GUILHERME GOMES DA SILVA

**Utilização de óleos funcionais associado à enzima amilolítica na
alimentação de vacas em lactação**

Pirassununga

2017

GUILHERME GOMES DA SILVA

Utilização de óleos funcionais associado à enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de Concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Francisco Palma Rennó

Pirassununga

2017

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3533
FMVZ

Silva, Guilherme Gomes da
Utilização de óleos funcionais associado à enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação. / Guilherme Gomes da Silva. -- 2017.
112 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Palma Rennó.

1. Amilase. 2. Ionóforo. 3. Eficiência produtiva. 4. Óleos funcionais. I. Título.

ERRATA

SILVA, G. G. **Utilização de óleos funcionais associado à enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação.** [Use of functional oils associated with the amylolytic enzyme in feeding lactating cows]. 2017. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Página

Onde se lê

Leia-se

RESUMO

Resumo

RESUMO

SILVA, G. G. **Utilização de óleos funcionais associado à enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação.** [Use of functional oils associated with the amylolytic enzyme in feeding lactating cows]. 2017. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

ABSTRACT

Abstract

ABSTRACT

SILVA, G. G. **Use of functional oils associated with the amylolytic enzyme in feeding lactating cows.** [Utilização de óleos funcionais associado à enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação]. 2017. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Utilização de óleos essenciais associado à enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação", protocolada sob o CEUA nº 9762201015, sob a responsabilidade de **Francisco Palma Rennó e equipe; Guilherme Gomes da Silva** - 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 - está 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, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/08/2016.

We certify that the proposal "Use of essential oils associated with the amylolytic enzyme in the diet of lactating cows", utilizing 38 Bovines (38 females), protocol number CEUA 9762201015, under the responsibility of **Francisco Palma Rennó and team; Guilherme Gomes da Silva** - 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 - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as 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 (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/15/2016.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 10/2015 a 01/2016

Área: Nutrição E Produção Animal

Origem: Animais provenientes de outros projetos

Espécie: Bovinos

sexo: Fêmeas

idade: 24 a 72 meses

N: 38

Linhagem: Holandesa

Peso: 510 a 750 kg

Resumo: Na Busca por melhores índices produtivos exigidos pelo cenário lácteo atual, surgiram novas alternativas que influenciam positivamente o desempenho produtivo do animal, como por exemplo, a utilização de ionóforos na alimentação de bovinos. Dentre estes, podemos citar a Monensina, produto que atua na manipulação da fermentação ruminal, refletindo em melhores índices produtivos. Como os ionóforos são classificados como antibióticos e seu uso pode causar um impacto negativo na sociedade consumidora, produtos naturais vem sendo desenvolvidos e utilizados. Dentre estes produtos naturais, podemos citar a utilização de óleos essenciais (como por exemplo, o produto Crina® Ruminants, DSM-Tortuga), composto que inclui óleo de timol, eugenol, vanilina e limoneno.

O uso de enzimas exógenas na alimentação de vacas leiteiras ainda é limitado, porém seu uso é justificado pela busca de melhores índices produtivos e econômicos na atividade leiteira. Estudos já mostraram a efetividade do uso de enzimas amilolíticas exógenas no desempenho de vacas em lactação, devido ao aumento na produção de leite pela melhora na digestibilidade total de nutrientes e aumento do fluxo de proteína microbiana. Assim, o presente estudo será conduzido para avaliar a utilização de óleos essenciais (Crina® Ruminants, DSM-Tortuga), associado à enzima amilolítica exógena (RumiStar®, DSM-Tortuga) na alimentação de vacas leiteiras em lactação e será mensurado os efeitos sobre consumo e digestibilidade aparente total da matéria seca e nutrientes, fermentação ruminal e síntese de proteína microbiana, produção e composição do leite, concentrações de parâmetros sanguíneos e balanço de nitrogênio.

Local do experimento: Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite - FMVZ - USP Departamento de Nutrição e Produção Animal. Campus Fernando Costa - USP Pirassununga

São Paulo, 30 de setembro de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: DA SILVA, Guilherme Gomes

Título: Utilização de óleos funcionais associado à enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico a realização desta obra à minha família, em especial, meus pais, Rinaldo José da Silva e Sebastiana Gomes da Silva e minhas irmãs Lais e Laura Gomes da Silva

Reze e trabalhe, fazendo de conta que esta vida é um dia de capina com sol quente, que às vezes custa muito a passar, mas que sempre passa. E você pode ter um muito pedaço bom de alegria... Cada um tem sua hora e sua vez: você há de ter a sua.

Guimarães Rosa

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por oferecer condições para realização deste trabalho.

Agradeço os meus pais Rinaldo e Sebastiana pela excelente criação e pelo apoio nas decisões tomadas para alcançar meus objetivos. Estendo estes agradecimentos às minhas irmãs Lais e Laura Gomes.

Agradeço à minha família pelo apoio e torcida, e espero que entendam minha ausência em eventos comemorativos e momentos delicados.

Agradeço a Profa. Thalita Cucki, pela amizade e por me incentivar durante a graduação a seguir meus objetivos e me guiar da melhor maneira possível. De maneira similar, estendo estas palavras aos Professores Roberto de Andrade Bordin e Angélica Trazzi.

Agradeço ao casal Maria Thereza e José Rezende, meus primeiros orientadores de estágio, ao qual me ensinaram a excelência na condução da atividade leiteira, com excepcional dedicação e profissionalismo.

Agradeço ao Prof. Dr. Francisco Palma Rennó pela orientação, conselhos amizade, desde meados de 2013, quando tive a oportunidade de conhece-lo e a partir de 2014 fazer parte de seu grupo de pesquisa.

Agradeço ao Prof. Dr. Jose Luiz Moraes Vasconcelos (Zequinha), pelos ensinamentos, exemplo de conduta e amizade durante realização do estágio obrigatório.

Agradeço a Universidade de São Paulo (USP) por proporcionar estrutura física adequada para desenvolvimento das atividades ligadas à pesquisa e ao desenvolvimento intelectual de seus alunos. Agradeço especialmente a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (FMVZ-USP) e todos seus professores.

A todos os integrantes do Departamento de Nutrição e Produção Animal, professores e funcionários. Agradeço especialmente a Alessandra Terassi, Fabia Iaderoza e João Paulo pela ajuda, paciência e atenção que sempre tiveram comigo.

Agradeço as pessoas especiais que foram de extrema importância para condução dos experimentos, são eles Tiago Del Valle e Elmeson de Jesus, sem a ajuda deles, nada disso seria possível. Estendo estas palavras ao amigo Caio Takiya.

Agradeço a Nathalia Trevisan, pela ajuda indispensável na condução das análises laboratoriais, pela amizade, paciência, conversas e ensinamentos.

Agradeço a Bianca Nakadonari, aluna de iniciação científica que auxiliou durante a condução dos experimentos.

Agradeço todos amigos e funcionários do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) por fazerem parte desta conquista: Diogo, Schmidt, Dênis, Lucas, Dona Malvina, Leandro, Toquinho, Jorge e todos os outros que me ajudaram.

Agradeço as agências de pesquisa CAPES (processo: 2015/130335) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo: 2016/02445-8) pelo suporte financeiro

RESUMO

Foram realizados dois experimentos para comparar os efeitos da Monensina (MON, DSM Nutritional Products Ltd.), uma mistura de óleos funcionais (OF; Crina® Ruminants, DSM Nutritional Products Ltd.) isoladamente ou associado com enzima amilolítica (OFA; Crina-Ronozyme RumistarTM,.) em dietas de vacas em lactação. No experimento 1, oito vacas holandesas multíparas (576 ± 100 Kg peso corporal, e $146,5 \pm 35,1$ dias em lactação e $35.1 \pm 4,0$ kg/d de produção de leite no início do experimento) canuladas no rúmen foram distribuídas em quadrado latino replicado com períodos experimentais de 21 dias para determinar os efeitos da MON, OF e OFA sobre a digestibilidade dos nutrientes, fermentação ruminal, síntese de proteína microbiana, metabolitos sanguíneos, produção e composição do leite, utilização de energia e nitrogênio de vacas em lactação. Os tratamentos nos experimentos foram: controle (CON), sem aditivo; monensina (MON), adição de 13mg/Kg MS de monensina; óleos funcionais (OF), fornecimento de 44 mg Crina/Kg MS e óleos funcionais associado a enzima amilolítica (OFA), adição de 44 mg Crina/Kg e 330 KNU de enzima com atividade amilolítica por Kg de MS. Os dados foram analisados através de contrastes ortogonais para avaliar o efeito de aditivos (C1), comparar ionóforo com óleos funcionais (C2) e óleos funcionais isolados ou combinados com enzima amilolítica (C3). Embora não tenha sido encontrado efeito sobre a ingestão de nutrientes, os aditivos tenderam a aumentar ($P=0,058$) a digestibilidade da proteína bruta. No entanto, MON tendeu a aumentar ($P=0,085$) a digestibilidade da fibra em detergente neutro em comparação a OF e OFA. Os aditivos diminuíram ($P=0,026$) a concentração de nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_3\text{-N}$) no rúmen, notadamente a MON e OFA. Os tratamentos contendo OF apresentaram menor pH ($P=0,017$) e maior $\text{NH}_3\text{-N}$ no rúmen ($P=0,004$). Não foram encontradas diferenças na produção e composição do leite, mas o fornecimento de aditivos melhorou a eficiência produtiva ($P=0,004$). No experimento 2, trinta vacas multíparas da raça holandesa (574 ± 68 Kg peso corporal, $30.9 \pm 4,1$ Kg/dia de produção de leite e $152,2 \pm 54,1$ dias em lactação no início do experimento) foram distribuídas em um delineamento em blocos ao acaso em três tratamentos: MON, OF e OFA, previamente descrito no experimento 1. Os tratamentos foram proporcionados ao longo de 9 semanas. Contrates ortogonais foram utilizados para comparar MON com óleos funcionais isolados ou com amilase. Não foram observadas diferenças na ingestão de nutrientes e digestibilidade quando comparado MON com os tratamentos com OF. No entanto, tratamentos contendo óleos funcionais tendem a aumentar ($P=0,062$) a ingestão de MS das vacas. Não foi observado efeito de interação tempo tratamento. Os tratamentos contendo óleos funcionais

apresentaram menor teor de lactose e proteína no leite ($P \leq 0.039$) em comparação a MON. Concluindo, todos os aditivos tiveram pequeno efeito sobre a digestibilidade e ingestão de nutrientes, sem alterar a produção de leite das vacas. Contudo, os aditivos diminuíram a concentração de amônia ruminal, em especial a MON. Não foi encontrado efeito sinérgico quando se combinou óleos funcionais com enzima amilolítica.

Palavras chave: Amilase. Ionóforo. Eficiência Produtiva. Óleos Funcionais.

ABSTRACT

Two experiments were carried out to compare the effects of monensin (MON, DSM Nutritional Products Ltd.), a blend of functional oils (FO; Crina[®] Ruminants, DSM Nutritional Products Ltd.) alone or associated with amylolytic enzyme (FOA; Crina-Ronozyme Rumistar[™],) in a dairy cow diet. In experiment 1, eight multiparous Holstein cows (576 ± 100 kg LW, 146 ± 35 DIM, and 35.1 ± 4.0 kg/d milk yield at the start of experiment, cannulated in the rumen) were assigned into a replicated Latin square experiment design with 21-d periods in order to determine the effects of MON, FO or FOA on nutrient digestibility, ruminal fermentation, microbial protein synthesis, blood metabolites, milk yield and composition, energy and nitrogen utilization of dairy cows. Treatments in experiments were: control (CON), with no additive; MON, addition of 13 mg monensin/kg diet DM; FO, provision of 44 mg Crina/kg diet DM and FOA, addition of 44 mg Crina and 330 KNU of enzyme with amylolytic activity per kg diet DM. Data were analyzed through orthogonal contrasts to evaluate the effect of additives (C1), compare ionophore with functional oils (C2), and contrast functional oils alone or with amylolytic enzyme (C3). Although no effects were found on nutrient intake, additives tended to increase ($P=0.058$) crude protein digestibility. Yet, MON tended to increase ($P=0.085$) neutral detergent fiber digestibility in comparison with FO and FOA. Additives decreased ($P=0.026$) ammonia nitrogen concentration ($\text{NH}_3\text{-N}$) in rumen, notably due to MON and FOA. Treatments containing FO showed lower ($P=0.017$) pH and higher ($P=0.004$) $\text{NH}_3\text{-N}$ in rumen. No differences were found on milk yield and composition, but the provision of additives improved ($P=0.04$) productive efficiency ($\text{kg milk} \div \text{kg DM intake}$) of cows. In experiment 2, thirty multiparous Holstein cows (574 ± 68 kg LW, 152.2 ± 54.1 DIM and 30.9 ± 4.1 kg/d milk yield at the start of experiment) were assigned to a randomized block design experiment and distributed to three treatments: MON, FO or FOA, as previously described in Experiment 1. Treatments were provided throughout 9 weeks. Orthogonal contrasts were also used to compare MON with functional oils (C1) and essential oils alone or with amylase (C2). No differences were detected on nutrient intake and digestibility when comparing MON with FO-treatments. However, treatments containing functional oils tended to increase ($P=0.062$) DM intake of cows. No treatment by time interaction effect was observed. Treatments containing functional oils had lower ($P \leq 0.039$) lactose and protein content in milk than MON. In conclusion, all additives had small effect on nutrient intake and digestibility, without altering milk production of cows. Nonetheless, feed

additives decreased ammonia concentration in rumen notably because of MON. No synergetic effect was found when combining FO with amylolytic enzyme.

Key-words: Amylase. Ionophore. Productive Efficiency. Functional Oils.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
AGCR	Ácidos Graxos de Cadeia Ramificada
AGV	Ácidos Graxos Voláteis
CED	Consumo de Energia Digestível
CEL	Consumo de Energia Líquida
CMS	Consumo de Matéria Seca
CNF	Carboidratos Não Fibrosos
CON	Controle
DP	Derivados de Purina
ECC	Escore de Condição Corporal
EB	Energia Bruta
ED	Energia Digestível
EE	Extrato Etéreo
EL	Energia Líquida
EL _l	Energia Líquida da Lactação
EL _m	Energia Líquida de Manutenção
FAU	<i>Fungal Amylase Unit</i>
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDAi	Fibra em Detergente Ácido Indigestível
FDN	Fibra em Detergente Neutro
FDNi	Fibra em Detergente Neutro Indigestível
KNU	Kilo Novo Unit
MO	Matéria Orgânica
MON	Monensina
MS	Matéria Seca
N	Nitrogênio
N _{mic}	Nitrogênio Microbiano
NDT	Nutrientes Digestíveis Totais
N-NH ₃	Nitrogênio Amoniacal
OF	Óleos Funcionais
OFA	Óleos Funcionais e Amilase

PB	Proteína Bruta
PC	Peso Corporal
PLCG	Produção de Leite Corrigida para Gordura
UD	Unidade de Dextrinização

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ingredientes e composição bromatológica do concentrado e dieta basal utilizados no experimento.....	47
Tabela 2 - Efeito da utilização de monensina, óleos funcionais e enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a digestibilidade aparente total.....	57
Tabela 3 - Efeito da utilização de monensina, óleos funcionais e enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a fermentação ruminal.....	58
Tabela 4 - Efeito da utilização de monensina, óleos funcionais e enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a produção e composição do leite e eficiência produtiva	61
Tabela 5 - Efeito da utilização de monensina, óleos funcionais e enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre o balanço de energia, peso e ECC.....	62
Tabela 6 - Efeito da utilização de monensina, óleos funcionais e enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre o balanço de nitrogênio.....	63
Tabela 7 - Efeito da utilização de monensina, óleos funcionais e enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a síntese de proteína microbiana.....	64
Tabela 8 - Efeito da utilização de monensina, óleos funcionais e enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre o perfil metabólico sanguíneo.....	65
Tabela 9 – Ingredientes e composição bromatológica do concentrado e dieta basal utilizados no experimento.....	81
Tabela 10 - Efeito da utilização de monensina, óleos funcionais e enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre o perfil metabólico sanguíneo, produção e composição do leite e eficiência produtiva.....	87
Tabela 11 - Efeito da utilização de monensina, óleos funcionais e enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a digestibilidade aparente total.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Molécula de amilose composta por ligações glicídicas alfa-(1,4).....	35
Figura 2- Molécula de amilopectina, com pontos de ramificação alfa-(1,6).....	36
Figura 3- Efeito da utilização monensina, óleos funcionais e enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre o pH do fluido ruminal.....	60
Figura 4- Efeito da utilização monensina, óleos funcionais e enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH ₃).....	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	22
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
3.1	Aditivos.....	23
3.1.1.	Monensina.....	23
3.1.2	Mecanismo de ação da monensina.....	23
3.1.3	Estudos com monensina.....	24
3.1.4	Monensina e sua aceitação mundial.....	27
3.2	Óleos funcionais.....	28
3.2.1	Mecanismo de ação dos óleos funcionais.....	29
3.2.2	Estudos com óleos funcionais.....	31
3.3	Enzimas amilolíticas.....	35
3.3.1	Amido.....	35
3.3.2	Digestão do amido.....	38
3.3.3	Caracterização das enzimas amilolíticas exógenas.....	39
3.3.4	Estudos com enzimas amilolíticas exógenas na alimentação de vacas em lactação..	41
4	CAPÍTULO 1: UTILIZAÇÃO DE MONENSINA, ÓLEOS FUNCIONAIS E ENZIMA AMILOLÍTICA NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS EM LACTAÇÃO – FISIOLOGIA E DESEMPENHO PRODUTIVO.....	43
4.1	Introdução.....	44
4.1.2	Hipótese e Objetivos.....	45
4.1.3	Material e métodos	46
4.1.4	Local, animais e tratamentos	46
4.1.5	Consumo, digestibilidade aparente total e índice de seleção alimentar.....	48
4.1.6	Fermentação ruminal	50
4.1.7	Produção e composição do leite	51
4.1.8	Peso e ECC	52
4.1.9	Balanço de energia e nitrogênio	52
4.1.10	Síntese de proteína microbiana	54
4.1.11	Perfil metabólico	54
4.1.12	Análises estatísticas	55

4.2	Resultados	57
4.2.1.	Consumo, digestibilidade aparente total e índice de seleção alimentar	57
4.2.2	Fermentação ruminal	58
4.2.3	Produção e composição do leite	61
4.2.4	Balanço de energia, peso e ECC	62
4.2.5	Balanço de nitrogênio.....	63
4.2.6	Síntese de proteína microbiana	64
4.2.7	Perfil metabólico	65
4.3	Discussão	66
4.3.1.	Consumo, digestibilidade aparente total e índice de seleção alimentar	66
4.3.2	Fermentação ruminal	69
4.3.3	Produção e composição do leite	72
4.3.4	Balanço de energia, nitrogênio, peso e ECC	73
4.3.5	Síntese de proteína microbiana	74
4.3.6	Perfil metabólico	75
4.4.	Conclusão	77
5	CAPÍTULO 2: UTILIZAÇÃO DE MONENSINA, ÓLEOS FUNCIONAIS E ENZIMA AMIOLÍTICA NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS EM LACTAÇÃO - DESEMPENHO PRODUTIVO.....	78
5.1	Introdução.....	78
5.1.2	Hipótese e Objetivos.....	79
5.1.3	Material e métodos.....	80
5.1.4	Local, animais e tratamentos	80
5.1.5	Consumo, digestibilidade aparente total e índice de seleção alimentar	81
5.1.6	Produção e composição do leite	84
5.1.7	Peso e ECC	84
5.1.8	Perfil metabólico	84
5.1.9	Análises estatísticas	85
5.2	Resultados.....	86
5.2.1	Perfil metabólico, produção e composição do leite	86
5.2.2	Consumo, digestibilidade aparente total e índice de seleção alimentar	88
5.3	Discussão	89
5.3.1.	Perfil metabólico, produção e composição do leite	89

5.3.2	Consumo, digestibilidade aparente total e índice de seleção alimentar.....	90
5.4	Conclusão	93
6	REFERÊNCIAS	94

1 INTRODUÇÃO

A produção de ruminantes, no que diz respeito ao fornecimento de alimentos para o crescimento populacional mundial, busca maneiras de aumento da eficiência de utilização dos nutrientes a fim de maximizar o uso de terras agriculturáveis no mundo (KINGSTON-SMITH et al., 2013). Com o aumento da população mundial e do consumo alimentar médio em decorrência do aumento do poder 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).

Neste contexto, 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 e elevação do pH ruminal.

Porém, a União Europeia 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 derivados de plantas têm aumentado na nutrição animal, especialmente na nutrição de ruminantes. Maior ênfase 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 (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 (BENCHAAAR et al., 2006).

Ainda neste contexto de melhora no desempenho produtivo e considerando que o amido é um dos principais constituintes de dietas para vacas em lactação, a utilização de enzimas amilolíticas exógenas torna-se uma ferramenta essencial para busca de melhores índices produtivos. A adição de amilase exógena em dietas para vacas em lactação é um método para aumentar a digestibilidade ruminal do amido e outros carboidratos (TRICARICO et. a., 2008; DiLORENZO et. al., 2011). O mecanismo de ação das enzimas exógenas acontece em sinergismo com enzimas da microbiota ruminal, assim, as atividades e respostas dependerão da população de microrganismos ruminais (MORGAVI et. al., 2000).

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

A hipótese a ser avaliada neste estudo é que a inclusão de monensina e óleos funcionais às dietas apresentem resultados semelhantes e que a combinação de óleos funcionais e enzima amilolítica mostre efeito sinérgico positivo em variáveis produtivas.

O objetivo deste estudo foi comparar os efeitos de diferentes aditivos alimentares (monensina, óleos funcionais isolados ou combinados com enzima amilolítica) na ingestão de nutrientes e digestibilidade aparente total, fermentação ruminal, síntese de proteína microbiana, concentrações séricas de glicose e ureia, produção e composição do leite, balanço de nitrogênio e energia de vacas em lactação.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 - Aditivos

3.1.1 – Monensina

Dentre os ionóforos utilizados na alimentação animal, destaca-se a monensina, que teve seu uso empregado para aumento do desempenho produtivo após a Segunda Guerra Mundial (STOSTAD; JONES, 1950). Ionóforos, como a monensina, são compostos produzidos por bactérias, em especial, do gênero *Streptomyces cinnamonensis*, com característica lipofílica e toxicidade a muitos microrganismos, sendo assim definidos como antibióticos (HANEY & HOEHN, 1967).

Na década de 1970 foi aprovada a utilização de antibióticos ionóforos como aditivo na nutrição de ruminantes. Inicialmente, a monensina foi utilizada como anticoccidiostático na produção de aves (RUSSEL; STROBEL, 1989). Porém, estudos conduzidos por Richardson et al., (1976) demonstraram melhora na eficiência alimentar por alteração de parâmetros fermentativos quando se utilizou monensina na alimentação de ruminantes.

3.1.2 - Mecanismo de ação da monensina

Os ionóforos apresentam comprovado efeito contra bactérias gram positivas, porém, tem pouca ação sobre gram negativas, que possuem uma membrana externa com canais de proteína com tamanho limite próximo de 600 daltons (NAGAJARA et al., 1997). Segundo Corah (1991), os ionóforos podem apresentar peso molecular variando de 500 a 2000 daltons. Ainda, de acordo com Russel e Wallace (1997), bactérias gram positivas não apresentam membrana externa, o que permite ação dos ionóforos sobre as mesmas.

O movimento através das membranas celulares é alterado, pois a monensina, solúvel em lipídeos, desloca os íons carregados por facilitar o movimento destes através das membranas (MCGUFFEY et al., 2001). Os mesmos autores relatam que o cátion sódio (Na^+) apresenta-se em maior concentração no meio extracelular [quatro a cinco vezes mais, em comparação ao potássio (K^+)]. Porém, Russel e Strobel (1989) relataram que no meio intracelular o K^+ é o cátion predominante.

Além da afinidade da monensina por Na^+ , ocorre também translocação de K^+ e íons de hidrogênio (H^+). Assim, a primeira reação que ocorre quando a monensina se liga a membrana celular é a entrada de Na^+ e saída de K^+ por diferença no gradiente de concentração; na segunda reação, ocorre translocação de Na^+ para dentro e H^+ para fora da célula (RUSSEL, 1987; NEWBOLD et al., 2013).

Em estudo conduzido por Schelling (1984), foi proposto alguns mecanismos de ação da monensina, os quais resultam em melhora do desempenho produtivo de ruminantes, sendo eles: 1) mudança na produção de AGV's; 2) alteração na ingestão de alimentos; 3) mudança na produção de gases; 4) alterações na digestibilidade dos alimentos; 5) mudanças na taxa de passagem e enchimento ruminal e 6) alterações no mecanismo de utilização da proteína.

3.1.3 - Estudos com Monensina

A dose de monensina sódica para vacas leiteiras em diversas fases de lactação e submetidas a diferentes tipos de volumoso na dieta pode variar até 48mg/kg de MS (GALLARDO, et al., 2005; OELKER et al., 2009; GRAINGER et al., 2010, GANDRA, et al., 2012). Doses superiores a 48mg/kg de MS não são recomendadas, pois podem acarretar redução no desempenho produtivo (PLAIZIER et al., 2000). Segundo McGuffey et al. (2001); Ipharraguerre e Clark (2003) e Duffield et al. (2008a), a dose de monensina sódica para vacas leiteiras, independente do estado de lactação ou volumoso recebido é de 16mg/Kg a 24mg/kg de MS, sendo a última mais utilizada em dietas de vacas em lactação.

Estudo conduzido por Gandra et al. (2010), avaliando o fornecimento de doses crescentes de monensina sódica em dietas de vacas leiteiras em terço médio de lactação sobre diversos parâmetros, foi observado redução linear na ingestão de matéria seca, com maior eficiência produtiva quando se utilizou a dose de 24mg/kg de MS na dieta. Oelker et al. (2009), avaliando feno de alfafa e silagem de milho como volumoso para vacas em terço médio de lactação, suplementadas com 17mg/kg de MS de monensina observaram diferença ($P<0,05$) para produção de leite (38,4 vs 34,5 kg/dia) e digestibilidade da matéria seca (70,0 vs 64,7%), em comparação a dieta controle. Porém, não foi observado diferença no consumo

de matéria seca (21,7 vs 20,6 Kg/dia), respectivamente para silagem de milho e feno de alfafa.

Duffield et al. (2008b), em estudo metanalítico avaliando 77 experimentos, relatou que a suplementação com monensina em vacas leiteiras reduz em 0,3kg/dia o CMS e em 0,13% o teor de gordura no leite. Porém, foi observado aumento de 0,7 kg/dia na produção de leite, com consequente aumento de 2,5% na eficiência produtiva. Os mesmos autores relataram que os estudos apresentaram significativa heterogeneidade para as respostas. A melhora na digestibilidade da proteína quando se utiliza ionóforos pode estar relacionada com sua menor taxa de deaminação (RUSSELL; STROBEL, 1988). Assim, cepas bacterianas que apresentam resistência aos ionóforos podem converter peptídeos e aminoácidos em proteína microbiana (YANG; RUSSEL, 1993), resultando em melhor aproveitamento da proteína (RODRIGUES et al., 2001).

Relacionado a digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes, os estudos têm mostrados dados inconsistentes sobre o efeito da monensina sódica. Alguns pesquisadores têm relatado aumento da digestibilidade da fibra (SPEARS, 1990; OSBORNE et al. 2004). Este efeito pode estar relacionado ao aumento do pH resultante da suplementação com monensina, o que pode proporcionar melhor digestibilidade da fibra (VARGA, 1997). Foi observado aumento da digestibilidade da proteína de vacas leiteiras em início de lactação quando suplementadas com monensina (PLAIZIER et al., 2000). Porém, Da Silva et al. (2007) e Gehman et al. (2008) não observaram efeito da utilização de monensina sobre a digestibilidade da proteína em vacas leiteiras na mesma fase de lactação.

Mudanças nos parâmetros sanguíneos também são observadas quando se utiliza monensina em dietas de vacas em lactação, principalmente no metabolismo energético através da glicose, ácidos graxos não esterificados e β -hidroxibutirato. Em estudo conduzido por Da Silva et al. (2007), com adição de 20 mg/kg de MS em vacas leiteiras em fase inicial de lactação não foi observado efeito sobre colesterol total, HDL e triglicerídeos, com aumento nas concentrações de LDL em relação ao grupo controle.

Duffield et al. (2008 a) em estudo metanalítico sobre parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras suplementadas com monensina sódica, observou aumento de 3% na glicemia, 6% na concentração sérica de ureia, sem alterações em colesterol, insulina e cálcio no sague. No mesmo estudo, os autores observaram alterações na atividade das enzimas hepáticas

(asparato aminotransferase, gama glutamiltransferase e fosfatase alcalina); isso ocorreu devido ao aumento do aporte de propionato e aminoácidos para o fígado.

O aumento do propionato ruminal pode resultar em maior disponibilidade de glicose, acarretando em aumento da produção de leite (HAYES et al., 1996). O principal determinante para produção de leite é o suprimento de glicose para a glândula mamária. Assim, grandes quantidades de glicose são necessárias para atender os requerimentos da glândula mamária para síntese de lactose, proteína e gordura no leite (REYNOLDS et al., 1994). O processo de fermentação nos ruminantes ocorre pela ação de bactérias presentes no ambiente ruminal, com conversão de componentes da dieta em AGCC, proteína microbiana, vitaminas, amônia, metano, dentre outros (OWENS; GOETSCH, 1993). Porém, a fermentação ruminal pode apresentar perdas, em especial no metabolismo energético, pois ocorrem produção de metano e calor e estes não são utilizados pelo animal (CALLAWAY et al., 2003).

Sabendo que a monensina atua na seleção de bactérias gram negativas (RUSSEL; WALLACE, 1997), ocorrem modificações na produção de AGCC no rúmen. Em estudo realizado por McGuffey et al. (2001), foi relatado alterações nas concentrações de AGCC, redução na produção de gás carbônico e metano. Em vários estudos, foi relatado aumento da proporção molar de propionato (NAGAJARA 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 estudo conduzido com vacas em terço médio de lactação suplementadas com 24mg/kg de MS de monensina, alimentadas com silagem de milho na proporção volumoso:concentrado de 35:65, os autores observaram que houve redução de 19% na 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 não influenciou o CMS das vacas, mas observou-se que vacas alimentadas com monensina tiveram aumento de 2,5 mg/dL na glicemia e de 10% na concentração molar de propionato, no entanto, relatou que adição de monensina 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.

3.1.4 - Monensina e sua aceitação mundial

Apesar da utilização da monensina ser liberada em alguns países, há questionamentos por parte da Sociedade consumidora, pois este aditivo é classificado como antibiótico. Segundo a FAO (*Food and Organization of the United States Nations*), o limite máximo para a presença de monensina no leite é da ordem de 2µg/l. Estudo conduzido por Bagg et al. (2000) com vacas leiteiras em início de lactação suplementadas com doses crescentes de monensina, 72, 144 e 240mg/kg de MS, não foi detectado resíduos que caracterizem risco a saúde humana, sendo que na dose de 240mg/kg por MS, 10 vezes a dose usual recomendada, o valor residual foi de 5ng/L.

No Brasil, a monensina tem seu uso liberado para dietas de ruminantes em crescimento, terminação e vacas lactantes (OLIVEIRA et al., 2005). Já na União Europeia, foi proibido a utilização de antimicrobianos promotores de crescimento (Regulamentação 1831/2003/EC), com inclusão dos ionóforos antibióticos.

3.2.1. – Óleos Funcionais

Na busca por alternativas naturais para modulação da fermentação ruminal, os óleos funcionais ou essenciais, como também são conhecidos, têm despertado interesse em dietas de ruminantes e sua utilização é crescente. Apesar do conhecimento de mais de 50 anos acerca da utilização de óleos essenciais em dietas de ruminantes, sua utilização foi desestimulada pelo uso de ionóforos (CRANE, 1957). A utilização de óleos essenciais pode ser uma alternativa para melhor utilização dos nutrientes, desempenho e redução dos efeitos ambientais em na produção de ruminantes (GIANNENNAS et. al., 2011).

Os óleos funcionais são compostos obtidos por destilação a vapor ou extração por solvente a partir de folhas, flores, caules e sementes de plantas. O produto Crina® Ruminants inclui na sua composição uma mistura de óleo de timol, eugenol, vanilina, guaiacol e limoneno (MCINTOSH et. al., 2003; CASTILLEJOS et. al., 2005).

Vários óleos essenciais com diferentes princípios ativos já possuem seu mecanismo de ação conhecido e os métodos para extração destes 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 guáiaço ou óleo de cravo-da-índia) (VELLUTI et al., 2003; CASTILLEJOS et al., 2005).

De acordo com De Gess et al. (1997), houve intensificação nas pesquisas com utilização de óleos essenciais nos últimos anos por dois principais motivos: encontrar alternativas naturais ao uso de aditivos classificados como antibióticos na alimentação animal e pelo aumento da preocupação dos efeitos ambientais causados pela produção animal.

3.2.2 - Mecanismo de ação dos óleos funcionais

Os óleos essenciais apresentam mecanismo de ação semelhante aos ionóforos, com atuação, em sua maioria, associada a membrana celular, transporte de elétrons e gradiente de íons, translocação de proteínas, fosforilações e outras reações enzimáticas (DORMON & DEANS, 2000). Apresentam atividade antibacteriana seletiva de acordo com os compostos utilizados em sua produção (JANSSEN et al., 1986; LIS-BALCHIN e DEANS, 1997; DEMETZOS et al., 1997). 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).

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 terpenóides e compostos fenólicos (CHAO; YOUNG, 2000). Porém, o exato mecanismo de ação, que proporciona aos óleos essenciais 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). 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, resultando em 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 são: 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 também que os óleos essenciais têm 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). Assim, 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 pela ligação às proteínas, inibindo a ação da aminoácido-descarboxilase (WENDAKOON; SAKAGUCHI, 1995).

Levando em consideração a grande quantidade de substâncias químicas que compõem os óleos essenciais, a atividade antimicrobiana pode não ser mediada por apenas um único mecanismo de ação específico, ocorrendo sinergia entre os mecanismos encontrados nos diversos metabólitos (CARSON et al., 2002; BAKKALI et al., 2008). Neste sentido, os efeitos aditivos ou antagônicos também são possíveis de ocorrer (BURT, 2004).

Quando a membrana celular interage com o óleo essencial, ocorre alteração estrutural, o que as tornamais permeáveis (SIKKEMA et al., 1995), comconsequente extravasamento de íons e conteúdos citoplasmáticos (LAMBERT et al., 2001; CARSON et al., 2002). Tais mudanças promovem a formação de canais na membrana e alterações na estrutura física, tais como expansão e instabilidade, aumentoda fluidez e a permeabilidade (ULTEE et al., 2002).Segundo Burt (2004) compostos que contém grupo hidroxila interagem com as proteínas da membrana celular da bactéria, o que leva à ruptura e morte desta. Novak et al. (1961) verificaram que o ácido ricinoléico inibiu o crescimento da bactéria gram positiva *Micrococcus pyogenes* e fungos *Alternariasp.*, *Penicillium sp.* e *Aspergillus sp.*

Os óleos essenciais apresentam maior efetividade contra bactérias gram positivas, pois a membrana celular interage direto com os componentes hidrofóbicos do composto (SMITH-PALMER et al., 1998; CHAO; YOUNG, 2000; CIMANGA et al., 2002; BURT, 2004), os efeitos sobre as gram negativas também são relatados, embora em menor proporção (GRIFFIN et al., 1999). A camada externa das gram negativas é rica em lipopolissacarídeos, promovendo proteção extra contra várias substâncias (RUSSELL, 1989), 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, uma vez que não são totalmente impermeáveis a compostos hidrofóbicos. Carvacrol e timol, substâncias que apresentam baixo peso molecular, podem interagir com a água via pontes de hidrogênio e por difusão, passarem 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).

3.2.3 - Estudos com óleos funcionais

Crane et. al. (1957) foram pioneiros na avaliação da utilização de óleos essenciais sobre a fermentação ruminal, e verificaram que o limoneno e pineno foram capazes de inibir a formação de metano. Em revisão de literatura realizada por Calsamiglia et al. (2007) compilando dados de estudos em *in vitro* e *in situ* sobre efeitos ruminiais, conclui-se que as utilizações de óleos essenciais inibem a desaminação e metanogênese, resultando em menores concentrações de NH₃, metano e acetato e maiores concentrações de propionato e butirato. Porém, estas respostas são dependentes do óleo essencial que está sendo utilizado e suas possíveis combinações, além da dieta e pH ruminal a qual estes compostos estão sendo submetidos.

Chaves et al (2008) relataram que os óleos essenciais apresentaram efeitos semelhantes à monensina sobre as concentrações de AGCC no rúmen, com aumento de propionato e diminuição na relação acetato:propionato. Já Castillejos et al. (2005) em estudo conduzido *in vitro* utilizando fermentadores de cultura contínua, observaram aumento da concentração total de AGCC, sem mudanças na proporção molar individual.

McIntosh et al. (2003) trabalhando com monensina e óleos essenciais em estudo *in vitro* relataram diminuição da produção de NH₃ no líquido ruminal, isto ocorreu segundo os autores, porque ambos compostos atuaram inibindo o mesmo grupo de bactérias. Este grupo de bactérias apresentam atividade deaminativa bem desenvolvida e são significativamente

responsáveis pela produção de amônia ruminal (RUSSEL et al., 1988). Estes mesmos pesquisadores, em estudo com técnica de isolamento, identificaram que as bactérias do gênero *Streptococcus* spp. e *Clostridium* spp., produziram de 18 a 39 vezes mais amônia que outras espécies presentes no ambiente ruminal. Ambas são gram negativas, dependentes de aminoácidos para multiplicação (MCGUFFEY et al., 2001).

De maneira geral, não houve mudanças no pH ruminal em estudos com óleos essenciais (NEWBOLD et al., 2004; CASTILLEJOS et al., 2007). De maneira similar, não foi relatado alterações no metabolismo proteico ruminal em estudos *in vitro* (CASTILLEJOS et al., 2005, 2007) e estudos *in vivo* com vacas em terço médio de lactação (BENCHHAAR et al., 2006, 2007).

Tassoul e Shaver (2009) não observaram efeito na produção de leite em estudo conduzido com vacas em início de lactação. Já Kung et. al., (2008) observaram aumento da produção de leite em estudo conduzido com vacas em estágio médio de lactação. Não foi observado mudanças na produção de leite de vacas suplementadas com 2g/dia do produto Crina® Ruminants, porém, quanto a composição do leite, houve diferença na concentração de lactose, com maior produção deste componente pelos animais suplementados com o aditivo (Benchaar et al., 2006b).

Benchaar et al. (2006a) realizaram um estudo com a inclusão 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 e observaram aumento do pH ruminal para o grupo suplementado com a mistura de óleos (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). Não foram observados efeitos das dietas sobre concentrações de AGCC total e proporções destes individualmente, sobre produção e composição do leite, digestibilidade aparente da MS, MO e FDN. Porém, os autores relataram 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.

Estudo conduzido por Vendramini et al. (2015) com vacas em terço médio de lactação, 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), não foi observado diferença entre os tratamentos sobre a produção (31,26 kg/dia) e composição do leite e CMS. Porém, os animais que foram suplementados com o

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

Em outro estudo utilizando Crina[®] Ruminants, Benchaar et al. (2007) utilizaram doses de 0 e 750 mg/kg deste produto na dieta de vacas em início da lactação alimentadas com silagem de milho e alfafa. Não foram observados efeitos do óleo essencial sobre a produção de leite, CMS, concentração ruminal de nitrogênio amoniacal (N-NH₃), e consideraram tendência de aumento do pH ruminal 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.

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; 0,5 g/kg da MS de óleo funcional (Essential[®] Oligo Basics). 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).

Ferreira de Jesus et al. (2016) conduziram um estudo para avaliar a utilização de óleos funcionais em dietas de vacas em lactação. As vacas foram distribuídas em quadrado latino 3x3, com as seguintes dietas: Controle, sem adição de aditivos, Monensina com inclusão de 22mg/Kg MS de monensina (MON; Rumensin[®] Elanco Saúde Animal, São Paulo – SP) e óleo funcional, adição de 500 mg/kg MS do produto Essential[®] composto por ácido anacárdico, cardol e cardanol (óleo de castanha de caju) e ácido ricinoléico (óleo de mamona). Não houve diferenças entre consumo de MS, MO, PB, FDN entre os tratamentos. Com relação aos parâmetros ruminais, não foi verificada mudanças em pH e NH₃, porém, os animais tratados com óleo funcional apresentaram maior concentração total

de propionato em relação aos demais tratamentos. Com relação a produção de leite, vacas alimentadas com monensina e óleos funcionais apresentaram maior produção de leite ($P<0,05$) em relação aos animais do grupo controle.

3.3.1 – Enzimas Amilolíticas

3.3.2 - Amido

O amido é um composto de reserva das plantas, podendo ser encontrado nas sementes, raízes, folhas e colmos. Dois principais polímeros de glicose são responsáveis pela formação do amido, a amilose e amilopectina. A amilose (Figura 1) é um polímero com disposição longa e linear, em dupla hélice, composto por polímeros de glicose (324-4920 resíduos de glicose), unidos em 99% por ligações alfa-(1,4) e 1% ligações alfa-(1,6).

Figura 1- Molécula de amilose composta por ligações glicídicas alfa-(1,4).

Fonte: (TESTER; KARKALAS, 2002).

Já a amilopectina (Figura 2) apresenta-se maior em relação a amilose, com 9600-15.900 resíduos de glicose, cadeias lineares de glicose unidas por ligações alfa-(1,4), com ramificações alfa-(1,6) a cada 20-25 resíduos de glicose (CHESSON E FORSBERG, 1997).

Figura 2 – Molécula de amilopectina, com pontos de ramificação alfa-(1-6)

Fonte: (TESTER; KARKALAS, 2002).

A amilopectina é o principal constituinte do amido do milho, representando cerca de 70 a 80% de sua composição (ROONEY E PFLUGFELDER, 1986). O amido apresenta digestibilidade inversamente proporcional ao teor de amilose nele presente, assim, fontes de amido com maiores teores de amilopectina podem apresentar maior digestibilidade (JOBIM et. al. 2003).

A amilose e a amilopectina apresentam-se na forma de grânulos empacotados nas plantas, com tamanho variando de 1 a 200 µm de diâmetro com formato oval, redondo ou poligonal (CHESSON; FORSBERG, 1997). Os grânulos íntegros são estabilizados por grande quantidade de pontes de hidrogênio inter e intramoléculas de amilose e amilopectina, o que lhes conferem baixa capacidade de absorção de água; assim, o processamento visa o rompimento destas pontes de hidrogênio dentro dos grânulos de amido para melhor hidratação e consequente ação da digestão enzimática (FLINT; FORSBERG, 1995).

Tester et. al. (2004) classificaram o amido segundo o teor de amilose, sendo este ceroso quando o teor de amilose está abaixo de 15%, normal quando a amilose está entre 20-35% ou rico em amilose quando representa mais de 40% do conteúdo do amido. Proteínas e lipídios e proteínas são classificados como compostos não amiláceos e podem afetar o estado físico a susceptibilidade do amido a hidrólise (CORNELL et al., 1994; BALDWIN, 2001).

As proteínas ligadas aos grânulos de amido são divididas em: (1) prolaminas, que são classificadas como proteínas de armazenamento do endosperma e estão localizadas na superfície do grânulo; e (2) proteínas que podem estar no interior ou na superfície do grânulo (LÁSZTITY, 1984). Tratando-se de milho, as prolaminas recebem a denominação de zeínas e estão associadas a vitreosidade e características do endosperma (LARSON; HOFFMAN, 2008), sendo o termo vitreosidade utilizado para classificação dos tipos de endosperma do milho (RAMOS et al., 2009). Endospermas do milho farináceo apresentam menor concentração de zeínas em comparação aos endospermas duro e dentado (HAMMER et al., 1995; LANDRY et al., 2000), sendo que a matriz proteica do milho farináceo envolve parcialmente o grânulo de amido, além de ser mais fina que a matriz proteica encontrada no endosperma duro (OPATPATANAKIT et al., 1994; PHILIPPEAU et al., 2000).

Os lipídios podem apresentar-se na superfície ou no interior do grânulo de amido (SOUTH et al., 1991), sendo em sua maioria ácidos graxos livres e fosfolipídios, podendo estar ligados em mais de 55% da fração de amilose dos grânulos de amido presentes nos cereais (BLAZEK, 2008), podendo comprometer o processo de digestão por aumento da hidrofobicidade (VASANTHAN, 1996).

A maior parte do amido para dietas de ruminantes é fornecida a partir de grãos de cereais, principalmente o milho. O teor de amido dos grãos de cereais varia de 45% para a aveia e 72% para o milho. A fermentação ruminal do amido pode variar de menos de 50% a mais de 90%, e é uma função da taxa de fermentação e tempo de retenção das partículas do alimento no rúmen (GRANT, 2005). Algumas pesquisas têm tentado determinar ótimas concentrações dietéticas de amido. No entanto, uma quantidade ótima de amido dietético será função de vários fatores, incluindo a degradabilidade inerente da fonte de amido, o método de processamento, a quantidade de proteína solúvel, FDN, método de alimentação, e meio ambiente. Comumente, as recomendações dietéticas de amido variam entre 23 a 30% de matéria seca (MS) de acordo com o conteúdo de forragem da dieta (GRANT, 2005).

3.3.3.- Digestão do amido

O processo de digestão do amido é o passo inicial para a utilização da energia presente neste e fatores físicos e químicos podem alterar este processo de digestão e consequentemente o aproveitamento de energia. O processamento dos grãos tem como fundamento a melhoria da digestibilidade dos alimentos por meio da quebra das barreiras que impedem o acesso dos microrganismos ruminais e das enzimas aos componentes nutricionais (McALLISTER et al., 1990).

O processo de digestão do amido nos ruminantes requer uma série de enzimas e processos mecânicos, os quais se iniciam com a mastigação e ação da enzima amilase salivar (quantidades insignificantes), ação dos microrganismos presentes no rúmen, hidrólise ácida no abomaso, além da ação dos microrganismos e das enzimas presentes no lúmen intestinal (SWENSON; REECE, 1986). As bactérias são responsáveis por aproximadamente três quartos da digestão da fibra, proteína e amido (McALLISTER et al. 1994). Kotarski et al. (1992) identificaram 15 cepas de bactérias amilolíticas e caracterizaram oito amilases específicas produzidas por essas bactérias. Dentre as bactérias com maior capacidade de digestão do amido, pode-se citar: *Ruminobacteramylophylus* e *Streptococcus bovis*, seguidas da *Provetellaruminicola*, além de cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens* (COTTA, 1988). Os protozoários podem contribuir de 40 a 50% da biomassa e da atividade enzimática total do rúmen (ORPIN e JOBLIN, 1997) e são responsáveis por engolfar partículas de nutrientes solúveis no ambiente ruminal, que posteriormente serão digeridos mais lentamente, em comparação ao processo de digestão bacteriano, limitando a velocidade de queda do pH (JOUANY, 1996).

No rúmen, o processo de degradação do amido tem início com adesão das bactérias aos grânulos (VAN SOEST, 1994), com consequente produção de endo e exo-amilases que clivam as ligações internas das cadeias glicosídeas liberando oligossacarídeos de baixo peso molecular (maltodextrinas) e isoamilase que clivam as ligações alfa 1,6 das ramificações da amilopectina. Algumas espécies de fungos presentes no ambiente ruminal também são capazes de colonizar e degradar o amido, sendo as mais comuns *Piromyces communis*, *Neocallimastix parvicularum*, *Neocallimastix frontalis* e *Orpinomyces joyonii* (ORPIN e JOBLIN, 1997). Oligossacarídeos, dissacarídeos ou monossacarídeos, resultantes do processo de degradação do amido no rúmen, são absorvidos pelas bactérias e utilizados para

síntese de proteína microbiana e produção de ácidos graxos de cadeia curta (KOSLOSKY, 2009).

Fatores como processamento e taxa de passagem dos alimentos influenciam a quantidade de amido que escapará da degradação ruminal e será digerido no intestino delgado em processo semelhante ao que ocorre nos animais monogástricos. O pâncreas será responsável pela secreção de alfa amilase para hidrólise de amilose e amilopectina em dextrinas e oligossacarídeos lineares compostos de duas ou três unidades de glicose (GRAY, 1992; HARMON, 1993). Há muita discussão na literatura sobre a capacidade dos ruminantes em digerir amido no intestino delgado (MCLEOD et al., 2001). Em revisão realizada por Harmon (1992) foi relatado que a digestibilidade intestinal do amido em novilhas variou de 17,3 a 84,9% em relação ao amido que atingiu o duodeno. Já Kreikemeier et al. (1991) infundiram amido de milho no abomaso de novilhos e observaram diminuição no desaparecimento de 86 para 55% quando a quantidade infundida aumentou de 480 para 1440g/d.

3.3.4. – Caracterização das enzimas amilolíticas exógenas

As enzimas são substâncias ou macromoléculas produzidas por um organismo e atuam catalisando reações bioquímicas específicas (GURUNG et al., 2013). Várias enzimas têm sido estudadas com intuito de melhorar o desempenho produtivo animal. São classificadas como proteínas e podem ser desnaturadas pelo pH e calor e proteólise devido ação de enzimas presentes no trato digestivo. Apresentam alta especificidade por um substrato, com sítios específicos de reação (RAVINDRAN, 2013). A utilização bem-sucedida de enzima exógena para melhora do desempenho produtivo foi realizada primeiramente em animais monogástricos, sendo uma prática corrente em nutrição de aves e suínos (BEDFORD e SCHULZE, 1998).

Em metanálise realizada por Ortiz-Roeda et al. (2013) para investigação dos efeitos das enzimas exógenas na alimentação de ruminantes sobre a produção e composição do leite, os autores concluíram que a adição de enzima não afetou as variáveis analisadas. Esta meta análise incluiu observações de 29 experimentos, 9 enzimas diferentes e 1187 animais. Devido à alta especificidade das enzimas e a variabilidade de ingredientes presentes nas

dietas de ruminantes, várias enzimas deveriam ser utilizadas para se alcançar um máximo benefício. Além disso, segundo Colombatto e Beauchemin (2003) não há padronização entre os fabricantes em termos dos métodos utilizados para determinar a atividade das enzimas.

Enzimas podem ser classificadas de acordo com o substrato a qual atuam, na nutrição animal as mais utilizadas são as que degradam amido (amilolítica), proteína (protease), fibra (fibrolítica) e fitato (fitase). Para se atingir máximo benefício na utilização de enzimas diversas condições são necessárias, incluindo umidade, temperatura, pH, concentração de enzima e tipo de substrato (AEHLE, 2004). Além disso, dependendo da origem da enzima (fúngica, bacteriana ou de levedura), há diferentes condições ambientais para sua atividade e efetividade. O pH considerado ótimo para maior parte das enzimas é de 4 a 6, sendo que ambientes com pH muito alto ou muito baixo podem causar desnaturação das enzimas.

Os produtos enzimáticos são produzidos através de um processo descontínuo de fermentação, iniciado por cultivo em meio de cultura contendo nitrogênio, carboidratos, minerais e agentes de superfície ativo (BEAUCHEMIN, et al., 2004). Os métodos de fermentação são divididos em duas categorias: fermentação em estado sólido e fermentação submersa (MURAD; AZZAZ, 2010). O processo de fermentação industrial pode durar de 3 a 7 dias, variando em virtude do microrganismo e condições dispostas para o crescimento (COWAN, 1994).

A utilização de amilases exógenas na nutrição de ruminantes tem sido crescente. Estas podem ser divididas em três, de acordo com o tipo de ligação que hidrolisam, sendo: as alfas amilase, responsáveis por rompimento das ligações no interior do substrato, as betas amilases, que hidrolisam unidades das extremidades do substrato e as glicoamilases, que liberam unidades de glicose do terminal não redutor das moléculas do substrato (MORAES, 2004). Os primeiros estudos com utilização da enzima com alfa amilase, foram com extração a partir de *Bacillus licheniformis* e *Aspergillus niger* (ROJO et al. 2001; BUENDIA et al. 2003; ROJO et al. 2005), com intuito de aumentar a digestibilidade de dietas contendo milho e sorgo.

Segundo Bedford e Schulze (1998), os mecanismos pelos quais as enzimas podem gerar benefícios a produção animal são:

- 1) Ruptura da integridade do endosperma e extravasamento dos nutrientes que estão envolvidos na parede celular.
- 2) Mudanças nos locais de digestão.
- 3) Degradação de fatores antinutricionais que limitam o processo de digestão de alguns nutrientes
- 4) Mudanças da morfologia intestinal.
- 5) Manutenção da saúde intestinal, resultante do aumento da digestibilidade dos nutrientes, com menor aporte de nutrientes no intestino para crescimento de microrganismos patogênicos.
- 6) Diminuição dos resíduos ambientais.
- 7) Diminuição dos custos em consequência do aumento da eficiência produtiva.

3.3.5 – Estudos com enzimas amilolíticas exógenas na alimentação de vacas em lactação

Como os processos digestivos são mediados por enzimas, a utilização de preparações enzimáticas tem sido crescente na produção animal pela busca de aumento da eficiência produtiva. Segundo Nozière et al. (2014), a utilização de enzimas exógenas pode aumentar a atividade enzimática total do rúmen. Porém, fatores como quantidade de enzima aplicada e condições ruminais as quais ela será exposta resultará em variações funcionais desta. Vicini et al. (2003) não relataram diferenças na produção de leite quando adicionaram enzimas nas dietas de vacas em lactação e esta falta de resposta foi atribuída a condições de pH e temperatura ruminal. O contato com o substrato é fundamental para ação adequada da enzima. Morgavi et al. (2010) realizaram experimentos com adição das enzimas diretamente no alimento e verificaram maior estabilidade enzimática em razão à formação do complexo enzima-substrato. Quando não há formação do complexo enzima-substrato, as enzimas se solubilizam no líquido ruminal e fluem rapidamente para o intestino (BEUACHEMIN et al. 2003).

Na busca por aumentar a digestibilidade do amido e consequentemente se conseguir melhores índices produtivos, estudos com enzimas amilolítica exógenas têm sido realizados em dietas de vacas em lactação. Em meta análise realizada por Ortiz-Roeda et al. (2013) para investigar os efeitos de enzimas exógenas na produção e composição de vacas leiteiras,

os autores concluíram que a adição de enzimas não afetou estes parâmetros. Já Harrison e Tricarico (2007), em estudo realizado com 45 rebanhos leiteiros (aproximadamente 8150 vacas) em nove estados dos EUA, com utilização de amilase exógena adicionada à dieta total observaram tendência de aumento na produção de leite e porcentagem de proteína.

Em trabalho realizado por Tricarico et al. (2005), utilizando 24 vacas holandesas em lactação, em delineamento quadrado latino 4x4 para avaliar tratamentos com diferentes concentrações de enzimas (0; 240; 480 e 720 DU/Kg de TMR), foi observado aumento na produção de leite ($P=0,02$), gordura ($P=0,02$) e proteína ($P=0,06$) de maneira quadrática, com melhores resultados para o tratamento com 240DU/Kg de TMR. Também ocorreu redução na proporção molar de propionato, aumento de acetato e butirato, aumento das concentrações de beta-hidroxibutirato e ácidos graxos não esterificados. Já Vargas-Rodriguez et al. (2014), em estudo realizado com a suplementação de enzimas amilolíticas em dietas de vacas em lactação (Ronozyme RumiStar, DSM Nutritional Products; Novozyme) não observaram efeitos na ingestão de MS, produção e composição do leite, peso e escore de condição corporal.

Nozière e Morgavi (2012) avaliaram o efeito da amilase exógena extraída de *Bacillus licheniformis* na digestibilidade de dietas com baixo e alto teor de amido (20 e 30% na MS, respectivamente). Houve aumento na digestibilidade ruminal ($P=0,01$) da matéria orgânica e a digestibilidade ruminal do amido foi 75% para o grupo controle e 81% para o grupo suplementado com enzima. A enzima também reduziu a proporção de acetato e de butirato, com aumento de propionato, sem efeitos no consumo de MS, produção e composição do leite e digestibilidade da fibra. Estudo conduzido com vacas em lactação por Gado et al. (2009) com mistura de enzimas (amilase, xilanase, celulase e protease) resultou em aumento da produção de leite devido ao aumento da ingestão de MS, MO e FDN. Efeito positivo também foi encontrado por Tricarico et al. (2007) utilizando mistura de enzimas, com maior proporção de enzima com atividade amilolítica na digestibilidade da MS e MO, porém, sem aumento na digestibilidade do amido.

Takiya et al., (2017) conduziram um estudo com vacas em terço médio de lactação ($162,29 \pm 107,96$ dias em lactação), para avaliação da adição doses crescentes de amilase exógena (AmaizeTM, Alltech Inc. Nicholasville, KY, EUA, 0; 150; 300 e 450 FAU/kg MS). A adição de enzima amilolítica não influenciou o CMS e de nutrientes e não alterou o índice de seleção de partículas dos animais, porém, aumentou linearmente ($P=0,031$) a

digestibilidade da PB e tendeu a aumentar linearmente a digestibilidade da MS ($P=0,060$). Não houve alterações nos parâmetros ruminais e na produção e composição do leite.

4 Capítulo 1: Utilização de Monensina, Óleos Funcionais e Enzima Amilolítica na Alimentação de Vacas em Lactação – Fisiologia e Desempenho Produtivo

4.1 – Introdução

A produção de ruminantes, no que diz respeito ao fornecimento de alimentos para o crescimento populacional mundial, busca maneiras de aumento da eficiência de utilização dos nutrientes a fim de maximizar o uso de terras agriculturáveis no mundo (KINGSTON-SMITH et al., 2013). Com o aumento da população mundial e do consumo alimentar médio em decorrência do aumento do poder 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).

Neste contexto, 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 e elevação do pH ruminal.

Porém, a União Europeia 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 derivados de plantas têm aumentado na nutrição animal, especialmente na nutrição de ruminantes.

4.1.2 – Hipótese e Objetivos

A hipótese a ser avaliada neste estudo é que a inclusão de aditivos nas dietas experimentais mostre efeito positivo nas variáveis produtivas em comparação a dieta controle, que as dietas contendo monensina e óleos funcionais apresentem resultados similares e que a combinação de óleos funcionais e enzima amilolítica mostre efeito sinérgico em variáveis produtivas.

O objetivo deste estudo foi comparar os efeitos de diferentes aditivos alimentares (monensina, óleos funcionais isolados ou combinados com enzima amilolítica) na ingestão de nutrientes e digestibilidade aparente total, fermentação ruminal, síntese de proteína microbiana, concentrações séricas de glicose e ureia, produção e composição do leite, balanço de nitrogênio e energia de vacas em lactação.

4.1.3 – Material e Métodos

Todos os procedimentos experimentais aplicados neste estudo seguiram os “Princípios Éticos na Experimentação Animal” recomendados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, de acordo com o protocolo de nº 9762201015.

4.1.4 – Local, Animais e Tratamentos

O experimento foi conduzido nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) do Departamento de Nutrição de Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em Pirassununga, no período de 22/10/2015 a 15/01/2016. A localização geográfica do LPBL é 21° 57' 28" de latitude Sul, 47° 27' 21" de longitude Oeste, com altitude de 635 metros. As análises bromatológicas e de composição do leite foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do LPBL. As demais análises foram realizadas nas dependências do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal.

Oito vacas Holandesas (576 ± 100 Kg peso corporal, 35.1 ± 4.0 kg/d de produção de leite e 146.5 ± 35.1 dias em lactação no início do experimento), canuladas cirurgicamente no rúmen foram distribuídas em quadrados Latinos 4 x 4. Os quadrados eram contemporâneos e foram balanceados de acordo com a produção de leite, dias em lactação e peso corporal dos animais. Os períodos experimentais tiveram duração de 21 dias, com 14 dias de adaptação aos tratamentos e 7 dias para coleta de dados e amostragem.

Os tratamentos foram distribuídos aleatoriamente dentro de cada quadrado, sendo eles: controle (CON), sem adição de aditivos; monensina (MON), com adição de 13 mg de monensina por quilo de matéria seca (Monensina, DSM Nutritional Products Ltd., Basel, Switzerland); óleos funcionais (OF), com adição de 44 mg de Crina/kg de matéria seca (Crina® Ruminants, DSM) e óleos funcionais associado à enzima amilolítica (OFA), com

adição de 44 mg de Crina e 330 unidades de quilo novo (KNU) de enzima com atividade amilolítica por quilo de matéria seca (Crina-Ronozyme Rumistar, DSM Nutritional Products). O produto comercial Crina® Ruminants é uma mistura de óleos funcionais composto por timol, guaiacol, eugenol, vanila e limoneno. A enzima Rumistar® é uma alfa-amilase produzida a partir de *Bacillus Licheniformis*.

O volumoso utilizado durante o experimento foi silagem de milho. Diariamente foram feitas pesagens das quantidades dos volumosos e concentrados fornecidos e das sobras de cada tratamento, para estimativa do consumo individual. Os animais foram arraçados duas vezes ao dia, as 7:00 e as 13:30 horas, de acordo com o consumo de matéria seca do dia anterior, de forma a ser mantido um percentual de sobras das dietas entre 5 e 10% do fornecido, não havendo limitação de consumo.

Tabela 1. Ingredientese composição bromatológica do concentrado e dieta basal utilizado no experimento (g/kg MS).

(continua)

Item	Concentrado	Dieta
Ingrediente		
Silagem de milho ¹	-	480
Milho moído	415	216
Farelo de soja	284	148
Polpa Cítrica	129	67,0
Grão de soja	116	60,1
Mistura mineral e vitamínica ²	26,5	13,8
Bicarbonato de sódio	15,3	7,96
Calcário	5,60	2,91
Ureia	4,59	2,23
Cloreto de sódio	4,01	2,03
Composição química		
Matéria seca (g/kg matéria natural)	899	448
Matéria orgânica	903	922
Carboidrato não fibroso ³	540	459
Amido	314	279
Fibra em detergente neutro	119	295
Fibra em detergente ácido	92,8	197
Fibra em detergente ácido indigestível	12,0	77,2
Lignina	10,6	17,0
Proteína insolúvel em detergente neutro	50,8	32,2
Proteína insolúvel em detergente ácido	31,7	22,7
Proteína bruta	241	160

Item	(conclusão)	
	Concentrado	Dieta
Extrato etéreo	48,5	37,9
Nutrientes digestíveis totais ¹ × ⁴	806	753
Energia líquida da lactação 3× ⁵	1,86	1,73

¹Composição média: 290 g/kg matéria seca, 72,6 g/kg proteína bruta, 241 g/kg de amido 484 g/kg fibra detergente neutro, 309 g/kg fibra em detergente ácido, 26,3g/kg extrato etéreo, 372,2 g/kg de carboidrato não fibroso, 696,9 g/kg de nutrientes digestíveis totais e 57,1g/kg de cinzas.

²Cada kg do produto contem: 88,0 g Ca, 42,0 g P, 18,0 g S, 45,0 g Mg, 123,0g Na, 14,0 mg Co, 500,0 mg Cu, 20,0 mg Cr, 1050,0 mg Fe, 28,0 mg I, 1400,0 mg Mn, 18,0mg Se, 2800,0 mg Zn, 80,0 mg biotina, 200.000,00 IU Vit A, 70.000,00 IU Vit D and 1.200,00 IU Vit E.

³CNF = 1000 – [(PB – PBureia + ureia) + EE + Cinzas + FDN], de acordo com Hall (2000).

⁴Nutrientes digestíveis totais ao nível de manutenção, calculado de acordo com NRC (2001).

⁵Estimado em três vezes o nível de manutenção, de acordo com NRC (2001).

4.1.5 – Consumo, digestibilidade aparente total e índice de seleção alimentar

Amostras de silagem de milho (0,3 kg) foram coletadas diariamente durante os períodos de amostragem, formando-se uma amostra composta por período. Amostras (0,5 kg) dos ingredientes do concentrado foram coletadas durante sua preparação (n = 4) na fábrica de ração. Amostras de sobras (10% da sobra diária) de cada animal foram coletadas diariamente durante o período de amostragem e foram obtidas amostras compostas para cada animal dentro de cada período. Após cada coleta, as amostras foram armazenadas à -20°C para análises bromatológicas. As amostras de silagem de milho, ingredientes e sobras foram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 55°C durante 72 h, e moídas em moinho de facas ou de grãos para passarem por uma peneira de 2 mm e de 1 mm (Wiley Mill, Arthur H. Thomas, Philadelphia, PA, EUA). Os teores de MS (método 930.15), matéria orgânica (MS – cinzas), proteína bruta (PB; método 984.13, N × 6,25), extrato etéreo (EE; método 920.39) foram analisados em todas as amostras de acordo com os métodos descritos pela AOAC (2000). O teor de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina (método de dissolução em ácido sulfúrico) das amostras foram mensurados de acordo com VAN SOEST et al. (1991). As análises de FDN foram realizadas com adição alfa-amilase sem sulfito de sódio (TE-149 Analisador de Fibra, Tecnal Equipamentos para Laboratório Inc., Piracicaba, Brasil). O teor de amido das amostras foi determinado por espectrofotometria após degradação enzimática (Amyloglucosidase AMG 300L, Novozymes) de acordo com Bach Knudsen (1997). Os nutrientes digestíveis totais (NDT)

foram calculados de acordo com as equações do NRC (2001), a energia líquida de lactação (EL_L) foi calculada de acordo com Weiss et al. (1992) sem correção para o fator de processamento para a correção da estimativa da digestibilidade dos carboidratos não-fibrosos (CNF). Os CNF foram calculados de acordo com Hall (2000): $CNF = 100 - [(PB - PB \text{ da ureia} + \text{ureia}) + FDN + EE + \text{cinzas}]$, com os valores expressados em porcentagem.

O alimento oferecido e as sobras de cada vaca foram pesados diariamente para determinar a ingestão de nutrientes. A mistura total da dieta e as sobras foram analisadas para a distribuição de tamanho de partículas usando um sistema separador de partículas com peneiras estratificadoras (Penn StateParticleSeparator – Nasco, Fort Atkinson, WI, EUA) como descrito por Kononoff et al. (2003). O separador de partículas utilizado apresentava quatro bandejas sobrepostas (P1 a P4) com orifícios: P1 = retenção de partículas maiores do que 19 mm, P2 = retenção de partículas entre 19 e 8 mm, P3 = retenção de partículas entre 8 e 1,18 mm e P4 = com fundo fechado, a qual retém partículas com diâmetro inferiores a 1,18 mm.

O índice de seleção foi calculado como o consumo efetuado pelos animais correspondentes a cada peneira (P1 a P4) expresso pela porcentagem do consumo total predito, onde o consumo predito da fração P_i é igual ao quociente entre a matéria original ingerida e a matéria original da fração da P_i da ração total, de acordo com as equações 1, 2 e 3:

$$(1) \text{ Consumo predito} = \% \text{ retenção de } Y_x \text{ oferecido} \times \text{consumido}$$

$$(2) \text{ Consumo observado} = (\% \text{ retenção de } Y_x \times \text{oferecido}) - (\% \text{retenção de } Y_x \text{ nas sobras})$$

$$(3) \text{ Índice de Seleção} = (\text{consumo observado} \div \text{consumo predito}) \text{ em que;}$$

Desta forma, valores menores do que 1 indicam rejeição de alimentos, maiores que 1 consumo preferencial, e igual a 1 quando não houve seleção (LEONARDI; ARMENTANO, 2003).

Amostras de fezes (0,3 kg) de cada vaca foram coletadas diretamente do reto, a cada 9 horas a partir do dia 16 até o dia 18 de cada período experimental, representando uma coleta a cada 3 horas em um período de 24 horas, para contabilizar a variação da excreção de nutrientes ao longo do dia. Após cada coleta as amostras foram armazenadas à -20°C , e

no final de cada período as amostras foram homogeneizadas a fim de se obter uma amostra composta por vaca e período. As amostras foram então pré-secadas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 h e moídas em moinho de facas para passarem por peneiras de 2 mm e de 1 mm (Wiley Mill, Arthur H. Thomas). Nas amostras moídas em 1 mm foram analisadas a MS, FDN, PB, EE e cinzas conforme descrito previamente.

As amostras de alimentos, sobras e fezes moídas a 2 mm foram colocadas em sacos de tecido não-tecido seguindo a recomendação de 20 mg MS/cm² (NOCEK, 1988) e incubadas no rúmen de duas vacas adaptadas a mesma dieta do experimento por 288 h de acordo com os métodos descritos por Casali et al. (2008). Depois da remoção das amostras do rúmen, os sacos foram lavados em água corrente, secos em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 h e, então analisadas para o teor de FDN como previamente descrito para obtenção dos valores de FDN indigestível (FDNi). O FDNi foi utilizado para estimar a excreção fecal diária baseado na ingestão de FDNi e concentração do mesmo nas fezes. A digestibilidade de cada nutriente foi calculada a partir da ingestão do nutriente, excreção fecal e concentração do mesmo nas fezes.

4.1.6 – Fermentação ruminal

No dia 20 de cada período experimental, amostras de digesta ruminal dos animais foram coletadas das regiões cranial, caudal, ventral, lateral direito e lateral esquerdo antes alimentação matinal (tempo 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 h após a alimentação da manhã. Imediatamente após cada coleta, as amostras foram homogeneizadas e espremidas em quatro camadas de pano dessorador (poro de 1 mm) para obtenção do líquido ruminal (250 mL). O pH do líquido ruminal foi mensurado utilizando um potenciômetro (MB-10, Marte Científica, Santa Rita do Sapucaí, Brazil). As amostras de fluído ruminal (50 mL) foram centrifugadas a $7,000 \times g$ por 15 min a temperatura ambiente, e uma subamostra de 2 mL de sobrenadante foi misturado com 0,4 mL de ácido fórmico P.A. e armazenadas à -20° C para análise de AGV. Outros 2 mL de sobrenadante de cada amostra foram retirados e misturados com 1 mL de ácido sulfúrico (1 N) em tubos plásticos que posteriormente foram analisados para determinação de nitrogênio amoniacal.

As concentrações de AGV no líquido ruminal foram mensuradas por cromatógrafo a gás (GC-2014, Shimadzu, Tóquio, 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) no Laboratório de Fermentabilidade Ruminal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e centrifugadas a $14.500 \times g$ a 4°C por 10 min, e o sobrenadante (1 mL) foi transferido para um frasco seco e limpo contendo 100 μL do padrão interno (ácido 2-etil-butírico 100 mM, Chemservice, West Chester, PA, EUA). O gás 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). As temperaturas de operação utilizadas do injetor *split/splitless* e do detector de ionização de chamas foram de 250°C e da coluna de 145°C , respectivamente. O padrão externo foi preparado com os ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico (Chemservice). O software GCSolution (Shimadzu) foi utilizado para cálculo das concentrações de AGV.

O nitrogênio amoniacal foi determinado pelo método fenol-hipoclorito (BRODERICK; KANG, 1980). Foram adicionados aos tubos contendo amostras de líquido ruminal e ácido sulfúrico a 1 N, 1 mL de tungstato de sódio a 10%, e posteriormente as amostras foram centrifugadas a $1.200 \times g$ durante 15 minutos. Em seguida foram pipetados 25 μL do sobrenadante a um tubo limpo, e neste adicionado 5 mL do reagente fenol e 5 mL de hipoclorito. Os tubos foram agitados para homogeneização das amostras e colocados em banho-maria a 37°C durante 15 minutos, adquirindo coloração azul. Após o resfriamento, as amostras foram analisadas em leitor de microplaca (BiochromAsysUVM 340 Microplate Reader, Biochrom, Cambridge, Reino Unido).

4.1.7 – Produção e composição do leite

As vacas foram ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia. Amostras de leite foram coletadas de cada vaca (de acordo com a produção individual em cada ordenha) nos dias 15, 16 e 17 de cada período experimental. Após as coletas do período da manhã as amostras foram refrigeradas e misturadas de maneira proporcional com as amostras obtidas no período da tarde. As amostras foram analisadas para teores de gordura, proteína e lactose por metodologia infravermelha (Lactoscan®, Entelbra, São Paulo, Brasil).

Alíquotas (10 mL) das amostras foram desproteinizadas de acordo com Broderick e Clayton (1997) utilizando ácido tricloroacético (25%), e analisado quanto aos teores de ureia utilizando kits comerciais (Bioclin®, Belo Horizonte, Brasil) por método colorimétrico

enzimático e a leitura realizada em analisador bioquímico automático (SBA-200, CELM®, São Caetano do Sul, Brasil). A produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (PLCG) de acordo com a equação proposta por Sklan et al. (1992): $3,5\% \text{ PLCG} = (0,432 + 0,165 \times \% \text{ de gordura no leite}) \times \text{produção de leite (kg/d)}$.

4.1.8 – Peso e Escore de condição corporal

Durante o experimento as vacas foram avaliadas em relação ao escore de condição corporal (ECC) e o peso corporal no 7º dia do período de adaptação e no final de cada período experimental, para avaliação da variação de peso. Para o cálculo da variação de ECC e de peso corporal, foram considerados os pesos do 14º dia do período de adaptação e do final de cada período experimental.

O peso dos animais foi correspondente à média de duas pesagens sucessivas, feitas antes do fornecimento das alimentações e após as ordenhas durante dois dias e as mensurações do ECC foram realizadas segundo metodologia proposta por Edmonson et al. (1989).

4.1.9 – Balanço de energia e nitrogênio

Para obtenção do consumo de energia bruta (EB) e realização do cálculo da eficiência do uso de energia consumida, as amostras de silagem e alimentos foram analisadas quanto ao seu teor de energia bruta em bomba calorimétrica (IKA Works GmbH & Co., Staufen, Alemanha). O consumo de energia digestível (CED) foi obtido por meio do coeficiente de digestibilidade da MS das dietas experimentais e do consumo de energia bruta, de acordo com os valores de energia obtidos para os ingredientes e a silagem de milho. O consumo de energia metabolizável (CEM) foi estimado multiplicando-se o CED pelo fator 0,82 (NRC, 1996). O consumo de energia líquida (CEL) foi calculado a partir dos teores de energia líquida nos alimentos e nas sobras, obtidos a partir da equação do NRC (2001) como: $EL_1 \text{ nos alimentos e sobras (Mcal/kg)} = 0,0245 \times \text{NDT (\%)} - 0,12$, diante disso multiplica-se o valor de cada alimento subtraindo o valor contido nas sobras.

A energia líquida de lactação foi estimada a partir da seguinte equação do NRC (2001): $EL_l \text{ (Mcal/dia)} = \text{produção de leite (kg)} \times (0,0929 \times G\% + 0,0547 \times P\% + 0,0395 \times L\%)$, onde: G% é teor de gordura no leite; P% é o teor de proteína bruta do leite e L% é o teor de lactose. A energia líquida de manutenção foi estimada, de acordo com o NRC (2001), como $EL_m \text{ (Mcal)} 0,08 \times PC^{0,75}$ e o balanço de energia (BE) obtido pela diferença entre o CEL e $EL_l + EL_m$. O PC e o escore de condição corporal foram mensurados nos dias 7 e 21 de cada período experimental, no período da manhã, antes do fornecimento da dieta e após a ordenha.

O consumo de nitrogênio foi determinado por meio do consumo de PB retirando-se o valor de conversão de nitrogênio 6,25, obtendo-se a quantidade em gramas de nitrogênio consumida. O mesmo cálculo foi realizado com os valores de PB das fezes obtendo-se a excreção total de nitrogênio (g/kg MS). O nitrogênio total das amostras de urina e leite foi determinado de acordo com as metodologias descritas pelo AOAC (2000, método 984.13; PB; $N \times 6,25$) segundo o método micro-Kjeldahl, onde a quantidade em gramas de nitrogênio para cada 100 mL de urina ou leite foi obtido dividindo-se o valor de proteína bruta das amostras pelo fator 6,25 para as amostras de urina e do fator 6,38 para as amostras de leite.

Amostras *spot* de 100 mL de urina foram obtidas de todas as vacas a cada 9 horas, durante micção estimulada por massagem na vulva, nos dias 18, 19 e 20 de cada período experimental, totalizando 8 amostras de urinas por vaca/período com o objetivo de formação do *pool* representativo de um período de 24 horas para retirar o efeito da variação diária de excreção de urina. Vinte mL das amostras foram filtradas e diluídas imediatamente em 80 mL de ácido sulfúrico a 0,036 N para evitar destruição bacteriana dos derivados de purinas e precipitação do ácido úrico. Então, foram acondicionadas em garrafas plástica de 1 L e armazenadas à -20°C , para posterior análises de nitrogênio total, alantoína, ácido úrico e creatinina.

O volume urinário excretado diariamente foi estimado pela concentração de creatinina na urina. A concentração de creatinina foi determinada utilizando kits comerciais (Bioclin®) por reação enzimática colorimétrica e a leitura realizada em um analisador bioquímico (SBA-200, CELM®). A constante de excreção de 24,05 mg de creatinina por kg de peso vivo foi utilizada na estimativa do volume urinário, de acordo com a equação proposta por Chizzotti et al. (2008): $\text{Excreção urinária (L/d)} = [24,05 \text{ mg*dia/kg} \times PC \text{ (kg)}] \div \text{concentração de creatinina na urina (mg/L)}$.

4.1.10 – Síntese de proteína microbiana

A síntese de proteína microbiana ruminal foi estimada a partir da quantificação dos derivados de purinas na urina (ácido úrico e alantoína) e no leite (alantoína) proposta por Chen e Gomes (1992). Amostras de leite (300 mL) foram coletadas no 16º e 17º dia de cada período experimental, nas ordenhas da manhã e da tarde, para determinação da concentração de alantoína. Alíquotas das amostras (10 mL) foram misturadas com ácido tricloroacético 25% (5 mL) com um período de reação de 5 minutos, depois foram filtradas em papel filtro (poro de 14 µm) para remoção de proteínas e armazenadas à -20°C. As amostras desproteinizadas de leite e urina foram analisadas para a determinação de alantoína conforme proposto por Chen e Gomes (1992) sendo a leitura realizada em um leitor de microplaca (Biochrom AsysUVM 340 Microplate Reader). A concentração de ácido úrico na urina foi determinada utilizando kit comercial (Bioclin®) por método colorimétrico e a leitura realizada em analisador bioquímico automático (SBA-200, CELM®).

A excreção total de derivados de purina (DP, mmol/d) foi calculada como a soma da excreção de alantoína e ácido úrico no leite e urina (ORELLANA BOERO et al., 2001). Os derivados de purina absorvidos (DP_{abs}, mmol/d) foram calculados como: $DP_{abs} = (DP - 0,385 \times PC^{0,75}) \div 0,84$ em que 0,84 representa a recuperação urinária de DP e $0,385 \times PC^{0,75}$ representa a contribuição endógena da excreção de purinas (VERBIC et al., 1990; CHEN; GOMES, 1992). A síntese ruminal de N microbiano (N_{mic}, g/d) foi calculada como: $N_{mic} = (70 \times DP_{abs}) \div (0,83 \times 0,134 \times 1000)$, considerando 70 como a concentração de nitrogênio nos DP (mg/mol), 0,134 a razão de derivados de purina por nitrogênio microbiano, e 0,83 a digestibilidade intestinal de purinas (CHEN; GOMES, 1992; VALADARES et al., 1999).

4.1.11 – Perfil metabólico

Coletas de sangue (20 mL) foram realizadas no 16º dia de cada período experimental, por punção da artéria ou veia coccígea, após 4 horas da primeira ordenha do dia. Os tubos utilizados na coleta de sangue não tinham ativador de coágulo (BD Vacutainer®, Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA). Os tubos com sangue foram deixados em descanso à temperatura ambiente até a formação de coágulo, e então foram centrifugados $3,000 \times g$ por 15 min (4°C) e o sobrenadante utilizado para análise das concentrações de glicose e ureia.

As análises foram realizadas por meio de kits comerciais (Bioclin®) que utilizam o método enzimático colorimétrico de ponto final ou cinético. A leitura foi realizada em aparelho automático para bioquímica sanguínea (SBA-200, CELM®).

4.1.12 – Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o procedimento MIXED do SAS (Statistical Analysis System, Windows 9.3, SAS Institute Inc., Cary, USA), de acordo com o modelo a seguir:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_l + \gamma_{kl} + e_{ijk}$$

Em que: Y_{ijkl} é o valor observado para o animal K no tratamento i , período j e quadrado l ; α_i representa o efeito fixo do i -ésimo tratamento ($i = 1$ a 4); β_j representa o efeito fixo do j -ésimo período ($j = 1$ a 4); γ_l representa o efeito fixo do quadrado ($l = 1$ e 2); γ_{kl} representa o efeito aleatório do animal no quadrado ($k = 1$ a 8); e_{ijk} representa o erro aleatório associado em cada observação.

As variáveis avaliadas na fermentação ruminal (pH, $\text{NH}_3\text{-N}$ e AGV) foram analisadas como medidas repetidas no tempo (Littell et al., 2006) utilizando o procedimento MIXED do SAS, com análise de dados 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, e 16 horas após a alimentação da manhã, seguindo o seguinte modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_l + \gamma_{kl} + e(a)_{ijkl} + \delta_m + \alpha\delta_{im} + e(b)_{ijklm}$$

Onde Y_{ijklm} representa a observação do animal k no tratamento i , período j e quadrado l ; α_i representa o efeito fixo do i -ésimo tratamento ($i = 1$ a 4); β_j representa o efeito fixo do j -ésimo período ($j = 1$ a 4); γ_l representa o efeito fixo do quadrado ($l = 1$ e 2); γ_{kl} representa o efeito aleatório do animal no quadrado ($k = 1$ a 8); e_{ijk} representa o erro aleatório associado em cada observação do ponto principal (a); δ_m representa o efeito fixo do tempo (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, e 16); $\alpha\delta_{im}$ representa o efeito fixo entre tratamento e tempo; $e(b)_{ijklm}$ representa o erro aleatório associado a cada observação (b). A metodologia Akaike foi utilizada para determinação da matriz de covariância, selecionando-se a de menor valor para este parâmetro (AKAIKE, 1974). Os graus de liberdade foram definidos de acordo com

o método de Kenward e Rogers (1997). As diferenças entre os tratamentos foram analisadas de acordo com contrastes ortogonais: C1: efeito dos aditivos [controle vs tratamentos (MON + EO+ EOA)]; C2: efeito do aditivo utilizado (MON vs EO + EOA); C3: efeito da adição de amilase (EO vs EOA). O nível de significância foi considerado quando $P \leq 0,05$ e tendência quando $P \leq 0,10$.

4.2 – Resultados

4.2.1. – Consumo, digestibilidade aparente total e índice de seleção alimentar

Não houve diferença na ingestão de matéria seca entre as dietas experimentais (Tabela 2). Os aditivos tenderam a aumentar a digestibilidade da matéria seca (C1, $P=0,064$) e da proteína bruta (C1, $P=0,058$). A monensina tendeu a aumentar a digestibilidade da FDN (C2, $P=0,085$) em comparação às dietas contendo óleos funcionais.

Tabela 2. Efeito da utilização monensina, óleos funcionais e enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a digestibilidade aparente total.

(Continua)

Item	Tratamento ¹				EPM	<i>P</i> ²		
	CON	MON	OF	OFA		C1	C2	C3
Ingestão, kg/d								
Matéria seca	27,6	26,5	27,4	26,9	0,701	0,368	0,404	0,550
Matéria orgânica	25,3	24,3	25,1	24,6	0,643	0,362	0,397	0,523
CNF	12,8	12,4	12,7	12,4	0,321	0,361	0,529	0,457
Fibra detergente neutro	7,91	7,54	7,85	7,77	0,211	0,410	0,258	0,762
Amido	7,82	7,52	7,73	7,62	0,196	0,321	0,439	0,621
Proteína bruta	4,49	4,30	4,46	4,35	0,111	0,329	0,406	0,450
FDNi	2,05	1,91	2,01	2,02	0,058	0,368	0,199	0,857
Extrato etéreo	1,08	1,03	1,06	1,04	0,027	0,262	0,401	0,654
Ingestão, kg/100kg PC								
Matéria orgânica	4,73	4,56	4,69	4,58	0,113	0,349	0,570	0,485
Fibra detergente neutro	1,36	1,30	1,34	1,32	0,035	0,361	0,462	0,675
Digestibilidade aparente								
Matéria seca	0,659	0,693	0,688	0,679	0,0076	0,064	0,517	0,584
Matéria orgânica	0,678	0,708	0,709	0,698	0,0087	0,155	0,796	0,633
CNF	0,852	0,851	0,876	0,877	0,0089	0,381	0,206	0,981
Fibra detergente neutro	0,447	0,515	0,477	0,448	0,0133	0,230	0,085	0,392
Amido	0,933	0,938	0,943	0,946	0,0029	0,143	0,366	0,681

(Conclusão)

Item	Tratamento ¹				EPM	P ²		
	CON	MON	OF	OFA		C1	C2	C3
Proteína bruta	0,634	0,671	0,675	0,667	0,0088	0,058	0,978	0,728
Extrato etéreo	0,800	0,851	0,822	0,836	0,0120	0,201	0,455	0,680
Índice de seleção alimentar								
>38mm	0,866	0,827	0,797	0,866	0,0228	0,530	0,946	0,296
28-19mm	1,023	1,014	1,014	1,010	0,0037	0,205	0,816	0,722
19 – 8mm	1,036	1,019	1,031	1,015	0,0038	0,121	0,720	0,143
<8mm	1,050	1,034	1,059	1,027	0,0069	0,531	0,578	0,113

¹Tratamentos: Controle (CON), sem inclusão de aditivos; Monensina (MON), adição de 13 mg monensina/kg MS (Monensina, DSM Nutritional Products, São Paulo, Brazil); OF, adição de 44 mg Crina/kg MS (Crina® Ruminants, DSM); e OFA, adição de 44 mg de Crina e 330 KNU de enzima amilolítica por kg de MS (Crina-Ronozyme Rumistar™, DSM).

²Contrastes: C1: efeito dos aditivos [controle (CON) vs aditivos (MON + OF +OFA)]; C2: efeito do tipo de aditivo (MON vs OF + OFA); C3: efeito da adição de enzima (OFvsOFA).

4.2.2. – Fermentação ruminal

Dietas contendo óleos funcionais apresentaram menor pH (Tabela 3) em comparação à monensina e controle (C2, P=0,017). Os aditivos diminuíram a concentração ruminal de NH₃-N (C1, P=0,026), sendo menor valor apresentado pela monensina (C2, P=0,004); a dieta com associação de enzima amilolítica e óleo funcional tendeu a manter menor valor em comparação ao controle e óleos funcionais isolados (C3, P=0,065). Menor produção de acetato foi observada na dieta controle (C1, P=0,046), porém, não houve diferença na relação acetato:propionato entre as dietas experimentais. De maneira geral, os aditivos tenderam a aumentar a concentração total de AGCC (C1, P=0,080), especialmente das dietas contendo óleos funcionais (C2, P=0,076).

Tabela 3. Efeito da utilização monensina, óleos funcionais e enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a fermentação ruminal.

(Continua)

Item	Tratamento ¹				EPM	P ²				
	CON	MON	OF	OFA		T	Tr.×T	C1	C2	C3
pH	6,03	6,08	5,96	5,96	0,023	<0,001	0,388	0,492	0,017	0,992
NH ₃ -N, mg/dL	18,7 ^a	15,9 ^b	18,6 ^a	17,2 ^{a,b}	0,45	<0,001	0,892	0,026	0,004	0,065
Acetato, mM	88,9	91,9	97,5	102	1,79	<0,001	0,967	0,046	0,069	0,359
Propionato, mM	32,7	32,7	36,8	37,1	1,15	<0,001	0,974	0,226	0,099	0,928

(Conclusão)

Item	Tratamento ¹				EPM	P ²				
	CON	MON	OF	OFA		T	Tr.×T	C1	C2	C3
Butirato, mM	17,7	18,2	19,4	20,0	0,365	<0,001	0,480	0,027	0,041	0,471
AGCR ³ , mM	6,99	7,16	7,43	7,67	0,100	<0,001	0,602	0,021	0,051	0,288
Acetato, mol/100mol	60,3	61,0	60,2	60,9	0,420	0,689	0,572	0,690	0,689	0,572
Propionato, mol/100 mol	22,6	21,8	22,8	22,2	0,480	<0,001	0,591	0,794	0,539	0,670
Butirato, mol/100 mol	12,2	12,3	12,2	12,1	0,242	<0,001	0,979	0,972	0,811	0,877
AGCR ³ , mol/100 mol	4,94	4,92	4,77	4,74	0,086	0,439	0,472	0,527	0,439	0,897
Acetato:propionato	2,78	2,85	2,73	2,77	0,078	0,950	0,754	0,971	0,589	0,835
Total AGCC ⁴ , mmol/L	146	150	161	167	3,27	<0,001	0,933	0,080	0,076	0,519

¹Tratamentos: Controle (CON), sem inclusão de aditivos; Monensina (MON), adição de 13 mg monensina/kg MS (Monensina, DSM Nutritional Products, São Paulo, Brazil); OF, adição de 44 mg Crina/kg MS (Crina® Ruminants, DSM); e OFA, adição de 44 mg de Crina e 330 KNU de enzima amilolítica por kg de MS (Crina-Ronozyme Rumistar™, DSM).

²Contrastes: C1: efeito dos aditivos [controle (CON) vs aditivos (MON + OF +OFA)]; C2: efeito do tipo de aditivo (MON vs OF + OFA); C3: efeito da adição de enzima (OF vs OFA).

³AGCR: ácidos graxos de cadeia ramificada

⁴AGCC: ácidos graxos de cadeia curta

Variações do pH ao longo do dia conforme as dietas experimentais estão descritas na figura 3. Já as varrições de NH₃-N estão descritas na figura 4.

Figura 3 - Efeito da utilização monensina, óleos funcionais e enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre o pH do fluido ruminal.

Tratamentos: Controle (—); Monensina (○—); Óleos funcionais (---) e Óleos funcionais associados com enzima amilolítica Rumistar (△—).

Figura 4 - Efeito da utilização monensina, óleos funcionais e enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃).

Tratamentos: Controle (—); Monensina (○—); Óleos funcionais (---) e Óleos funcionais associados com enzima amilolítica (△—).

4.2.3. – Produção e composição do leite

As dietas experimentais não influenciaram a produção e composição do leite (Tabela 4). Porém, a eficiência produtiva foi melhor para as dietas contendo aditivos em comparação a dieta controle (C1, $P=0,040$).

Tabela 4. Efeito da utilização monensina, óleos funcionais e enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a produção e composição do leite e eficiência produtiva

Item	Tratamento ¹				EPM	P ²		
	CON	MON	OF	OFA		C1	C2	C3
Produção, kg/d								
Leite	34,6	35,9	35,0	35,3	0,74	0,156	0,220	0,703
PLCG ³	32,8	33,9	32,4	34,0	0,78	0,548	0,533	0,221
Lactose	1,56	1,63	1,57	1,61	0,034	0,294	0,288	0,376
Gordura	1,10	1,08	1,07	1,16	0,039	0,894	0,647	0,258
Proteína	1,04	1,09	1,05	1,07	0,023	0,251	0,233	0,355
Composição, g/kg								
Lactose	45,3	45,4	45,5	45,6	0,28	0,438	0,408	0,727
Gordura	32,3	31,6	31,2	32,3	0,85	0,591	0,880	0,429
Proteína	30,2	30,3	30,4	30,4	0,18	0,262	0,713	0,627
Eficiência ⁴	1,28	1,38	1,31	1,36	0,040	0,040	0,242	0,194

¹Tratamentos: Controle (CON), sem inclusão de aditivos; Monensina (MON), adição de 13 mg monensina/kg MS (Monensina, DSM Nutritional Products, São Paulo, Brazil); OF, adição de 44 mg Crina/kg MS (Crina® Ruminants, DSM); e OFA, adição de 44 mg de Crina e 330 KNU de enzima amilolítica por kg de MS (Crina- Ronozyme Rumistar™, DSM).

²Contrastes: C1: efeito dos aditivos [controle (CON) vs aditivos (MON + OF +OFA)]; C2: efeito do tipo de aditivo (MON vs OF + OFA); C3: efeito da adição de enzima (OFvsOFA).

³Produção de leite corrigida para gordura: 3,5% PLCG = $(0,432 + 0,165 \times \% \text{ de gordura no leite}) \times$ produção de leite (kg/d).

⁴Eficiência: produção de leite (kg/d) /ingestão de matéria seca (kg/dia).

4.2.4. – Balanço de energia, peso e ECC

As dietas experimentais não influenciaram a ingestão de EB, ED e EM (Tabela5).

Tabela 5 -Efeito da utilização monensina, óleos funcionais e enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre o balanço de energia, peso e ECC.

Item	Tratamento ¹				EPM	P ²		
	CON	MON	OF	OFA		C1	C2	C3
Ingestão de energia, Mcal/d								
Energia bruta	122	117	121	119	3,09	0,350	0,394	0,548
Energia digestível	76,0	76,2	77,6	76,2	2,20	0,783	0,807	0,647
Energia metabolizável	64,0	64,7	65,7	64,5	1,94	0,674	0,884	0,684
Energia líquida	40,9	41,6	42,2	41,4	1,28	0,627	0,921	0,702
Utilização de energia, Mcal/d								
Lactação (NE _L)	22,1	22,9	22,2	22,8	0,50	0,847	0,310	0,398
Mantença	9,70	9,68	9,63	9,65	0,203	0,071	0,909	0,160
Ganho de peso	1,63	0,18	1,14	1,32	0,299	0,946	0,102	0,101
Balanço de energia, Mcal/d								
Balanço energético líquido	7,53	8,89	9,22	7,65	1,25	0,508	0,276	0,317
Balanço energético líquido de ganho	9,15	9,07	10,4	8,96	1,16	0,512	0,581	0,646
Eficiência, (NE _L /DEI)	0,300	0,304	0,288	0,316	0,010	0,921	0,319	0,982
Peso Corporal, kg	602	600	596	598	16,8	0,067	0,921	0,157
Escore de condição corporal	2,53	2,53	2,50	2,50	0,009	0,317	0,161	0,231

¹Tratamentos: Controle (CON), sem inclusão de aditivos; Monensina (MON), adição de 13 mg monensina/kg MS (Monensina, DSM Nutritional Products, São Paulo, Brazil); OF, adição de 44 mg Crina/kg MS (Crina® Ruminants, DSM); e OFA, adição de 44 mg de Crina e 330 KNU de enzima amilolítica por kg de MS (Crina- Ronozyme Rumistar™, DSM).

²Contrastes: C1: efeito dos aditivos [controle (CON) vs aditivos (MON + OF +OFA)]; C2: efeito do tipo de aditivo (MON vs OF + OFA); C3: efeito da adição de enzima (OFvsOFA).

4.2.5. – Balanço de nitrogênio

. Dietas contendo óleos funcionais tenderam a aumentar o balanço de nitrogênio (C2, $P=0,073$) e a diminuir o N urinário (C2, $P=0,077$) em comparação à dieta contendo monensina (Tabela 6). As dietas com monensina e óleos funcionais associados a enzima amilolítica aumentaram a excreção de nitrogênio no leite (C1, $P=0,016$) e de maneira geral, os aditivos tenderam a diminuir o N fecal (C1, $P=0,057$).

Tabela 6 -Efeito da utilização monensina, óleos funcionais e enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre o balanço de nitrogênio.

Item	Tratamento ¹				EPM	P^2		
	CON	MON	OF	OFA		C1	C2	C3
Nitrogênio, g/d								
Ingerido	718	688	714	696	17,8	0,329	0,406	0,450
Fecal, g/d	264	226	238	233	9,57	0,102	0,637	0,813
Milk, g/d	163	171	164	168	3,59	0,262	0,713	0,627
Urinário	107	104	94,4	94,5	3,98	0,229	0,241	0,989
Balanço, g/d	184	187	217	200	11,8	0,120	0,073	0,229
Fecal, g/g NI	0,366	0,329	0,326	0,333	0,0088	0,057	0,980	0,734
Leite, g/g NI	0,231 ^b	0,252 ^a	0,236 ^{a,b}	0,250 ^a	0,0071	0,016	0,141	0,046
Urinário, g/g NI	0,150	0,155	0,34	0,137	0,0050	0,463	0,077	0,861
Balanço g/g NI	0,252	0,264	0,304	0,280	0,0113	0,085	0,133	0,243

¹Tratamentos: Controle (CON), sem inclusão de aditivos; Monensina (MON), adição de 13 mg monensina/kg MS (Monensina, DSM Nutritional Products, São Paulo, Brazil); OF, adição de 44 mg Crina/kg MS (Crina® Ruminants, DSM); e OFA, adição de 44 mg de Crina e 330 KNU de enzima amilolítica por kg de MS (Crina- Ronozyme RumistarTM, DSM).

²Contrastes: C1: efeito dos aditivos [controle (CON) vs aditivos (MON + OF +OFA)]; C2: efeito do tipo de aditivo (MON vs OF + OFA); C3: efeito da adição de enzima (OF vs OFA).

4.2.6. – Síntese de proteína microbiana

Não houve efeito na excreção de alantoína entre as dietas experimentais (Tabela 7). Porém, os aditivos tenderam a diminuir a excreção de ácido úrico (C1, $P=0,064$) e aumentaram relação a alantoína:purinas (C1, $P=0,012$).

Tabela 7. Efeito da utilização monensina, óleos funcionais e enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a síntese de proteína microbiana.

Item	Tratamento ¹				EPM	<i>P</i> ²		
	CON	MON	OF	OFA		C1	C2	C3
Excreção, mmol/d								
Alantoína na urina, mmol/d	374	397	375	379	19,4	0,714	0,502	0,906
Ácido úrico, mmol/d	60,3	53,9	44,6	50,2	2,86	0,064	0,270	0,410
Alantoína no leite, mmol/d	1,85	1,71	2,11	1,95	0,135	0,812	0,285	0,648
Volume, L/d	19,9	18,6	19,4	22,7	2,92	0,877	0,336	0,257
Excreção de purinas, mmol/d	436	453	422	431	21,0	0,988	0,408	0,794
Relação alantoína:purinas	0,854	0,879	0,895	0,882	0,0053	0,012	0,450	0,372
Purinas endógenas, mmol/d	46,7	46,6	46,3	46,5	0,98	0,259	0,359	0,547
Purinas absorvidas, mmol/d	458	478	442	453	24,2	0,994	0,410	0,796
Proteína Microbiana, g/d	2080	2171	2008	2058	110	0,994	0,410	0,796
Eficiência ³	121	127	117	121	5,54	0,936	0,346	0,678

¹Tratamentos: Controle (CON), sem inclusão de aditivos; Monensina (MON), adição de 13 mg monensina/kg MS (Monensina, DSM Nutritional Products, São Paulo, Brazil); OF, adição de 44 mg Crina/kg MS (Crina® Ruminants, DSM); e OFA, adição de 44 mg de Crina e 330 KNU de enzima amilolítica por kg de MS (Crina- Ronozyme Rumistar™, DSM).

²Contrastes: C1: efeito dos aditivos [controle (CON) vs aditivos (MON + OF +OFA)]; C2: efeito do tipo de aditivo (MON vs OF + OFA); C3: efeito da adição de enzima (OFvsOFA).

³Eficiência da síntese de proteína microbiana, calculado pela produção de proteína microbiana (g/d) / ingestão de nutrientes digestíveis totais (g/d).

4.2.7. – Perfil Metabólico

As dietas experimentais não influenciaram as concentrações séricas de glicose e ureia (Tabela 8).

Tabela 8. Efeito da utilização monensina, óleos funcionais e enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre o perfil metabólico sanguíneo.

Item	Tratamento ¹				EPM	<i>P</i> ²		
	CON	MON	OF	OFA		C1	C2	C3
Glicose, mg/dL	40,1	43,1	37,3	37,8	1,32	0,818	0,081	0,890
Ureia, mg/dL	30,3	32,6	30,3	32,9	1,47	0,613	0,781	0,515

¹Tratamentos: Controle (CON), sem inclusão de aditivos; Monensina (MON), adição de 13 mg monensina/kgMS (Monensina, DSM Nutritional Products, São Paulo, Brazil); OF, adição de 44 mg Crina/kg MS (Crina[®] Ruminants, DSM); e OFA, adição de 44 mg de Crina e 330 KNU de enzima amilolítica por kg de MS (Crina- Ronozyme RumistarTM, DSM).

²Contrastes: C1: efeito dos aditivos [controle (CON) vs aditivos (MON + OF + OFA)]; C2: efeito do tipo de aditivo (MON vs OF + OFA); C3: efeito da adição de enzima (OF vs OFA).

4.3 - Discussão

4.3.1 – Consumo, digestibilidade aparente total e índice de seleção alimentar

Não houve diferenças no consumo de MS e MO entre as dietas experimentais (Tabela 2). Os aditivos tenderam a aumentar a digestibilidade da matéria seca (C1, $P=0,064$) e da proteína bruta (C1, $P=0,085$). A monensina tendeu a aumentar a digestibilidade da FDN (C2, $P=0,085$) em comparação as dietas contendo óleos funcionais.

A adição de monensina não influenciou no consumo de MS em comparação dos demais aditivos, dados também relatados por Broderick (2004). Isto talvez tenha ocorrido pela dosagem utilizada no presente estudo. Porém, variações no consumo de MS também são observadas para estudos com utilização de monensina. Duffield et al. (2008b) em estudo metanalítico avaliaram os efeitos da utilização de monensina 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 (isolado ou combinado com enzima amilolítica) ou monensina 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.

Tedeschi et al. (2003) relataram que a variabilidade do efeito da inclusão de monensina 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 ou óleo funcional na dieta não influenciou o consumo.

Eifert et al. (2005) estudaram o uso de monensina (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 (17,8 kg/dia). Estes autores não observaram efeito da inclusão de monensina 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 (26,50 kg/dia). De forma semelhante, em estudo realizado com vacas no terço médio de lactação, ao avaliar a adição de monensina ou lasalocida (24 mg/kg de MS), Martineau et al. (2007) não observaram efeito dos aditivos sobre o CMS, fermentação ruminal e produção de leite.

Akins et al. (2014) avaliaram a inclusão de monensina (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). Em um recente estudo conduzido para avaliar a adição de monensina (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).

Em estudo conduzido por Ferreira de Jesus et al. (2016), com suplementação de monensina (de 22mg/Kg MS) e óleo funcional (adição de 500 mg/kg MS do produto Essential[®] composto por ácido anacárdico, cardol e cardanol) não houve diferenças entre consumo de MS, MO, PB, FDN entre os tratamentos, resultados semelhantes ao presente estudo. Vendramini et al. (2015) observou menor digestibilidade da MS e da PB de animais suplementados com Crina[®] Ruminants em comparação a dieta controle (sem aditivos), monensina e quitosana. Benchaar et al. (2016) não encontraram diferenças na digestibilidade aparente da MS, PB e FDN de vacas leiteiras suplementadas com Crina[®] Ruminants.

Existem vários fatores que podem influenciar a digestibilidade aparente total dos nutrientes e o consumo em ruminantes alimentados com monensina e/ou óleos funcionais, 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.

Em estudo conduzido por Benchaar et al. (2006), a adição de óleo funcional (Crina[®] Ruminants; 2 g/dia) e/ou monensina (350 mg/dia) na dieta de vacas no terço

médio de lactação e não influenciou sobre a digestibilidade da MS, MO e FDN, diferentemente do presente estudo. De acordo com Plaizier et al. (2000), a monensina 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 a monensina apresentou maior valor de pH em comparação às dietas contendo óleos funcionais (Tabela 3).

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 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, o que explica os dados observados no presente estudo.

Era esperado que a adição de enzima aumentasse a digestibilidade do amido, porém, neste estudo, isso não ocorreu. Chen et al. (1995) em estudo com suplementação de vacas em lactação com mistura contendo amilase não verificou mudanças na ingestão de MS, porém, houve aumento da digestibilidade aparente total da PB, sem alterações na digestibilidade do amido. O mesmo resultado foi encontrado por Takiya (2017) e Andreazzi (2015).

Existem várias explicações para a ausência de efeito da alfa-amilase sobre a digestibilidade aparente total do amido: 1) a digestibilidade de amido não foi alterada no rúmen (TRICARICO et al., 2005), 2) a digestibilidade ruminal de amido aumentou (KLINGERMAN et al., 2009), porém uma digestão compensatória ocorreu no trato digestório após o rúmen (TAYLOR; ALLEN, 2005) resultando em uma digestibilidade aparente total semelhante, ou 3) a digestibilidade ruminal do amido aumentou, mas a fermentação no intestino grosso (FIRKINS, 1997) fez com que a digestibilidade aparente total fosse a mesma.

Não houve diferença no índice de seleção de partículas entre os tratamentos. Na literatura não há trabalhos que estudaram os efeitos de enzimas amilolíticas exógenas no índice de seleção de partículas. De fato, uma das respostas mais consistentes observadas ao suplementar alfa-amilase para ruminantes é o aumento da digestibilidade de FDN

(KLINGERMAN et al., 2009; GENCOGLU et al., 2010; WEISS et al., 2011). Uma de nossas hipóteses era de que o índice de seleção de partícula poderia ser alterado pela facilidade dos animais terem em lidar com fibras longas devido ao aumento da digestibilidade do FDN como foi observado por Silva (2016), porém os tratamentos não influenciaram a digestibilidade de FDN bem como o índice de seleção de partículas.

4.3.2 – Fermentação ruminal

Dietas contendo óleos funcionais apresentaram menor pH (Tabela 3) em comparação à monensina (C2, $P=0,017$). Os aditivos diminuíram a concentração ruminal de $\text{NH}_3\text{-N}$ (C1, $P=0,026$), sendo o menor valor apresentado pela monensina (C2, $P=0,004$); a dieta com associação de enzima amilolítica e óleos funcionais tendeu a manter menor valor em comparação a dieta controle e óleos funcionais isolados (C3, $P=0,065$). Menor produção de acetato foi observada na dieta controle (C1, $P=0,046$), porém, não houve diferença na relação acetato:propionato entre as dietas experimentais. De maneira geral, os aditivos tenderam a aumentar a concentração total de AGCC (C1, $P=0,080$), especialmente as dietas contendo óleos funcionais (C2, $P=0,076$).

Segundo Orskov (1988), a variação recomendada de pH para manter a motilidade ruminal e digestão da fibra é de 6,2 a 7,1, uma vez que pH abaixo de 6,2 pode diminuir o crescimento de bactérias fibrolíticas. 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). Em trabalho conduzido por Ferreira de Jesus et al. (2016), com suplementação de monensina (de 22mg/Kg MS) e óleo funcional (adição de 500 mg/kg MS do produto Essential® composto por ácido anacárdico, cardol e cardanol) a dieta com óleos funcionais apresentou menor valor de pH (6,25 vs 6,30), resultado semelhante ao presente estudo.

Martineau et al. (2007) realizaram estudo com vacas leiteiras alimentadas com silagem de milho e inclusão de 24 mg/kg da MS de monensina, com produção de leite média de 36,6 kg/dia, e não observaram diferenças entre os tratamentos sobre as variáveis de fermentação ruminal, tais como pH ruminal médio de 6,16 e concentração de N-NH_3 de 17,7 mg/dL. Estes resultados são superiores aos valores observados neste estudo com pH médio de 6,00 e N-NH_3 de 17,6 mg/dL.

Benchaar et al. (2006) realizaram uma pesquisa com adição de óleos funcionais (Crina[®] Ruminants; 0 vs 2g/d) e de monensina (0 vs 350 mg/dia) na dieta de vacas em terço médio de lactação e relataram aumento do pH ruminal para os animais que receberam óleos funcionais (6,50) comparado a dieta controle (6,39), diferente do observado no presente estudo. Menor concentração de N-NH₃ no rúmen de vacas que tiveram inclusão de monensina na dieta (12,7 mg/100 mL), em relação a dieta sem aditivo (14 mg/100 mL), também foram relatadas pelo mesmo autor, semelhante ao observado no presente estudo, onde vacas suplementadas com monensina apresentaram menor valor de NH₃ ruminal em comparação as demais dietas.

De acordo com Van Soest (1994), a monensina é eficiente em reduzir a degradabilidade ruminal da proteína, em especial com dietas de alto teor de concentrado, com alta degradabilidade ruminal, o que explica a menor concentração de NH₃ para dieta contendo este aditivo. 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 (TEDESCHI et al., 2000). No presente estudo, a provável redução da degradação da proteína no rúmen no tratamento com monensina, pode ser indicativo da menor concentração de AGCR em comparação aos tratamentos com óleos funcionais isolados ou associados (C2, 0.051). O mesmo aconteceu com a concentração de AGCC, com tendência de menor valor para a dieta com monensina (C2, 0.076) em comparação as dietas contendo óleos funcionais.

Não houve alteração da concentração molar de propionato para animais suplementados com monensina, o que difere de vários estudos (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; 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 resulta na seleção de bactérias que produzem menos hidrogênio (H₂), acetato e butirato e mais propionato ruminal e adenosina trifosfato (RUSSELL; STROBEL, 1989).

Pesquisadores relatam em estudos que os óleos funcionais 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 funcionais (orégano, alho e pimenta) foi relatado que estes compostos reduziram a produção de uma das principais bactérias (*Butyrivibrio fibrisolvens*) responsáveis pela produção de acetato e butirato ruminal (PATRA; YU, 2015). Neste estudo, vacas que foram suplementadas com monensina apresentaram menor concentração de butirato (18.2 mM) em comparação as dietas com óleos funcionais isolados (19,4mM) e associados com enzima amilolítica (20.0mM). Em um estudo realizado por Broderick (2004), com vacas no terço inicial de lactação, a inclusão de monensina 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. Calsamiglia et al. (2007), em extensa revisão de literatura sobre óleos funcionais, compilando trabalhos *in vitro* e *in situ*, concluíram que estes inibem a desaminação e metanogênese resultando em menor acetato e proporciona concentrações mais elevadas de propionato e butirato, o que explica os dados encontrados no presente estudo.

Poucos trabalhos avaliaram a fermentação ruminal de vacas suplementadas com enzimas amilolíticas. Tricarico et al. (2005) avaliaram a fermentação de 4 vacas em lactação, com quatro tempos de coleta de fluído ruminal, e não encontraram diferenças nas concentrações de amônia. Os mesmos autores ainda encontraram um aumento linear na proporção de acetato e diminuição linear de propionato, sem alteração da proporção de iso-valerato. No entanto, estes autores não avaliaram a ingestão de MS como também a digestibilidade de nutrientes. Nozière et al. (2014) suplementaram vacas primíparas com 300 KNU/kg MS da dieta e não observaram diferenças no pH e nitrogênio amoniacal, apesar de reportarem aumento da digestibilidade aparente ruminal de amido e de matéria orgânica. Porém, os mesmos autores encontraram redução na relação acetato:propionato no rúmen. DeFrain et al. (2005) suplementaram vacas no período de transição com o extrato contendo atividade de alfa-amilase (AmaizeTM, Alltech; a 0,1% MS da dieta) e não observaram diferenças nas proporções molares dos AGV no rúmen tanto no período pré-parto como no período pós-parto.

4.3.3 – Produção e composição do leite

As dietas experimentais não influenciaram a produção e composição do leite (Tabela 4). Porém, a eficiência produtiva foi melhor para as dietas contendo aditivos em comparação a dieta controle (C1, $P=0,040$). McGuffey et al. (2001) em metanálise realizada com 11 estudos de vacas suplementadas com monensina observaram aumento médio de 1,3 kg/dia na produção de leite em comparação aos animais que não receberam monensina. O mesmo foi relatado no presente estudo, com produção média de 35,9 para o grupo que recebeu dieta com monensina e 34,6 para o grupo controle (sem aditivos). Outras revisões relataram aumento de produção de leite de 1,5kg/dia (IPHARRAGUERRE; CLARK, 2003) e 0,7kg/dia (DUFFIELD et al., 2008b).

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). Phipps et al. (2000) em estudo com vacas Holandesas em terço médio de lactação, avaliaram a inclusão de doses crescentes de monensina (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. No presente estudo, não foi relatado queda na produção de gordura na dieta com inclusão de monensina.

Martins et al. (2015) estudaram a adição de monensina (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 e óleo funcional. A inclusão do óleo funcional na ausência de monensina aumentou a produção de leite em 2,16 kg/dia e na presença de monensina, não influenciou a produção (20,05 kg/dia), enquanto que a monensina não alterou a produção de leite, independentemente da inclusão do óleo funcional.

Diferentemente do relatado no presente estudo, Ferreira de Jesus et al. (2016) observaram queda na porcentagem de gordura do leite de vacas suplementadas com monensina em comparação a dieta contendo óleos funcionais (3,46% para monensina e

3,60 para dieta contendo óleos funcionais). Vendramini et al (2015) com estudo de vacas leiteiras suplementadas com monensina e óleos funcionais (Crina[®] Ruminants), também não relatou diferenças na produção e composição do leite entre os tratamentos.

4.3.4 – Balanço de energia, nitrogênio, peso e ECC

As dietas experimentais não influenciaram a ingestão de EB, ED e EM (Tabela 5). Em estudo conduzido por Gandra et al. (2012), os autores avaliaram diferentes inclusões de monensina (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.

Dietas contendo óleos funcionais tenderam a aumentar o balanço de nitrogênio (C2, $P=0,073$) e a diminuir o N urinário (C2, $P=0,077$) em comparação à dieta contendo monensina (Tabela 6). As dietas com monensina e óleos funcionais associados a enzima amilolítica aumentaram a excreção de nitrogênio no leite (C1, $P=0,016$) e de maneira geral, os aditivos tenderam a diminuir o N fecal (C1, $P=0,057$). A associação de enzima amilolítica e óleos funcionais apresentaram maior valor de N no leite em comparação a dieta com óleos funcionais isolados (C3, $P=0,046$).

Poucos estudos têm relatado o efeito da monensina sobre o balanço de nitrogênio em vacas leiteiras. Plaizier et al. (2000) e Ruiz et al. (2001) relataram que vacas alimentadas com monensina apresentaram menor excreção fecal de N quando comparadas às vacas alimentadas com dieta sem inclusão de aditivo, fato este também relatado no presente estudo. Diferentemente do relatado por Benchaar et al. (2006), no presente estudo houve tendência ($P=0,073$) dos óleos funcionais em aumentar o balanço de N.

4.3.5 – Síntese de proteína microbiana

Não houve efeito na excreção de alantoína entre as dietas experimentais (Tabela 7). Porém, os aditivos tenderam a diminuir a excreção de ácido úrico (C1, $P=0,064$) e aumentaram relação alantoína:purinas (C1, $P=0,012$). 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 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 diferem dos apresentados por estes autores, com excreção total de 453mmol/dia de derivados de purinas e estimativa de síntese de proteína microbiana de 2171g/dia para animais suplementados com monensina.

Existem poucos estudos sobre síntese de proteína microbiana e eficiência de síntese de animais alimentados com dietas contendo óleos funcionais. 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. Em trabalho conduzido por Ferreira de Jesus et al. (2016), com suplementação de monensina (de 22mg/Kg MS) e óleo funcional (adição de 500 mg/kg MS do produto Essential® composto por ácido anacárdico, cardol e cardanol) não houveram diferenças na síntese de proteína microbiana entre os tratamentos.

Abdi et al. (2015) estudaram a inclusão de monensina (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 na dieta não influenciou o volume urinário, a excreção urinária de derivados de purinas e a síntese de proteína microbiana ruminal em comparação as dietas contendo óleos funcionais. 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, consequentemente, síntese de proteína microbiana ruminal.

4.3.6 – Perfil metabólico

O propionato pode contribuir com cerca de 32 a 73% da gliconeogênese hepática, sendo 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 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.

Neste estudo, não houve alteração na glicemia dos animais suplementados com os aditivos (Tabela 8), diferentemente do relatado por Duffield et al. (2008 a), que relatou aumento de até 3% nas concentrações de glicose quando suplementou vacas em lactação. Também não houve diferenças nas concentrações séricas de ureia plasmática. Já Ferreira de Jesus et al. (2016) relatou redução significativa da concentração de ureia no sangue (34,21 vs 39,24 para óleo funcional e monensina, respectivamente). Em metanálise para elucidar o efeito da monensina 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 em relação as que receberam a dieta controle, o que não ocorreu no presente estudo. Vendramini et al. (2015) também não relatou diferenças nas concentrações plasmáticas de glicose e ureia de vacas em lactação suplementadas com óleos funcionais (Crina® Ruminants) e monensina.

A adição de enzima com atividade amilolítica não influenciou nas concentrações de glicose e ureia no presente estudo. O mesmo foi relatado por Takiya et al. (2017) em estudo com suplementação de doses crescentes do produto Amaize™ (*Aspergillus Orizae*). Já Andreazzi (2014) observou diminuição da ureia plasmática e tendência

($P=0.07$) de maior concentração de glicose para vacas leiteiras suplementadas com o produto Rumistar[®] (0.5g/Kg MS).

4.4 – Conclusão

Não houve diferença na ingestão de matéria seca dentre os aditivos testados, porém, a inclusão destes tendeu a aumentar a digestibilidade da matéria seca e da proteína bruta. Os aditivos apresentaram melhor eficiência produtiva em comparação a dieta controle. Não houve efeito sinérgico na associação de óleos funcionais com enzima amilolítica.

5 Capítulo 2: Utilização de Monensina, Óleos Funcionais e Enzima Amilolítica na Alimentação de Vacas em Lactação – Desempenho Produtivo

5.1 – Introdução

A produção de ruminantes, no que diz respeito ao fornecimento de alimentos para o crescimento populacional mundial, busca maneiras de aumento da eficiência de utilização dos nutrientes a fim de maximizar o uso de terras agriculturáveis no mundo (KINGSTON-SMITH et al., 2013). Com o aumento da população mundial e do consumo alimentar médio em decorrência do aumento do poder 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).

Neste contexto, 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 e elevação do pH ruminal.

Porém, a União Europeia 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 derivados de plantas têm aumentado na nutrição animal, especialmente na nutrição de ruminantes.

5.1.2 – Hipótese e Objetivos

A hipótese a ser avaliada neste estudo é que as dietas contendo monensina e óleos funcionais apresentem resultados similares e que a combinação de óleos funcionais e enzima amilolítica mostre efeito sinérgico em variáveis produtivas.

O objetivo deste estudo foi comparar os efeitos da monensina e óleos funcionais isolados com combinados com com enzima amilolítica na ingestão de nutrientes e digestibilidade aparente total, concentrações séricas de glicose e ureia, produção e composição do leite de vacas em lactação.

5.1.3 – Material e método

Todos os procedimentos experimentais aplicados neste estudo seguiram os “Princípios Éticos na Experimentação Animal” recomendados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, de acordo com o protocolo de nº 9762201015.

5.1.4 – Local, animais e tratamentos

O experimento foi conduzido nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) do Departamento de Nutrição de Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em Pirassununga, no período de 22/10/2015 a 23/12/2015. A localização geográfica do LPBL é 21° 57' 28" de latitude Sul, 47° 27' 21" de longitude Oeste, com altitude de 635 metros. As análises bromatológicas e de composição do leite foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do LPBL. As demais análises foram realizadas nas dependências do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal.

Trinta vacas Holandesas (574±68 Kg peso corporal, 30.9±4,1 Kg/dia de produção de leite e 152,2 ± 54,1 dias em lactação no início do experimento), foram distribuídas em blocos de acordo com a produção de leite, dias em lactação e peso corporal. O estudo teve duração de 10 semanas, sendo a primeira de covariável e 9 seguintes de avaliações, com parâmetros avaliados semanalmente ou a cada período de três semanas.

Os tratamentos foram distribuídos aleatoriamente sendo eles: monensina (MON), com adição de 13 mg de monensina por quilo de matéria seca (Monensina, DSM Nutritional Products Ltd., Basel, Switzerland); óleos funcionais (OF), com adição de 44 mg de Crina/kg de matéria seca (Crina® Ruminants, DSM) e óleos funcionais associado à enzima amilolítica (OFA), com adição de 44 mg de Crina e 330 unidades de quilo novo (KNU) de enzima com atividade amilolítica/kg de matéria seca (Crina-Ronozyme Rumistar, DSM Nutritional Products). O produto comercial Crina® Ruminants é uma mistura de óleos funcionais composto por timol, guaiacol, eugenol, vanila e limoneno. A enzima Rumistar® é uma alfa-amilase produzida a partir de *Bacillus Licheniformis*.

Tabela 9. Ingredientes e composição bromatológica do concentrado e dieta basal utilizado no experimento (g/kg MS).

Item	Concentrado	Dieta
Ingrediente		
Silagem de milho ¹	-	480
Milho moído	415	216
Farelo de soja	284	148
Polpa Cítrica	129	67,0
Grão de soja	116	60,1
Mistura mineral e vitamínica ²	26,5	13,8
Bicarbonato de sódio	15,3	7,96
Calcário	5,60	2,91
Ureia	4,59	2,23
Cloreto de sódio	4,01	2,03
Composição química		
Matéria seca (g/kg matéria natural)	899	448
Matéria orgânica	903	922
Carboidrato não fibroso ³	540	459
Amido	314	279
Fibra em detergente neutro	119	295
Fibra em detergente ácido	92,8	197
Fibra em detergente ácido indigestível	12,0	77,2
Lignina	10,6	17,0
Proteína insolúvel em detergente neutro	50,8	32,2
Proteína insolúvel em detergente ácido	31,7	22,7
Proteína bruta	241	160
Extrato etéreo	48,5	37,9
Nutrientes digestíveis totais ⁴	806	753
Energia líquida da lactação ⁵	1,86	1,73

¹Composição média: 290 g/kg matéria seca, 72,6 g/kg proteína bruta, 241 g/kg de amido 484 g/kg fibra detergente neutro, 309 g/kg fibra em detergente ácido, 26,3g/kg extrato etéreo, 372,2 g/kg de carboidrato não fibroso, 696,9 g/kg de nutrientes digestíveis totais e 57,1g/kg de cinzas.

²Cada kg do produto contem: 88,0 g Ca, 42,0 g P, 18,0 g S, 45,0 g Mg, 123,0g Na, 14,0 mg Co, 500,0 mg Cu, 20,0 mg Cr, 1050,0 mg Fe, 28,0 mg I, 1400,0 mg Mn, 18,0mg Se, 2800,0 mg Zn, 80,0 mg biotina, 200.000,00 IU Vit A, 70.000,00 IU Vit D and 1.200,00 IU Vit E.

³CNF = 1000 - [(PB - PBureia + ureia) + EE + Cinzas + FDN], de acordo com Hall (2000).

⁴Nutrientes digestíveis totais ao nível de manutenção, calculado de acordo com NRC (2001).

⁵Estimado em três vezes o nível de manutenção, de acordo com NRC (2001).

5.1.5 – Consumo, Digestibilidade aparente total e índice de seleção alimentar

Amostras de silagem de milho (0,3 kg) foram coletadas diariamente durante os períodos de amostragem, formando-se uma amostra composta por período. Amostras

(0,5 kg) dos ingredientes do concentrado foram coletadas durante sua preparação ($n = 4$) na fábrica de ração. Amostras de sobras (10% da sobra diária) de cada animal foram coletadas diariamente durante o período de amostragem e foram obtidas amostras compostas para cada animal dentro de cada período. Após cada coleta, as amostras foram armazenadas à -20°C para análises bromatológicas. As amostras de silagem de milho, ingredientes e sobras foram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 55°C durante 72 h, e moídas em moinho de facas ou de grãos para passarem por uma peneira de 2 mm e de 1 mm (Wiley Mill, Arthur H. Thomas, Philadelphia, PA, EUA). Os teores de MS (método 930.15), matéria orgânica (MS – cinzas), proteína bruta (PB; método 984.13, $N \times 6,25$), extrato etéreo (EE; método 920.39) foram analisados em todas as amostras de acordo com os métodos descritos pela AOAC (2000). O teor de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina (método de dissolução em ácido sulfúrico) das amostras foram mensurados de acordo com Van Soest et al. (1991), os resultados obtidos foram expressos com cinzas. As análises de FDN foram realizadas com adição alfa-amilase sem sulfito de sódio (TE-149 Analisador de Fibra, Tecnal Equipamentos para Laboratório Inc., Piracicaba, Brasil). O teor de amido das amostras foi determinado por espectrofotometria após degradação enzimática (Amyloglucosidase AMG 300L, Novozymes) de acordo com Bach Knudsen (1997). Os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados de acordo com as equações do NRC (2001), a energia líquida de lactação (EL_l) foi calculada de acordo com Weiss et al. (1992) sem correção para o fator de processamento para a correção da estimativa da digestibilidade dos carboidratos não-fibrosos (CNF). Os CNF foram calculados de acordo com Hall (2000): $CNF = 100 - [(PB - PB \text{ da ureia} + ureia)] + FDN + EE + \text{cinzas}$, com os valores expressados em porcentagem.

O alimento oferecido e as sobras de cada vaca foram pesados diariamente para determinar a ingestão de nutrientes. A mistura total da dieta e as sobras foram analisadas para a distribuição de tamanho de partículas usando um sistema separador de partículas com peneiras estratificadoras (Penn StateParticleSeparator – Nasco, Fort Atkinson, WI, EUA) como descrito por Kononoff et al. (2003). O separador de partículas utilizado apresentava quatro bandejas sobrepostas (P1 a P4) com orifícios: P1 = retenção de partículas maiores do que 19 mm, P2 = retenção de partículas entre 19 e 8 mm, P3 = retenção de partículas entre 8 e 1,18 mm e P4 = com fundo fechado, a qual retém partículas com diâmetro inferiores a 1,18 mm.

O índice de seleção foi calculado como o consumo efetuado pelos animais correspondentes a cada peneira (P1 a P4) expresso pela porcentagem do consumo total predito, onde o consumo predito da fração P_i é igual ao quociente entre a matéria original ingerida e a matéria original da fração da P_i da ração total, de acordo com as equações 1, 2 e 3:

$$(1) \text{ Consumo predito} = \% \text{ retenção de } Y_x \text{ oferecido} \times \text{consumido}$$

$$(2) \text{ Consumo observado} = (\% \text{ retenção de } Y_x \times \text{oferecido}) - (\% \text{retenção de } Y_x \text{ nas sobras})$$

$$(3) \text{ Índice de Seleção} = (\text{consumo observado} \div \text{consumo predito}) \text{ em que;}$$

Desta forma, valores menores do que 1 indicam rejeição de alimentos, maiores que 1 consumo preferencial, e igual a 1 quando não houve seleção (LEONARDI; ARMENTANO, 2003).

Amostras de fezes (0,3 kg) de cada vaca foram coletadas diretamente do reto, a cada 9 horas a partir do dia 16 até o dia 18 de cada período experimental, representando uma coleta a cada 3 horas em um período de 24 horas, para contabilizar a variação da excreção de nutrientes ao longo do dia. Após cada coleta as amostras foram armazenadas à -20°C, e no final de cada período as amostras foram homogeneizadas a fim de se obter uma amostra composta por vaca e período. As amostras foram então pré-secadas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 h e moídas em moinho de facas para passarem por peneiras de 2 mm e de 1 mm (Wiley Mill, Arthur H. Thomas). Nas amostras moídas em 1 mm foram analisadas a MS, FDN, PB, EE e cinzas conforme descrito previamente.

As amostras de alimentos, sobras e fezes moídas a 2 mm foram colocadas em sacos de tecido não-tecido seguindo a recomendação de 20 mg MS/cm² (NOCEK, 1988) e incubadas no rúmen de duas vacas adaptadas a mesma dieta do experimento por 288 h de acordo com os métodos descritos por Casali et al. (2008). Depois da remoção das amostras do rúmen, os sacos foram lavados em água corrente, secos em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 h e, então analisadas para o teor de O FDNi foi utilizado para estimar a excreção fecal diária baseado na ingestão de FDNi e concentração do mesmo nas fezes. A digestibilidade de cada nutriente foi calculada a partir da ingestão do nutriente, excreção fecal e concentração do mesmo nas fezes.

5.1.6 – Produção e composição do leite

As vacas foram ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia. Amostras de leite foram coletadas de cada vaca (de acordo com a produção individual em cada ordenha) três vezes por semana. Após as coletas do período da manhã as amostras foram refrigeradas e misturadas de maneira proporcional com as amostras obtidas no período da tarde. As amostras foram analisadas para teores de gordura, proteína e lactose por metodologia infravermelha (Lactoscan®, Entelbra, São Paulo, Brasil).

A produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (PLCG) de acordo com a equação proposta por Sklan et al. (1992): $3,5\% \text{ PLCG} = (0,432 + 0,165 \times \% \text{ de gordura no leite}) \times \text{produção de leite (kg/d)}$.

5.1.7 – Peso e ECC

Durante o experimento as vacas foram avaliadas em relação ao escore de condição corporal (ECC) e o peso corporal semanalmente. O peso dos animais foi correspondente à média de duas pesagens sucessivas, feitas antes do fornecimento das alimentações e após as ordenhas durante dois dias e as mensurações do ECC foram realizadas segundo metodologia proposta por Edmonson et al. (1989).

5.1.8 – Perfil metabólico

Coletas de sangue (20 mL) foram realizadas no 16º dia de cada período experimental, por punção da artéria ou veia coccígea, após 4 horas da primeira ordenha do dia. Os tubos utilizados na coleta de sangue não tinham ativador de coágulo (BD Vacutainer®, Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA). Os tubos com sangue foram deixados em descanso à temperatura ambiente até a formação de coágulo, e então foram centrifugados $3,000 \times g$ por 15 min (4°C) e o sobrenadante utilizado para análise das concentrações de glicose e ureia. As análises foram realizadas por meio de kits comerciais (Bioclin®) que utilizam o método enzimático colorimétrico de ponto final ou

cinético. A leitura foi realizada em aparelho automático para bioquímica sanguínea (SBA-200, CELM[®]).

5.1.9 – Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o procedimento SAS (Versão 9.1.3, SAS Institute, Carry, NC, 2004), verificando normalidade dos resíduos e homogeneidade de variância por PROC UNIVARIATE. Os dados foram analisados como por PROC MIXED como medidas repetidas (Littell et al., 2006) de acordo com o modelo abaixo:

$$Y_{ijkl} = \mu + D_i + T_j + D_i \times T_j + a_k + b_l + e_{ijkl}$$

Onde: Y_{ijkl} representa a variável dependente; μ média geral; D_i efeito fixo do tratamento; T_j efeito fixo de tempo; $D_i \times T_j$ efeito fixo de tratamento pela interação temporal; a_k efeito aleatório do animal; b_l efeito fixo do bloco; e_{ijkl} resíduo. A metodologia Akaike foi utilizada para determinação da matriz de covariância, selecionando-se a de menor valor para este parâmetro (AKAIKE, 1974). Os graus de liberdade foram definidos de acordo com o método de Kenward e Rogers (1997). Dados coletados uma semana antes do início do estudo foram utilizados para ajuste de covariáveis. As diferenças entre os tratamentos foram analisadas de acordo com contrastes ortogonais: C1: efeito do aditivo utilizado (MON vs EO + EOA) e C2: efeito da adição de amilase (EO vs EOA). O nível de significância foi considerado quando $P \leq 0,05$ e tendência quando $P \leq 0,10$.

5.2- Resultados

5.2.1. Perfil metabólico, produção e composição do leite

Os tratamentos contendo óleos funcionais (OF e OFA) apresentaram respostas similares nas concentrações séricas de glicose e ureia em comparação ao tratamento com Monensina (Tabela 10). Embora não tenha sido encontrado diferenças na produção de leite e sólidos, os tratamentos contendo óleos funcionais apresentaram teores de lactose e proteína mais baixo ($P < 0,001$). Tratamentos contendo óleos funcionais, em especial isolados (OF), diminuíram a produção de proteína ($P \leq 0,039$) e lactose no leite. Ainda, tratamento com óleos funcionais associados à enzima amilolítica apresentaram maiores teores de lactose ($P \leq 0,003$) e proteína no leite em comparação ao tratamento com óleos funcionais isolados, resultados semelhantes a Monensina. Houve interação de tempo e tratamento para eficiência de produção de leite ($P = 0,0017$).

Tabela 10. Efeito da utilização de monensina, óleos funcionais e enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre o perfil metabólico sanguíneo e a produção e composição do leite.

Item	Tratamento1			EPM	P2			
	MON	OF	OFA		T	Tr×T	C2	C3
Concentração sérica, mg/dL								
Glicose	41,2	41,1	41,7	0,64	<0,001	0,341	0,915	0,743
Ureia	30,2	31,9	29,3	0,71	0,148	0,827	0,833	0,226
Produção, kg/d								
Leite	31,5	31,1	31,9	0,71	<0,001	0,812	0,985	0,438
PLCG3	32,0	30,8	31,9	0,75	<0,001	0,862	0,498	0,293
Lactose	1,48	1,41	1,48	0,030	<0,001	0,971	0,321	0,067
Gordura	1,11	1,07	1,11	0,032	<0,001	0,612	0,604	0,400
Proteína	0,99	0,93	0,99	0,019	<0,001	0,880	0,273	0,032
Composição, g/kg								
Lactose	46,4a	45,7b	46,2a	0,11	0,007	0,613	<0,001	<0,001
Gordura	35,7	34,5	34,9	0,88	0,001	0,262	0,392	0,757
Proteína	31,0a	30,3b	31,0a	0,160	<0,001	0,405	0,039	0,003
Eficiência ⁴	1,40	1,43	1,35	0,020	<0,001	0,017	0,804	0,077
Peso e ECC								
Peso (kg)	586	586	588	1,35	<0,001	0,180	0,675	0,542
ECC	2,60	2,58	2,61	0,010	0,065	0,129	0,827	0,127

¹Tratamentos: Monensina (MON), adição de 13 mg monensina/kg MS (Monensina, DSM Nutritional Products, São Paulo, Brazil); OF, adição de 44 mg Crina/kg MS (Crina[®] Ruminants, DSM); e FOA, adição de 44 mg Crina e 330 KNU de enzima amilolítica/ kg MS (Crina- Ronozyme RumistarTM, DSM).

²Efeito de Tempo (T), interação de tempo e tratamento (Tr.×T); Contrastes: C2: efeito do tipo de aditivo (MON vs OF + OFA); C3: efeito da adição de enzima (OFvsOFA).

³Produção de leite corrigida para energia: PLCE = 0,327 × produção de leite (kg/d) + 12,86 × produção de gordura (kg/d) + 7,65 × produção de proteína (kg/d).

⁴CProdução de leite (kg/d) ÷ ingestão de matéria seca (kg/d).

^{a-b}Tukey (P≤0.05).

5.2.2. Consumo, digestibilidade aparente total e índice de seleção alimentar

Não houve efeito de interação tempo e tratamento na ingestão de matéria seca ($P \geq 0,139$) entre as dietas experimentais. A adição de enzima amilolítica tendeu a aumentar a ingestão de matéria seca e orgânica ($P \leq 0,066$).

Tabela 11. Efeito da utilização monensina, óleos funcionais e enzima amilolítica na alimentação de vacas em lactação sobre a ingestão de matéria seca e digestibilidade aparente total.

	Tratamento ¹				P ²			
	MON	OF	OFA	EPM	T	Tr.×T	C2	C3
Ingestão, kg/d								
Matéria Seca	22,8	22,4	23,6	0,31	<0,001	0,139	0,716	0,062
Matéria Orgânica	20,9	20,6	21,7	0,28	<0,001	0,122	0,698	0,066
Amido	9,71	9,85	10,0	0,147	0,746	0,794	0,732	0,604
Fibra detergenteneutro	6,41	6,42	6,60	0,093	<0,001	0,607	0,573	0,370
Proteína bruta	3,74	3,78	3,86	0,060	0,868	0,642	0,496	0,567
FDNi	1,69	1,68	1,71	0,026	0,009	0,498	0,814	0,633
Extrato etéreo	0,90	0,91	0,93	0,014	0,605	0,667	0,444	0,605
Ingestão, kg/100kg PC								
Matéria seca	3,87	3,87	4,01	0,045	<0,001	0,211	0,439	0,208
Fibra detergenteneutro	1,10	1,10	1,13	0,015	0,001	0,604	0,707	0,317
Coefficiente de digestibilidade								
Matéria seca	0,680	0,689	0,690	0,0045	0,005	0,512	0,302	0,968
Matéria orgânica	0,700	0,711	0,710	0,0049	0,060	0,361	0,301	0,971
Amido	0,843	0,858	0,856	0,0057	0,026	0,141	0,235	0,864
Fibra detergente neutro	0,466	0,473	0,481	0,0084	0,030	0,760	0,475	0,666
Proteína bruta	0,679	0,680	0,680	0,0063	0,009	0,607	0,974	0,992
Extrato etéreo	0,831	0,839	0,844	0,0066	0,057	0,968	0,476	0,782
Índice de seleção alimentar								
>38mm	0,897	0,896	0,859	0,0152	0,002	0,996	0,537	0,329
38 – 19mm	1,008	1,014	1,008	0,0031	<0,001	0,198	0,684	0,446
19 – 8mm	1,014	1,023	1,022	0,0032	0,228	0,184	0,136	0,942
<8mm	1,030	1,040	1,056	0,0060	0,002	0,397	0,109	0,213

¹Tratamentos: Monensina (MON), adição de 13 mg monensina/kg MS (Monensina, DSM Nutritional Products, São Paulo, Brazil); OF, adição de 44 mg Crina/kg MS (Crina® Ruminants, DSM); e FOA, adição de 44 mg Crina e 330 KNU de enzima amilolítica/ kg MS (Crina- Ronozyme Rumistar™, DSM).

²Efeito de Tempo (T), interação de tempo e tratamento (Tr.×T); Contrastes: C2: efeito do tipo de aditivo (MON vs OF + OFA); C3: efeito da adição de enzima (OFvsOFA).

5.3 – Discussão

5.3.1.- Perfil metabólico, produção e composição do leite

O propionato pode contribuir com cerca de 32 a 73% da gliconeogênese hepática, sendo 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 de monensina em dietas pode aumentar o propionato ruminal com possível aumento da gliconeogênese hepática, o que pode resultar em maior disponibilidade de glicose para o metabolismo animal.

Neste estudo, não houve alteração na glicemia dos animais suplementados com os aditivos, diferentemente do relatado por Duffield et al. (2008 a), que verificou aumento de até 3% nas concentrações de glicose quando suplementou vacas em lactação com monensina. Também não houve diferenças nas concentrações séricas de ureia plasmática no presente estudo. Já Ferreira de Jesus et al. (2016) relatou redução significativa da concentração de ureia no sangue (34,21 vs 39,24 para óleo funcional e monensina, respectivamente). Em metanálise para elucidar o efeito da monensina 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 em relação as que receberam a dieta controle, o que não ocorreu no presente estudo. Vendramini et al. (2015) também não relatou diferenças nas concentrações plasmáticas de glicose e ureia de vacas em lactação suplementadas com óleos funcionais (Crina[®] Ruminants) e monensina.

A adição de enzima com atividade amilolítica não influenciou nas concentrações de glicose e ureia no presente estudo. O mesmo foi relatado por Takiya et al. (2017) em estudo com suplementação de doses crescentes do produto AmaizeTM (*Aspergillus Orizae*). Já Andreazzi (2014) observou diminuição da ureia plasmática e tendência (P=0.07) de maior concentração de glicose para vacas leiteiras suplementadas com o produto Rumistar[®] (0.5g/Kg MS).

Não houve diferenças na produção de leite e gordura entre as dietas experimentais, porém, os tratamentos contendo óleos funcionais apresentaram menores

teores de lactose e proteína ($P < 0,001$). Estes dados diferem do que foi descrito por Vendramini et al. (2015), que não encontraram diferenças para composição do leite de vacas suplementadas com o produto Crina® Ruminants. Ferreira de Jesus et al. (2016), em estudo com suplementação de monensina (de 22mg/Kg MS) e óleo funcional (adição de 500 mg/kg MS do produto Essential® composto por ácido anacárdico, cardol e cardanol) a produção de lactose e proteína foi semelhante entre os tratamentos.

Benchaar et al. (2006b), não encontrou mudança na produção de leite de vacas alimentadas com 2g/dia de Crina® Ruminants, porém, o teor de lactose foi maior para vacas suplementadas com este aditivo, fato inverso ao ocorrido no presente estudo. Já em outro estudo, realizado posteriormente, os mesmos autores não relataram diferenças na composição do leite quando da utilização do produto Crina® Ruminants.

5.3.2 – Consumo e digestibilidade aparente total e índice de seleção alimentar

Não houve diferença no consumo de MS entre a dieta contendo monensina e óleos funcionais; já a dieta com associação de óleos funcionais e enzima amilolítica tendeu ($P < 0.066$) a aumentar o consumo de MS e MO (Tabela 11). O consumo de matéria seca de animais suplementados com o produto Crina® Ruminants apresenta variações na literatura. Benchaar et al. (2007b) não observaram diferenças no consumo em estudo com animais suplementados com 750mg/kg MS deste produto. Os mesmos autores, em estudo com inclusão de 0 e 2g/dia do produto Crina® Ruminants e 0 e 350mg/dia de monensina na dieta de vacas em lactação não observaram efeitos sobre consumo de MS e produção de leite, digestibilidade aparente da MS, MO e FDN. Em estudo conduzido por Vendramini et al. (2015) também não foram observadas diferenças no CMS e digestibilidade de vacas lactação suplementadas com o produto Crina® Ruminants.

A adição de monensina não influenciou no consumo de MS em comparação dos demais aditivos, dados também relatados por Broderick (2004). Isto talvez tenha ocorrido pela dosagem utilizada no presente estudo. Porém, variações no consumo de MS também são observadas para estudos com utilização de monensina. Estudo conduzido por Symanowski et al. (1999) com utilização de 0, 8, 16, e 24mg/Kg de MS de monensina foi observado redução no consumo de MS nos dois últimos níveis

avaliados. O mesmo foi relato por MccLary et al. (2005) avaliando doses de 0, 7, 15 e 22mg/Kg de MS de monensina para vacas leiteiras, com consequente redução no consumo para suplementação com 15 e 22mg/Kg de MS. Já Vendramini et al. (2015), com suplementação de 24mg/kg de MS de vacas em lactação não observaram redução no consumo.

Em estudo conduzido por Ferreira de Jesus et al. (2016), com suplementação de monensina (de 22mg/Kg MS) e óleo funcional (adição de 500 mg/kg MS do produto Essential® composto por ácido anacárdico, cardol e cardanol) não houve diferenças entre consumo de MS, MO, PB, FDN entre os tratamentos, resultados semelhantes ao presente estudo. Vendramini et al, (2015) observou menor digestibilidade da MS e da PB de animais suplementados com Crina® Ruminants em comparação a dieta controle (sem aditivos), monensina e quitosana.

A dieta experimental com associação de óleos funcionais e enzima α -amilolítica tendeu a aumentar a ingestão de MS e MO. Em estudo realizado por Takiya et al. (2017) com utilização de doses crescentes de enzima com atividade amilolítica, a inclusão deste aditivo aumentou linearmente ($P=0.031$) a digestibilidade da PB e tendeu a aumentar a digestibilidade da MS ($P=0,060$), sem efeitos na ingestão de MS e MO. Em vários estudos com vacas em lactação, não houve diferenças na ingestão de MS quando os animais foram suplementados com enzima amilolítica [662 UD/kg MS ingerida (DEFRAIN et al., 2005); 311-332 KNU/kg de MS ingerida (WEISS et al., 2011); VARGAS-RODRIGUES et al., 2014].

Era esperado que a adição de enzima aumentasse a digestibilidade do amido, porém, neste estudo, isso não ocorreu. Chen et al. (1995) em estudo com suplementação de vacas em lactação com mistura contendo amilase não verificou mudanças na ingestão de MS, porém, houve aumento da digestibilidade aparente total da PB, sem alterações na digestibilidade do amido. O mesmo resultado foi encontrado por Takiya (2017) e Andreazzi (2015).

Existem várias explicações para a ausência de efeito da α -amilase sobre a digestibilidade aparente total do amido: 1) a digestibilidade de amido não foi alterada no rúmen (TRICARICO et al., 2005), 2) a digestibilidade ruminal de amido aumentou (KLINGERMAN et al., 2009), porém uma digestão compensatória ocorreu no trato digestório após o rúmen (TAYLOR; ALLEN, 2005) resultando em uma digestibilidade

aparente total semelhante, ou 3) a digestibilidade ruminal do amido aumentou, mas a fermentação no intestino grosso (FIRKINS, 1997) fez com que a digestibilidade aparente total fosse a mesma.

Não houve diferença no índice de seleção de partículas entre os tratamentos. Na literatura não há trabalhos que estudaram os efeitos de enzimas amilolíticas exógenas no índice de seleção de partículas. De fato, uma das respostas mais consistentes observadas ao suplementar alfa-amilase para ruminantes é o aumento da digestibilidade de FDN (KLINGERMAN et al., 2009; GENCOGLU et al., 2010; WEISS et al., 2011). Uma de nossas hipóteses era de que o índice de seleção de partícula poderia ser alterado pela facilidade dos animais terem em lidar com fibras longas devido ao aumento da digestibilidade do FDN como foi observado por Silva (2016), porém os tratamentos não influenciaram a digestibilidade de FDN bem como o índice de seleção de partículas.

5.4- Conclusão

Dietas contendo monensina e óleos funcionais apresentaram resultados semelhantes na ingestão de matéria seca e de nutrientes. Menores teores de sólidos no leite foram encontrados para as dietas contendo óleos funcionais (isolados ou combinados com enzima amilolítica). Não houve efeito sinérgico da associação de óleos funcionais e enzima amilolítica.

6 - Referências Bibliográficas

AEHLE, W. **Enzymes in Industry** – Production and Applications. 2nd ed. Wiley-CH Verlag GmbH & Co. LGA, Weinheim, Germany, 2004.

AKAIKE, H. **A new look at the statistical model identification**. IEEE Transactions on Automatic Control, v. AC - 19, n. 6, p. 716-723, 1974.

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.

ANDREAZZI, A.S. Suplementação de amilase para vacas leiteiras em lactação – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Escola de Veterinária Belo Horizonte, 2014.

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.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 16th ed. Washington, DC.,USA, 2000.

BACH KNUDSEN, K. E. Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. **Animal Feed Science and Technology**, v. 67, p. 319-338, 1997.

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, 2000.

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.

BALDWIN, P. M. Starch granule-associated proteins and polypeptides: a review. **Starch/Starke**, v. 53, p. 475-503, 2001.

BEAUCHEMIN, K.A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D.P.; YANG, W.Z. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.81, suppl.2 p. E37-E47, 2003.

BEAUCHMIN, K. A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D. P., YANG, W. Z.; RODE, L. M. Mode of action of exogenous cell wall degrading enzymes for ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, p 13-22, 2004.

BEDFORD, M. R.; SCHULZE, H. Exogenous enzymes in pigs and poultry. **Nutritional Research Reviews**, v. 11, p. 91–114, 1998.

BENCHAAAR, C.; DUYNISVELD, J.L.; CHARMLEY, E. Effects of monensin and increasing dose levels of a mixture of essential oil compounds on intake, digestion and growth performance of beef cattle. Canadian. **Journal. Animal Science** v.86, p.91–96, 2006a.

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. B

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.

BLAZEK, J. Role of amylose in structure-function relationship in starches from Australian wheat varieties. Tese de Doutorado, Universidade de Sidnei, Sidnei, Austrália. 2008.

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

BRODERICK, G. A.; CLAYTON, M. K. A statistical evaluation of animal and nutritional factors. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p.2964-2971, 1997.

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.

BUENDIA, G.; MENDOZA, G.D.; BÁRCENA, R. et al. Effects of glucoamylase from *Aspergillus niger* on in vitro digestibility, of maize and sorghum and on lamb performance. **Agrociencia**. v.37, p.317–322, 2003.

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.

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, n. 6, p. 2580-2595, 2007.

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.; 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.

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.

CHAVES, A.V.; HE, M.L.; YANG, W.Z.; HRISTOV, A.N.; MCALLISTER, T.A.; BENCHAAAR, C. Effects of essential oils on the proteolytic, deaminative and Methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. **Canadian Journal Of Animal Science**, Ottawa, v. 88, n. 1, p. 117-122, 2008.

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. Aberdeen: Rowett Research Institute: **International Feed Research Unit**. Bucksburnd, p.21, 1992.

CHEN, M. K. H.; HUBER, J. T.; SIMAS, J.; THEURER, C. B.; YU, P.; CHAN, S. C.; F. SANTOS, WU, Z.; SWINGLE, R. S. Effect of enzyme treatment or steam-flaking of sorghum grain on lactation and digestion in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 1721-1727, 1995.

CHESSON, A.; FORSBERG, C. 1997. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. In: P. N. Hobson and C. S. Stewart, editors, The rumen microbial ecosystem. **Elsevier Science Publishers Ltd., London, UK**. p. 329–381, 1997.

CHIZZOTTI, M. L.; VALADARES, S. C.; VALADARES FILHO, R.F.D.; CHIZZOTTI, F. H. M.; TEDESCHI, L. O. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. **Livestock Science**, v. 113, n.2-3, p. 218-225, 2008.

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.

COLOMBATTO, D.; BEAUCHEMIN, K.A. A proposed methodology to standardize the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. **Canadian Journal of Animal Science**. v.83, p.559-568, 2003.

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.
CORNEILL, H. J.; HOVELING, A. W.; CHRYSS, A.; ROGERS, M. Particle size distribution in wheat starch and its importance in processing. **Starch/Starke**, v. 46, p. 203-207, 1994.

COTTA, M. Amylolytic of selected species of ruminal bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 772-776, 1988.

COWAN, W. D. Factors affecting the manufacture, distribution, application and overall quality of enzymes in poultry feeds. p. 175-184. In: **Joint proceedings of the second international roundtable on animal feed biotechnology – Probiotics, and workshop on animal feed enzymes**, Ottawa, ON, Canada, 1994.

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**, Champaign, v. 40, n. 10, 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.

DEFRAIN, J. M.; HIPPEN, A. R.; KASCHEUR, K. F.; TRICARICO, J. M. Effects of dietary α -amylase on metabolism and performance of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 4405-4413, 2005.

DE GEES, H.; STEINFELD, H. D. BLACKBURN. 1997. Livestock and the Environment: Finding a Balance. European Commission Directorate- General for Development, **Development Policy Sustainable Development and Natural Resources**, Brussels, Belgium.

DEMETZOS, C., KATERINOPOULOS, H., KOUVARAKIS, A., STRATIGAKIS, N., LOUKIS, A., EKONOMAKIS, C., SPILOTIS, V., TSAKNIS, J. Composition, antimicrobial activity of essential oil of *Cistus creticus* subsp. *Eriocephalus*. **Planta Medica**. v. 63, p. 477–479, 1997.

DILORENZO, N.; SMITH, D. R.; QUINN, M. J.; MAY, M. L.; PONCE, C. H.; STEINBERG, W.; ENGSTROM, M. A.; GALYEAN. Effect of grain processing and supplementation with exogenous amylase on nutrient digestibility in feedlot diets. **Livestock Science**, v. 137, pp. 178:184, 2011.

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, 2008a.

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, 2008b.

EDMONSON, A. J.; LEAN, I. J.; WEAVER, L. D.; FARVER, T.; WEBSTER, G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 1, 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, n. 9, 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 DE JESUS, E. F. ; DEL VALLE, T. A. ; CALOMENI, G. D. ; SILVA, T. H. ; TAKIYA, C. S. ; VENDRAMINI, T. H. A. ; PAIVA, P. G. ; SILVA, G. G. ; NETTO, A. S. ; RENNO, F. P.. Influence of a blend of functional oils or monensin on nutrient intake and digestibility, ruminal fermentation and milk production of dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 219, p. 59-67, 2016.

FLINT, H. J.; FORSBERG, C. W. Polysaccharide degradation in the rumen: Biochemistry and genetics. In: ENGELHARDT, W. W.; LEONHARD-MAREK, S.; BREVES, G. et al. (Eds.). Ruminant physiology: Digestion, metabolism, growth and reproduction. **Stuttgart: Enke**, P. 43-70, 1995.

FIRKINS, J. L. Effects of feeding nonforage fiber sources on site of fiber digestion. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1428-1437, 1997.

GADO, H.M.; SALEM, A.Z.M.; ROBINSON, P.H.; HASSAN, M. Influence of exogenous enzymes on nutrient digestibility, extent of ruminal fermentation as well as milk production and composition in dairy cows. **An. Feed Science and Technology**. v.154, p.36-46, 2009.

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.; RENNÓ, F. P.; FREITAS JÚNIOR, J. E.; SANTOS, M. V. PRADA E SILVA, L. F.; ARAÚJO, A. P. C. Productive performance and milk protein fraction composition of dairy cows supplemented with sodium monensin. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 8, p. 1810-1817, 2010.

GANDRA, J. R.; RENNÓ, 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.

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 cow supplemented with ricinoleic acid from castor oil. **Archivos de Zootecnia**, v. 63, p. 575-585, 2014.

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.

GENCOGLU, H.; SHAVER, R. D.; STEINBERG, W.; ENSINK, J.; FERRARETO, L. F.; BERTICS, S. J.; LOPES, J. C.; AKINS, M. S. Effect of feeding a reduced-starch diet with or without amylase addition on lactation performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 723-732, 2009.

GETACHEW, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Tropical browses: content of phenolic compounds, estimation of energetic value and stoichiometrical relationship between short chain fatty acid and in vitro gas production. **Journal of Agricultural Science**, v. 139, p. 341-352, 2002.

GIANNENAS I.; SKOUFOS, J.; GIANNAKOPOULOS, C.; WIEMANN M.; GORTZI, O.; LALAS, S.; KYRIAZAKIS, I. Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in Chios dairy ewes. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 5569–5577, 2011.

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.

GRANT, R.J. Optimizing starch concentrations in dairy rations. In: W.H.MINER AGRICULTURAL RESEARCH INSTITUTE ANNUAL TRI-STATE DAIRY NUTRITION CONFERENCE, 14.,2005, **Fort Wayne Proceedings...** Fort Wayne, p.73-79, 2005.

GRAY, G. M. Starch digestion and absorption in nonruminants. **J. Nutr.** p. 122-172, 1992.

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.

GURUNG, N.; RAY, S.; BOSE, S.; RAI, V. A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries medicine, and beyond. **BioMed Research International**, p. 18, 2013.

HALL, M. B. Calculation of non-structural carbohydrate content of feeds that contain non-protein nitrogen. **Gainesville: University of Florida**, 2000. p. A-25 (Bulletin, 339).

HAMAKER, B. R.; MOHAMED, A. A.; HABBEN, J. E.; HUANG, C. P.; LARKINS, B. A. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. **Cereal Chemistry**, v. 72, p. 583-588, 1995.

HANEY, JR. M, E.; HOEHN, M. M. Monensin, a new biologically active compound. I.discovery and isolation. **Antimicrobial Agents Chemother**, p.349, 1967.

HARMON, D. L. Dietary influences on carbohydrases and small intestinal starch hydrolysis capacity in ruminants. **J. Nutr.** v.122 p.203, 1992.

HARMON, D. L. Nutritional regulation of postruminal digestive enzymes in ruminants. **Journal of Dairy Science**. v.76, p.2102, 1993.

HARRISON, G.A.; TRICARICO, J.M. Case Study: Effects of an *Aspergillus oryzae* containing alpha amylase on lactational performance in commercial dairy herds. **The Prof. Animal Scientist**. v.23, p.291-294, 2007.

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.

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.

JANSSEN, A.M., CHIN, N.L., SCHEFFER, J.J.M., BAERHEIM-SVENDSEN, A. Screening for antimicrobial activity of some essential- **Journal Animal Science**, v. 77, p. 2554-2563, 1986.

JOBIM C.C., BRANCO A.B., SANTOS G.T. Silagem de grãos úmidos na alimentação de bovinos. In: **V Simpósio Goiano sobre Manejo e Nutrição de Bovinos de Corte e Leite, Goiânia**. p. 357-376, 2003.

JOUANY, J. P. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. **Journal of Nutrition**, v. 126, 1335-1345, 1996.

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.

KENWARD, M.; ROGER, J. Small sample inference for fixed effects from restricted maximum likelihood. **Biometrics**, v. 53, p. 983-997, 1997.

KINGSTON-SMITH, A. H.; MARSHALL, A. H.; MOORBY, J. M. Breeding for genetic improvement of forage plants in relation to increasing animal production with reduced environmental footprint. **Animal Feed Science and Technology**, v. 7, p. 79-88, 2013.

KLINGERMAN, C. M.; HU, W.; MCDONELL, E. E.; DERBEDROSIAN, M. C.; KUNG JR., L. An evaluation of exogenous enzymes with amylolytic activity for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 1050-1059, 2009.

KOSLOZKY, G. **Bioquímica de ruminantes**. 2. ed. Santa Maria: Ed. UFSM, 2009. p. 216.

KONONOFF, P. J.; HEINRICHS, A. J. BUCKMASTER, D. R. Modification of the Penn State Particle Separator and the effects of moisture content on its measurements. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1858– 1863, 2003.

KOTARSKI, S. F.; WANISKA, R.D.; THURN, K. Starch hydrolysis by the ruminal microflora. **Journal of Nutrition**, p.178–190, 1992.

KREIKEMEIER, K. K.; HARMON, D. L.; BRANDT, R. T.; AVERY JR., T. B.; JOHNSON, D. E. Small intestinal starch digestion in steers: effects of various levels of abomasal glucose, corn starch and corn dextrin infusion on small intestinal disappearance and net glucose absorption. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 328-338, 1991.

KUNG, L. JR.; WILLIAMS, P.; SCHMIDT, R. J.; HU, W. A blend of essential plantoils used as an additive to alter silage fermentation or used as a feed additive for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.4793–4800, 2008.

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.

LANDRY, J.; DELHAYE, S.; DAMERVAL, C. Improved method for isolating and quantitating α -amino nitrogen as non-protein, true protein, salt-soluble proteins, zeins, and true glutelins in maize endosperm. **Cereal Chemistry**, v. 77, p. 620-626, 2000.

LARSON, J.; HOFFMAN, P. C. Technical Note: A method to quantify prolamin proteins in corn that are negatively related to starch digestibility in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 4834-4839, 2008.

LÁSZTITY, R. The chemistry of cereal proteins. 2 ed., CRC Press, Inc., **Roca Raton**, 1984.

LEONARDI, C.; ARMENTANO, L. E. Effect of quantity, quality and particle length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 557-564, 2003.

LIS-BALCHIN, M., DEANS, S.G. Bioactivity of selected plant essential oils against *listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v.82, p.759–762, 1997.

MARTINS, M. F.; SARAN NETTO, A; LEME, P. R.; PINHEIRO, M. G.; TORRENT, J.; WELTER, K. C.; ARRUDA, I. Effects of functional 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, 2015.

Mc ALLISTER T. A., RODE L. M., MAJOR D. J., CHUNG K. J., BUCHAMAN J. G. Effect of ruminal microbial colonization on cereal grain digestion. **Journal of Animal Science**, v. 70, p.571, 1990.

Mc ALLISTER, T.A.; BAE, H.D.; JONES, G.A.; CHENG, K.J. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of Animal Science*. v.72, p.3004-3018, 1994.
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.

MCCLARY, D. G.; GREEN, E. E.; THOMAS, J. I. D. WILKINSON, J. I. D.; MCGUFFEY, R. K.; AGUILAR, A. A.; MECHOR, G D.; CUI, Z. Effect of rumensin on performance and health in lactating dairy cows. In: **Four state nutrition and management conference, 2005, Dubuque**. Proceeding... Dubuque: Iowa State University, p.255-264, 2005.

MCLEOD, K. R.; BALDWIN, R. L.; HARMON, D. L.; RICHARDS, C. J.; RUMPLER, W. C. Influence of ruminal and postruminal starch infusion on energy balance in growing steers. In: **Energy Metabolism of Farm Animals**, p. 385-388. EAAP Publ, Wageningen Pers, Wageningen, Holanda, 2001.

MORAES, L.M.P. Amilases. In: SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.

MORGAVI, D. P.; BEUCHEMIN, K. A.; NSEREKO, V. L.; RODE, L. M.; IWASSA, A. D.; YANG, W. Z.; McALLISTER, T. A.; WANG, Y. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. **Journal of Dairy Science**, v.83, pp.1310:1321, 2000.

MURAD, H. A.; AZZAZ, H. H. Cellulase and dairy animal feeding. **Biotechnology**, v. 9, p. 238-256, 2010.

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., 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.

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.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requirements for beef cattle, 7.ed. Washington, D.C.: **National Academic Press, National Academy of Science**, 1996.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requirements of dairy cattle. 7. rev. ed. Washington, D.C.: **National Academic Press, National Academy of Science**, 2001.

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. *FemsMicrobiol 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.

NOZIÈRE, P.; STEINBERG, W.; SILBERBERG, M.; MORGAVI, D. P. Amylase addition increases starch ruminal digestion in first-lactation cows fed high and low starch diets. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 1-10, 2014.

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, N. J. F.; MELO, M. M.; LAGO, L. A. NASCIMENTO, E. F. Hemograma, bioquímica sérica e histologia da biópsia hepática de bovinos após administração de polpa cítrica. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia**, v. 57, n.3, p.418-422, 2005.

OPATPANATANAKIT, Y.; KELLAWAY, R. C.; LEAN, I. J.; ANNISON, G., KIRBY, A. Microbial fermentation of cereal grains in vitro. **Australian Journal of Agriculture Research**, v. 45, p. 1247-1263, 1994.

ORELLANA BOERO, P.; BALCELLS, J.; MARTÍN-ORÚE, S. M.; LIANG, J. B.; GUADA, J. A. Excretion of purine derivates in cows: endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. **Livestock Production Science**, v.68, p.243-250, 2001.

ORPIN C.G.; JOBLIN, K.N. The rumen anaerobic fungi. In: Hobson PN, Stewart CS (eds). **The rumen microbial ecosystem**. London: Chapman and Hall, p. 140-195, 1997.

ORTIZ-RODEA, A.; NORIEGA-CARRILLO, A.; SALEM, A. Z. M.; CASTELAN ORTEGA, O.; GONZALEZ-RONQUILLO, M. The use of exogenous enzymes in dairy cattle on milk production and their chemical composition: a meta-analysis. **Animal Nutrition and Feed Technology**, v. 13, p. 399-409, 2013.

OSBORNE, J. K.; MUTSVANGWA, T.; ALZAHAL, O.; DUFFIELD, T. F.; BAGG, R.; DICK, P.; VESSIE, G.; MCBRIDE, B. W. Effects of monensin on ruminal forage degradability and total tract diet digestibility in lactating dairy cows during graininduced subacute ruminal acidosis. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1840–1847, 2004.

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.

PHILIPPEAU, C.; LANDRY, J.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of the protein distribution of maize endosperm on ruminal starch degradability. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 80, p. 404-408, 2000.

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.

RAMOS, B. M. O.; CHAMPION, M.; PONCET, C.; MIZUBUTI, I. Y.; NOZIÉRE, P. Effects of virtuousness and particle size of maize grain on ruminal and intestinal in sacco degradation of dry matter, starch and nitrogen. **Animal Feed Science and Technology**, v. 148, p. 253-266, 2009.

RAVINDRAM, V. Feed enzymes: The science, practice, and metabolic realities. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, p. 628-636, 2013.

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.

ROJO, R.; MENDOZA, G.D.; CROSBY, M.M. Use of the thermostable amylase from *Bacillus licheniformis* on in vitro digestibility from sorghum and corn starch. **Agrociencia**, v.35, p. 423–427, 2001.

ROJO, R.; MENDOZA G.D.; GONZALEZ S.S. et al. Effects of exogenous amylases from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus niger* on ruminal starch digestion and lamb performance. **Animal Feed Science and Techonology**, v.123-124, p.655-665, 2005.

ROONEY, L. W.; PFLUGFELDER, R. L. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. **Journal of Animal Science**, v.63 p.1607, 1986.

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.; STROBEL, H. J. Effects of Additives on In Vitro Ruminant 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.; 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.

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.

SHELLING, G. 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.

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

SILVA, T. H. Enzima fibrolítica exógena na alimentação de vacas em lactação. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga, 2016.

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

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.

SPEARS, J. W. Ionophores and nutrient digestion and absorption in ruminants. **Journal of Nutrition**, v.120, p. 620-632, 1990.

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.

SWENSON, M.J.; REECE, W.O. Dukes: **Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986. 856p.

SYMANOWSKI, J. T.; GREEN, H. B.; WAGNER, J. R. ET. AL. Milk production and efficiency of cows fed monensin. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p.75, 1999. Supl.

TASSOUL M. D., SHAVER R. D. Effect of a mixture of supplemental dietary plantessential oils on performance of periparturient and early lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**. V.92 p. 1734- 1740, 2009.

TAYLOR, C. C.; ALLEN, M. S. Corn grain endosperm type and brown midrib 3 corn silage: site of digestion and ruminal digestion kinetics in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 1413-1424, 2005.

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.

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.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J. Starch. In: Steibuchel, A. (Editor da Série) Vandamme, E. J.; De Baets, S.; Steinbuchel, A. (Ed. v.). Biopolymers, v. 6. Polysaccharides. II. **Polysaccharides from Eukaryotes**, Wiley – VCH, Weinheim, p. 381-438, 2002.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J. QI, X. Starch composition, fine structure and architecture: Review. **Journal of Cereal Science**, v. 39, p. 151-165, 2004.

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.

TRICARICO, J.M.; JOHNSTON, J.D.; DAWSON, K.A. et al. The effects of an *Aspergillus oryzae* extract containing alpha-amylase activity on ruminal fermentation and milk production in lactating Holstein cows. **Animal Science**, v.81, p.365, 2005.

TRICARICO, J. M; JOHNSTON, J. D.; DAWSON, K. A. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae* alpha-amylase. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, pp. 136:150, 2008.

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

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.

VALADARES, R. F. D.; BRODERICK, G. A.; VALADARES FILHO, S. C.; CLAYTON, M. K. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2686-2696, 1999.

VAN SOEST, P. J.; MASON, V. C. The influence of Maillard reaction upon the nutritive value of fibrous feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 32, n. 1, p. 45-53, 1991.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2 ed. Cornell University Press, Ithaca, NY, EUA, 1994.

VARGA, G. A.; KOLVER, E. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. **Journal of Nutrition**, v. 127, p. 819s-823s, 1997.

VARGAS-RODRIGUEZ, C. F.; ENGSTROM, M.; AZEM, E.; BRADFORD, B. J. Effects of dietary amylase and sucrose on productivity of cows fed low-starch diets. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 4464-4470, 2014.

VASANTHAN, T.; BAHATTY, R. S. Physicochemical properties of small- and large-granule starches of waxy, regular and high amylose barleys. **Cereal Chemistry**, v. 73, 199-207, 1996.

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 *Furariumproliferatum* in maize grain. **Food Microbiology**, v. 89, p.145–154, 2003.

VENDRAMINI, T.H.A.; TAKIYA, C.S. ; SILVA, T.H. ; ZANFERARI, F. ; RENTAS, M.F. ; BERTONI, J.C. ; CONSENTINI, C.E.C. ; GARDINAL, R. ; ACEDO, T.S. ; RENNO, F.P. . Effects of a blend of essential oils, chitosan or monensin on nutrient intake and digestibility of lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 214,p.12-21, 2016.

VERBIC, J.; CHEN, X. B.; MACLEOD, N. A.; ORSKOV, E. R. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. **Journal of Agricultural Science**, v. 114, p. 243-248, 1990.

VICINI, J. L.; BATEMAN, H. G.; BHAT, M. K.; CLARK, J. H.; ERDMAN, R. A.; PHIPPS, R. H.; VAN AMBURGH, M. E.; HARTNELL, G. F.; HINTZ, R. L.; HARD, D. L. Effect of feeding supplemental fibrolytic enzymes or soluble sugars with malic acid on milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 576-585, 2003.

TAKIYA, C.S; CALOMENI, G.D; SILVA, T.H; VENDRAMINI, T.H; SILVA, G.G.; CONSENTINI, C.E.C; BERTONI, J.C; ZILIO, E.M; RENNO, F.P. Increasing dietary doses of an *Aspergillus oryzae* extract with alpha-amylase activity on nutrient digestibility and ruminal fermentation of lactating dairy cows. **Animal Fedd Science and Technology**, v. 228, p. 159-167, 2017.

TASSOUL M. D., SHAVER R. D. Effect of a mixture of supplemental dietary plantessential oils on performance of periparturient and early lactation dairy cows. **Journalof Dairy Science**. V.92 p. 1734- 1740, 2009.

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

WEISS, W. P.; STEINBERG, W.; ENGSTROM, M. A. Milk production and nutrient digestibility by dairy cows when fed exogenous amylase with coarsely dry corn. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 2492-2499, 2011.

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.

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.