx. 10 mg/kg	Ác. Ricinoleico	Mín. 90 g/kg

6. Histórico das Revisões

REVISÃO	DATA	RESPONSÁVEL	ALTERAÇÃO
00	29/08/2007	Lucio A. L. de Oliveira	Elaboração inicial
01	18/03/2009	Lucio A. L. de Oliveira	Indicação e modo de uso
02	15/12/2010	Lucio A. L. de Oliveira	Item 04 parâmetros.
03	20/06/2011	Elizandra M. Hamerski	Itens 1, 2, 4 e formatação.
04	03/12/2012	Gabriela Tavares	Alteração na formatação no item 1 – Modo de Uso.
05	27/11/2013	Gabriela Tavares	Inclusão das substâncias indesejáveis no item 4.
06	13/03/2014	Gabriela Tavares	Separação das tabelas dos parâmetros níveis de garantia e plano de amostragem
07	24/07/2014	Gabriela Tavares	Alteração da codificação ETPA-03 para QUA-ETPA.03.
08	31/03/2015	Gabriela Tavares	Inclusão dos Níveis de Garantia no Plano de Amostragem e exclusão dos parâmetros de pesticidas.