

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Avaliação de óleos essenciais e sua via de fornecimento na
alimentação de bezerros leiteiros**

Flávia Hermelina da Rocha Santos

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

**Piracicaba
2013**

Flávia Hermelina da Rocha Santos
Zootecnista

**Avaliação de óleos essenciais e sua via de fornecimento na alimentação de
bezerros leiteiros**

Orientador:
Profa. Dra. **CARLA MARIS MACHADO BITTAR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

Piracicaba
2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Santos, Flávia Hermelina da Rocha
Avaliação de óleos essenciais e sua via de fornecimento na alimentação de bezerras
leiteiros / Flávia Hermelina da Rocha Santos. - - Piracicaba, 2013.
89 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.
Bibliografia.

1. Diarreia 2. Desempenho 3. Fermentação ruminal 4. Microrganismos intestinais
I. Título

CDD 636.2085
S237a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Com grande orgulho dedico todo este trabalho e aprendizado a minha família: Jorge, Lourdes, Felipe e Junior, e em especial ao meu querido namorado Douglas.

“Quando o assunto é família, no fundo somos crianças! Não importa o quão velho ficamos, sempre precisamos de um lar para chamar de seu!”

Família...
Todos temos,
Dela viemos
Nela nascemos...
Então crescemos.

Para uns,
a família é só o pai,
para outros, só a mãe,
muitos só têm o avô...
Mas é família:
sinônimo de calor!

Tem família
que é completa,
repleta,
discreta,
seleta,
aberta.

Mas tem família
complicada,
indelicada,
desajustada,
desacertada,
debilitada.

Família é assim:
lá não temos capa
nada nos escapa!

Máscaras, como usar?

Não, não dá pra enganar!
Às vezes queremos fingir,
mas isto é apenas mentir.

Família é lugar
onde convivem os diferentes:
um é risonho, outro tristonho;
um é exibido, outro inibido;
um é calado, outro exagerado;
um é cabeludo, outro testudo;
um é penteado, outro descabelado.

Família é assim:
nunca é possível contentar,
pois onde há diferenças,
haverá desavenças.
como a todos agradar?

Mas entre todos os valores
Cultivados entre nós
Há algo como uma voz
Muito enfática a dizer:
“Cultive a educação,
faça lazer, haja afeição;
dê carinho, tudo aos seus!”
Mas o maior valor
maior até que o amor,
é cultivar a Deus!

Noélio Duarte

À minha família

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Deus, nosso senhor, pela saúde e força diária concedida!

À meu pai tão querido, Jorge Hermelino dos Santos, que sempre, em todas as situações esteve do meu lado, me guiando, me confortando com palavras sábias e de muito amor! Amo o senhor!

À minha querida mãe, Maria de Lourdes, que nunca deixou de rezar por mim, e que sempre me ajudou nos momentos de angústias e tristezas! Amo a senhora!

Aos meus irmãos, Felipe e Junior. Agradeço por ser quem são, personalidades tão diferentes, gênios fortes, mas de corações gigantes! Em especial agradeço ao Felipe e Larisse, sua esposa, por me dar de presente a sobrinha mais linda desse mundo, minha princesa Alice! Amo vocês!

À meu namorado Douglas, que sempre, sempre esteve do meu lado! Nunca mediu esforços para ver um sorriso no meu rosto. Agradeço por todo carinho e dedicação, pelas palavras, pelos incentivos, pelos momentos de terapia. Agradeço por todo esse amor que vem de uma forma tão sincera e natural! Amo você!

À minha orientadora Prof^a Dra. Carla Maris Machado Bittar, pela confiança depositada, pelos ensinamentos e por toda a paciência!

À Rafael Canonenco de Araújo (K-neco) e a empresa Grasp, pelo fornecimento do produto testado no experimento do projeto e por todas as ajudas técnicas e orientações no momento da escrita dessa dissertação.

Ao funcionário Carlos César Alves, do laboratório de Bromatologia, pela paciência e dedicação com as análises de alimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela maravilhosa experiência vivida e pelo título de Zootecnista concedido.

À Embrapa Agrobiologia e ao pesquisador Dr. Luis Henrique de Barros Soares, pelos dois anos e meio de trabalho, aprendizado e companheirismo.

Ao meu orientador Edinaldo Bezerra, que foi muito além do que um simples orientador, foi um pai, sempre muito paciente e dedicado com os seus alunos!

Aos amigos construídos na graduação, que mesmo distantes sempre torceram por mim, em especial minha querida Dalila, que sinto muita saudade!

Aos amigos construídos no mestrado, Gabu, Veri, Louise, Amália, Deise, Antônio, Cristiano, Maicon, Paraíba, Carol, Fernanda, Jonas, Max, Greice, Jú, Greg e todos os outros que me fugiram da memória nesse instante!

Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Metabolismo animal, pós-graduandos e graduandos, pela ajuda no campo e análises laboratoriais. Em especial, agradeço imensamente, por três irmãs que ganhei, Marília (Nega da Paçoca), Diandra (Nega do "Suvaco" Cabeludo) e Giovana (Pumba), vocês foram fundamentais na minha trajetória por essa universidade. Agradeço pela grandiosa ajuda no campo, no laboratório, mas principalmente por todo carinho e dedicação na nossa amizade!

Vocês são presentes de Deus na minha vida! Vou sentir muita falta de vocês!

A todos que contribuíram de alguma forma na minha caminhada pela ESALQ, agradeço de coração!

Matar o sonho é matarmo-nos. É mutilar nossa alma. O sonho é o que temos de realmente nosso, de impenetravelmente e inexpugnavelmente nosso.

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Caracterização dos óleos essenciais	21
2.2 Mecanismo de ação dos óleos essenciais	25
2.3 Diarreia em bezerros leiteiros.....	27
2.4 Efeitos dos óleos essenciais sobre a microbiota intestinal	29
2.5 Desenvolvimento ruminal de bezerros leiteiros	32
2.6 Efeitos dos óleos essenciais na fermentação ruminal.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Local, animais e manejo alimentar	39
3.2 Bromatologia das amostras de alimentos.....	40
3.3 Desempenho e desenvolvimento corporal	42
3.4 Escore fecal e sanidade geral	42
3.5 Avaliações da microbiota intestinal	42
3.6 Avaliações do ambiente e microbiota ruminal	43
3.6.1 Determinação de ácidos graxos de cadeia curta.....	43
3.6.2 Determinação de nitrogênio amoniacal (N-NH ₃)	44
3.6.3 Contagem dos microrganismos ruminais	44
3.7 Análises plasmáticas bioquímicas.....	45
3.7.1 Determinação de hematócrito	45
3.7.2 Determinação de glicose	46
3.7.3 Determinação de proteínas totais.....	46
3.7.4 Determinação β-hidroxibutirato	46
3.8 Análise estatística	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 Desempenho e avaliações intestinais	49
4.2 Parâmetros ruminais	62
4.3 Parâmetros sanguíneos	73
5 CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS.....	81

RESUMO

Avaliação de óleos essenciais e sua via de fornecimento na alimentação de bezerros leiteiros

O objetivo do trabalho foi avaliar a utilização de uma mistura comercial de óleos essenciais, fornecidos via concentrado e/ou sucedâneo lácteo, no que se refere ao escore fecal, fermentação ruminal e desempenho geral dos animais. Foram utilizados 30 bezerros da raça Holandês que receberam 6L/d de dieta líquida, composta por sucedâneo lácteo comercial (20PB:15EE), além de livre acesso à água e ao concentrado inicial. O desaleitamento ocorreu na 8ª semana, sendo os animais acompanhados até a 10ª semana de vida. Os animais foram distribuídos em delineamento de blocos casualizados, nos seguintes tratamentos: 1) Controle: sem suplementação com óleos essenciais (C); 2) Suplementação: 400 mg/kg de blend de óleos essenciais no sucedâneo lácteo (S) e 3) Suplementação: 200 mg/kg de blend de óleos essenciais no sucedâneo lácteo e 200 mg/kg no concentrado inicial (SCI). A partir da 2ª semana foram realizadas pesagens e aferições das medidas corporais, bem como avaliação diária de consumo de concentrado e escore fecal. Além disso, foram realizadas semanalmente colheita de sangue para determinação de hematócrito, glicose, β -hidroxibutirato e proteínas totais; fezes, para a contagem de bactérias ácido lácticas e enterobactérias; e fluido ruminal, para determinação do pH, ácidos graxos de cadeia curta, nitrogênio amoniacal e contagem de bactérias amilolíticas, celulolíticas e protozoários. As medidas de desempenho, escore fecal e microrganismos intestinais não foram afetadas pela suplementação com blend de óleos essenciais ($P>0,05$). Os parâmetros ruminais e sanguíneos também não foram alterados pela suplementação de óleos essenciais ($P>0,05$), a exceção da concentração ruminal de N-amoniacal, com maiores valores para animais suplementados via sucedâneo e concentrado inicial ($P<0,05$). A maior parte dos parâmetros avaliados foi afetada pela idade dos animais, em resposta aos aumentos no consumo de concentrado inicial observados com o passar do tempo. A análise de contrastes não revelou efeito da via de fornecimento dos óleos essenciais nos parâmetros avaliados ($P>0,05$), a não ser pelos ganhos semanais de altura na cernelha, sendo estes superiores para animais suplementados via sucedâneo ($P<0,05$). Os óleos essenciais apresentam-se como promissores substitutos dos antibióticos promotores de crescimento. No entanto, a dose de óleos essenciais e as vias de fornecimentos merecem maiores estudos, de forma a se obter benefícios em saúde e desempenho animal.

Palavras-chave: Diarreia; Desempenho; Fermentação ruminal; Microrganismos intestinais

ABSTRACT

Evaluation of essential oils and their route of administration for feeding dairy calves

The objective of this study was to evaluate the use of a commercial blend of essential oils, supplied via starter concentrate and/or milk replacer with regard to fecal scores, rumen fermentation and overall performance of the animals. Thirty Holstein calves were utilized and received 6L/d of liquid diet, consisting of commercial milk replacer (20CP:15EE), and had free access to water and starter concentrate. Weaning occurred at week 8, and the animals were followed until the 10th week of age. Animals were distributed in a randomized block design, in the following treatments: 1) Control: without supplementation with essential oils (C), 2) Supplementation: 400 mg/kg of blend of essential oils in milk replacer (M) and 3) Supplementation: 200 mg/kg of blend of essential oils in the milk replacer and 200 mg/kg in the starter concentrate (MRC). From the second week, calves were weighted and body measurements were taken, while concentrate intake and fecal scores were monitored daily. Furthermore, blood samples were drawn weekly for determination of hematocrit, glucose, β -hydroxybutyrate and total proteins; as well as feces, for counting lactic acid bacteria and enterobacteria; and ruminal fluid for determination of pH, short chain fatty acids, ammonia-N and counts of amylolytic and cellulolytic, and protozoa. Performance, fecal scores and intestines microorganisms were not affected by the essential oils supplementation ($P>0.05$). Ruminal and blood parameters were also not affected ($P>0.05$), exception made for the rumen ammonia-N concentration, with higher values for animals supplemented through milk-replacer and starter concentrate ($P<0.05$). Most of the evaluated parameters were affected by age of animals, mainly as a response to the increase on concentrate intake as animal aged. Contrast analysis did not reveal a route of administration of essential oils effect ($P>0.05$), except for the wither's height gains, being those higher for animals supplemented via milk-replacer ($P<0.05$). Essential oils are promising substitutes for antibiotic growth promoters. However, the dose and routes of administration deserve further studies, allowing a better animal performance and health to be achieved.

Keywords: Diarrhea; Performance; Ruminal fermentation; Intestinal microorganisms

1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos são frequentemente utilizados na nutrição de ruminantes com o objetivo de manipular a fermentação ruminal, além de minimizar o crescimento de microrganismos que reconhecidamente possuem a capacidade de reduzir o desempenho e aumentar as taxas de morbidade e mortalidade, como os causadores de diarreia em bezerros.

Em uma liminar proposta na União Europeia (200), a utilização de diversos aditivos foi proibida. As causas dessa suspensão foram a alegação do desenvolvimento de resistência de cepas bacterianas e a segurança alimentar, no que diz respeito a resíduos nos produtos de origem animal (OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION - OJEU, 2003).

Por outro lado, são necessárias alternativas para que a produção animal seja otimizada, mantendo-se bem-estar animal e minimizando-se riscos ambientais e de segurança alimentar. De acordo com Franz et al. (2009), aditivos alimentares são definidos pelo Regulamento CE 1831/2003, como substâncias ou preparações que são intencionalmente adicionadas à ração ou água, com as seguintes propriedades: afetam as características dos produtos de origem animal em relação à carga microbiana, vida útil ou sabor; afetam as consequências ambientais da produção animal, especialmente em grande escala, por redução de amônia e de produção de metano; influenciam favoravelmente a produção animal, desempenho e bem-estar, afetando a flora gastrointestinal e a digestibilidade dos alimentos.

Diante desses impasses, a comunidade científica busca novos compostos que possam ser utilizados com a mesma finalidade dos antibióticos, mas que preservem a saúde humana, sem geração de microrganismos resistentes e sem resíduos nos produtos de origem animal.

Os metabólitos secundários (MS) das plantas se apresentam como alternativas para modular a fermentação ruminal e controlar microrganismos intestinais. Estes compostos são considerados *GRAS* (Generally Recognized as Safe) segundo o FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2004), por serem seguros ao consumo humano. Os produtos considerados como “naturais” e que, portanto, não apresentam risco de desenvolvimento de resistência dos microrganismos, são os probióticos, prebióticos, ácidos orgânicos e compostos do metabolismo secundário das plantas.

Os MS das plantas são substâncias que não apresentam função relacionada aos processos bioquímicos primários dos vegetais. Seus principais exemplos são os óleos essenciais (OE), as saponinas e os taninos. A função destes compostos nas plantas está normalmente relacionada à proteção contra predadores (insetos e animais herbívoros), microrganismos patogênicos e outros eventuais invasores (ARAUJO, 2010). Os óleos essenciais são responsáveis pelo odor e cor das plantas, sendo obtidos por vaporização ou destilação em água (COSTA; FREITAS; SILVA, 2010). Estes compostos têm importantes funções ecológicas como mensageiros químicos entre a planta e seu ambiente, e frequentemente apresentam atividade antimicrobiana contra uma gama de bactérias (gram-negativas e gram-positivas), leveduras e bolores.

Em estudos realizados por Mathlouthi et al. (2011), plantas da família *Labiatae*, mais especificamente, o alecrim e o orégano são caracterizados como potenciais antimicrobianos de bactérias patogênicas. O óleo essencial de alecrim possui atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Listeria innocua*; enquanto o óleo essencial de orégano tem maior espectro de ação contra microrganismos como *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*.

Na criação de suínos, os óleos essenciais são reconhecidos pelos seus efeitos benéficos como antimicrobianos, principalmente após o desaleitamento. A suplementação com OE em dietas de leitões exerce alta atividade antimicrobiana contra algumas bactérias intestinais, diminuindo a diarreia dos animais e, conseqüentemente, elevando os índices de desempenho. Em alguns casos, os OE aumentam a população das bactérias benéficas do trato intestinal.

O ruminante adulto é outro foco de estudos dos óleos essenciais. O maquinário ruminal é influenciado pelo efeito dos OE de variadas formas e intensidades. A microbiota ruminal, síntese dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), desaminação de aminoácidos, formação de N-NH₃ e diminuição da metanogênese são parâmetros modificados pela presença dos OE na dieta. Em revisão, Patra (2011) relatou que a produção de AGCC é modificada, especialmente quando a concentração de OE na dieta é alta. A colonização e a digestão dos substratos, inclusive da fibra, por bactérias amilolíticas e proteolíticas podem ser suprimidas na presença dos óleos essenciais (WALLACE et al., 2002). Um aspecto importante é que a dose de OE utilizada é o fator determinante para os efeitos causados na fermentação e microbiota ruminal.

Na criação de bezerras, os óleos essenciais podem resultar em benefícios como a redução na ocorrência e duração das diarreias, aumentando o desempenho animal e diminuindo as taxas de mortalidade. No entanto, podem também resultar em efeitos no desenvolvimento do rúmen devido ao seu efeito sobre população de microorganismos ruminais e consequente alteração no perfil de fermentação.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a utilização de uma mistura comercial de óleos essenciais (Activio, Grasp), fornecidos via sucedâneo ou concentrado, no que se refere a melhorias no escore fecal e no desempenho geral dos animais, assim como os efeitos desses óleos na população microbiana e fermentação ruminal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Caracterização dos óleos essenciais

Estima-se que existam mais de 100 mil compostos de origem natural, sendo que ≥ 80 mil são derivados de plantas (ACAMOVIC; BROOKER, 2005). As plantas produzem uma enorme variedade de compostos orgânicos derivados dos metabólitos ou compostos secundários que parecem não ter nenhuma função direta no seu crescimento e desenvolvimento.

A biossíntese de MS ocorre em âmbito celular específico em quase todas as espécies de plantas superiores (Figura 1). Na maioria dos casos, os caminhos ou as vias de síntese são fortemente reguladas por aspectos ambientais ou de sazonalidade (ACAMOVIC; BROOKER, 2005).

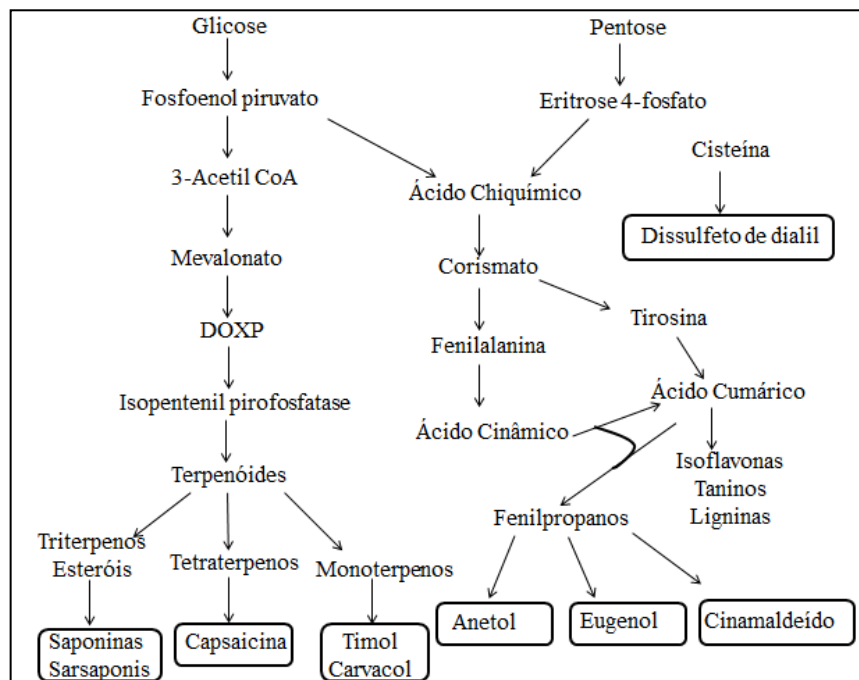


Figura 1 - Vias metabólicas de biossíntese e extração de metabólitos ativos das plantas (Adaptado CALSAMIGLIA et al., 2007)

Os MS são frequentemente detectados em toda a planta, sendo que o seu local inicial de produção muitas vezes é restrito a um único órgão, como raiz, fruto ou folhas. Em seguida, os mesmos são translocados na planta através do floema ou xilema, por transporte simplástico ou apoplástico e armazenados em diferentes tecidos (ACAMOVIC; BROOKER, 2005).

Os óleos essenciais são compostos voláteis, naturais e complexos, formados por compostos aromáticos e caracterizados por um odor forte, (BAKKALI et al., 2008). Na natureza, os OE exercem importante função na proteção das plantas contra bactérias, vírus, fungos e insetos. Além disso, podem atrair tipos de insetos para a dispersão de pólen e sementes, ou afastar outros indesejáveis.

A composição química dos óleos essenciais varia de acordo com o clima, estação do ano, condições geográficas, propriedades genéticas, período de colheita e da técnica de destilação (KNAAK; FIUZA, 2010). Segundo Bakkali et al. (2008), são conhecidos aproximadamente 3.000 óleos essenciais, sendo 300 comercialmente importantes, especialmente para as indústrias farmacêuticas, de alimentos, de produtos sanitários, cosméticos e perfumaria.

Os óleos essenciais podem conter cerca de 20-60 componentes de diferentes concentrações. No entanto, são caracterizados por dois grandes componentes de concentrações elevadas (20-70% terpeno ou terpenóides), em comparação com outros componentes presentes em quantidades vestigiais (BAKKALI et al., 2008).

Os terpenóides (fórmula geral $C_{5H_{8n}}$) são sintetizados a partir de unidades de acetato, e como tal, compartilham suas origens nos ácidos graxos. Entretanto, diferem dos ácidos graxos no conteúdo de ramificação e estruturas cíclicas (DORMAN; DEANS, 2000). Quimicamente os OE são misturas variáveis de terpenos, principalmente monoterpenos (C_{10}) e sesquiterpenos (C_{15}), apesar de diterpenos (C_{20}) também estarem presentes (Figura 2). Além disso, são também compostos de uma variedade de hidrocarbonetos alifáticos de baixo peso molecular, ácidos, alcoóis, aldeídos, ésteres acíclicos ou lactonas, excepcionalmente, compostos contendo nitrogênio (N) e enxofre (S), cumarinas e homólogos de fenilpropanóides (DORMAN; DEANS, 2000).

Os óleos essenciais podem ser extraídos de várias partes da planta, como folhas, flores, caules, sementes, raízes e cascas. A composição e a concentração dos óleos essenciais (Tabela 1) variam de acordo com localização na planta (DORMAN; DEANS, 2000). Estes compostos podem ser extraídos por solvente (GREATHEAD, 2003), dióxido de carbono líquido ou microondas e, principalmente, em destilação por baixa ou alta pressão com água fervente ou vapor (BAKKALI et al., 2008). A extração por meio de dióxido de carbono líquido em baixa temperatura e alta pressão gera um perfil organoléptico mais natural, no entanto é dispendiosa. A diferença no perfil organoléptico indica uma diferença na composição dos óleos

extraídos, o que pode também influenciar as propriedades antimicrobianas (BURT, 2004).

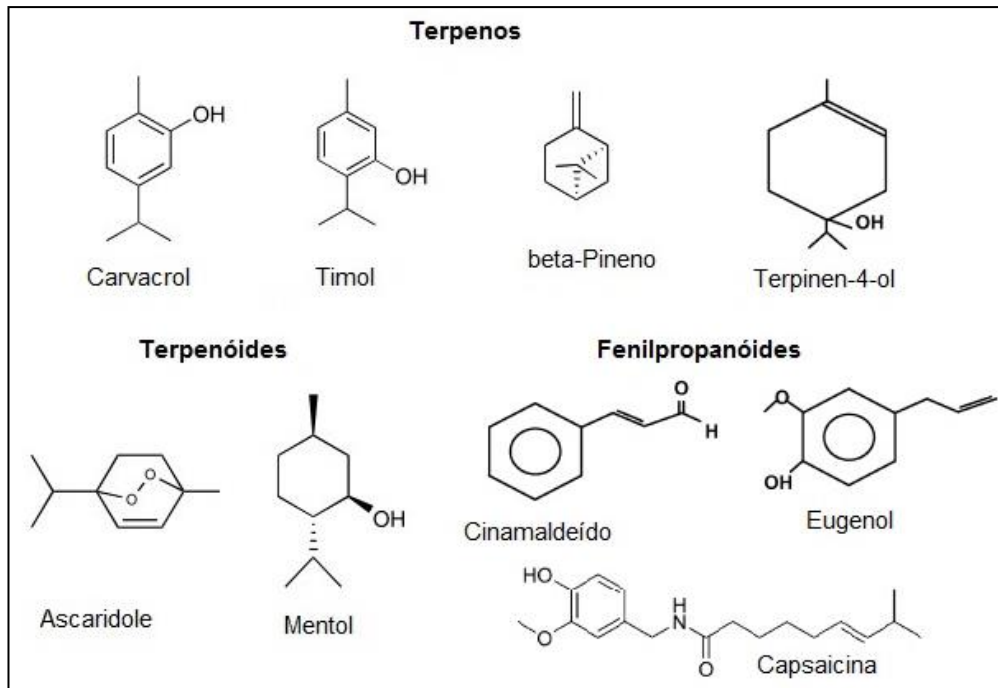


Figura 2 - Estrutura dos principais componentes químicos dos metabólitos secundários das plantas (Adaptado de BAKKALI et al., 2008)

A escolha do tipo de extração a ser utilizada dependerá da finalidade da utilização (fármacos, perfume, antifúngico, etc). A composição química dos produtos varia no número de moléculas e estereoquímica, dependendo do tipo de extração que foi utilizada. Além disso, o produto de extração pode variar em termos de qualidade, quantidade e composição de acordo com o clima, composição do solo, órgão da planta, idade e fase vegetativa (MASOTTI et al., 2003; ANGIONI et al., 2006). Portanto, para a obtenção de óleos essenciais de composição constante, os mesmos devem ser extraídos sob as mesmas condições, a partir do mesmo órgão da planta que tenha crescido no mesmo solo, sob o mesmo clima, tendo sido colhidos na mesma época (BAKKALI et al., 2008).

Os compostos fenólicos são os principais responsáveis pelo efeito antimicrobiano dos óleos essenciais. Os terpenóides, um dos principais composto fenólicos dos OE, podem ser mais eficientes no efeito antimicrobiano, do que compostos químicos purificados, pois eles são uma mistura complexa de vários componentes (ACAMOVIC; BROOKER, 2005). Essa complexidade permite que os OE interajam com múltiplos alvos moleculares, potencializando o efeito celular.

Tabela 1 - Componentes dos principais óleos essenciais que apresentam propriedades antimicrobianas [Adaptado de Burt (2004) e Bakkali et al. (2008)]

Nome comum	Nome científico	Principais componentes
Coentro	<i>Coriandrum sativum</i>	Linalol, E-2-decanol
Cânfora	<i>Cinnamomum camphora</i>	1,8-cineol
Canela	<i>Cinnamomum zeylandicum</i>	Trans-cinamaldeído
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol, timol, γ -terpineno, p-cimene
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i>	α -Pineno, acetato bornilo, cânfora, 1,8-cineol
Sálvia	<i>Salvia officinalis L.</i>	Cânfora, α -Pinene, β -pinene, 1,8-cineol, α -tujone
Dente de alho	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol, acetato de eugenol
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i>	Timol, carvacrol, γ -terpineno, p-cimene
Hortelã pimenta	<i>Mentha piperita</i>	Mentol, mentona

Os primeiros registros de uso de plantas na medicina tradicional foram na região da Mesopotâmia cerca de 2600 AC (GREATHEAD, 2003). Esse tipo de recurso foi utilizado até o momento em que os medicamentos sintéticos dominaram a medicina, já no início do século XX. Atualmente, a resistência de algumas cepas bacterianas fez resurgir o interesse dos pesquisadores por estes compostos naturais. Vários mecanismos de ação têm sido sugeridos para explicar a sua atividade antimicrobiana, incluindo a inibição da síntese de RNA, DNA, proteínas da célula, mas principalmente a interação com a membrana celular e consequentemente a desestabilização da célula (CALSAMIGLIA et al., 2007).

Os efeitos mais importantes destes compostos se referem a sua ação como antissépticos, antifúngicos (SOYLU et al., 2007) e antimicrobianos (TROUILLAS et al., 2003). As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais já foram demonstradas contra uma vasta gama de microrganismos, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas, protozoários e fungos (BENCHAAR et al., 2007).

A capsaicina, terpenóide componente das pimentas, possui ampla atividade antimicrobiana, e além de ser utilizada como analgésico na medicina humana é também um potente antifúngico. Embora possivelmente prejudicial para o sistema gástrico humano, a capsaicina é bactericida para *Helicobacter pylori*, responsável por ulcerações e gastrites (COWAN, 1999).

Os óleos essenciais também foram associados com atividade antimicrobiana em produtos cárneos, peixes, frutas e vegetais. O eugenol e o timol, óleo essencial de coentro e do orégano, respectivamente, inibem o crescimento de bactérias causadoras da deterioração da carne, como *Listeria monocytogenes* e *Aeromonas hydrophila* (COWAN, 1999).

O efeito antimicrobiano dos óleos essenciais se estende para os microrganismos ruminais e modulação da fermentação. Calsamiglia et al. (2007), afirmaram em revisão que a adição de timol (óleo essencial de tomilho e orégano) no fluido ruminal *in vitro* resulta na acumulação de aminoácidos e redução da concentração de N amoniacal, sugerindo que o timol inibe a desaminação. O timol foi estudado por Evans e Martin (2000) e o principal resultado encontrado foi a influência que o mesmo exerce sobre o metabolismo energético de *Streptococcus bovis* e *Selenomonas ruminantium*, duas bactérias importantes no ambiente ruminal. Além disso, a redução da produção de metano também está associada com a ação dos óleos essenciais (CALSAMIGLIA et al., 2007).

O desempenho e a flora intestinal de bezerros também são afetados de forma positiva pela ação antimicrobiana dos óleos essenciais. Em estudos realizados por Spanghero et al. (2007), os microrganismos patogênicos intestinais tiveram crescimento reduzido, quando os OE foram ministrados, o que, conseqüentemente, melhorou o desempenho geral dos animais.

2.2 Mecanismo de ação dos óleos essenciais

Na maioria dos casos, os óleos essenciais compreendem um grande número de componentes. Portanto, é provável que a sua atividade antimicrobiana não esteja envolvida com um mecanismo de ação específico, mas sim envolvendo vários alvos na célula bacteriana (BENCHAAR; MCALLISTER; CHOUINARD, 2008). A ideia inicial, e a mais aceita, é que os óleos essenciais desenvolvam a sua ação contra as bactérias através da interação com a membrana celular (GRIFFIN et al., 1999;

ULTEE; KETS; SMID, 1999; DORMAN; DEANS, 2000), incluindo transporte de elétrons, gradientes de íons, translocação de proteína, fosforilação e outras reações dependentes de enzimas.

Pelo menos uma parte da atividade presente se deve à natureza hidrofóbica dos hidrocarbonetos cíclicos, o que permite que estes interajam com as membranas celulares e acumulem-se na bicamada lipídica de bactérias, ocupando um espaço entre as camadas. Esta interação provoca alterações conformacionais na membrana estrutural, resultando na sua fluidificação e expansão (GRIFFIN et al., 1999). A perda da estabilidade da membrana resulta na fuga de íons, o que reduz o gradiente iônico transmembranar (Figura 3). Na maioria dos casos, as bactérias podem contrabalancear esses efeitos por meio de bombas iônicas, prevenindo morte celular. No entanto, grandes quantidades de energia são desviadas para esta função e o crescimento bacteriano é diminuído (GRIFFIN et al., 1999; ULTEE; KETS; SMID, 1999; COX; MANN; MARKHAM, 2001).

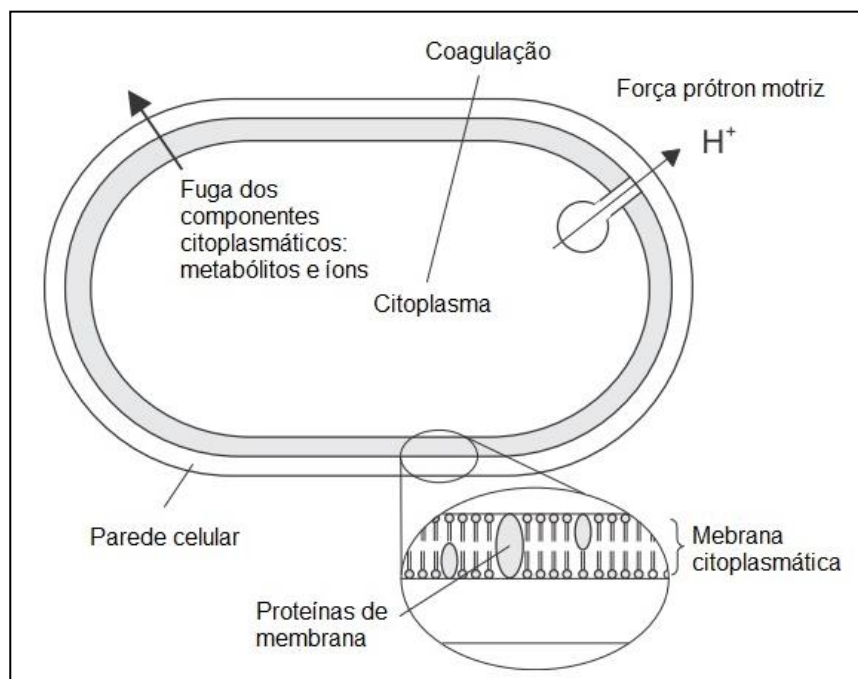


Figura 3 - Sítios e modo de ação dos componentes dos óleos essenciais na membrana celular (Adaptado de BURT, 2004)

Em geral, a atividade antimicrobiana é mais elevada em hidrocarbonetos cíclicos, e particularmente em estruturas fenólicas tais como timol e carvacrol. Nesse caso, o grupamento hidroxila e o deslocamento de elétrons permitem a interação com a água através de pontes de hidrogênio, tornando-se ativo contra microorganismos. Ultee, Bennik e Moezelaar (2002) propuseram um mecanismo

alternativo, no qual o grupo hidroxila do fenol atua como um transportador transmembranar de cátions monovalentes e de prótons, tais como os ionóforos (Figura 4). Os autores observaram ainda que esta hipótese era verdadeira somente para o grupo hidroxila de compostos aromáticos, porque compostos tais como o mentol (exatamente igual ao carvacrol, mas não aromático) não resultaram nos mesmos efeitos inibidores. Isto é provavelmente devido à presença de um sistema de deslocamento de elétrons e da elevada acidez dos fenóis e, conseqüentemente, a capacidade do grupo hidroxila de libertar o seu próton.

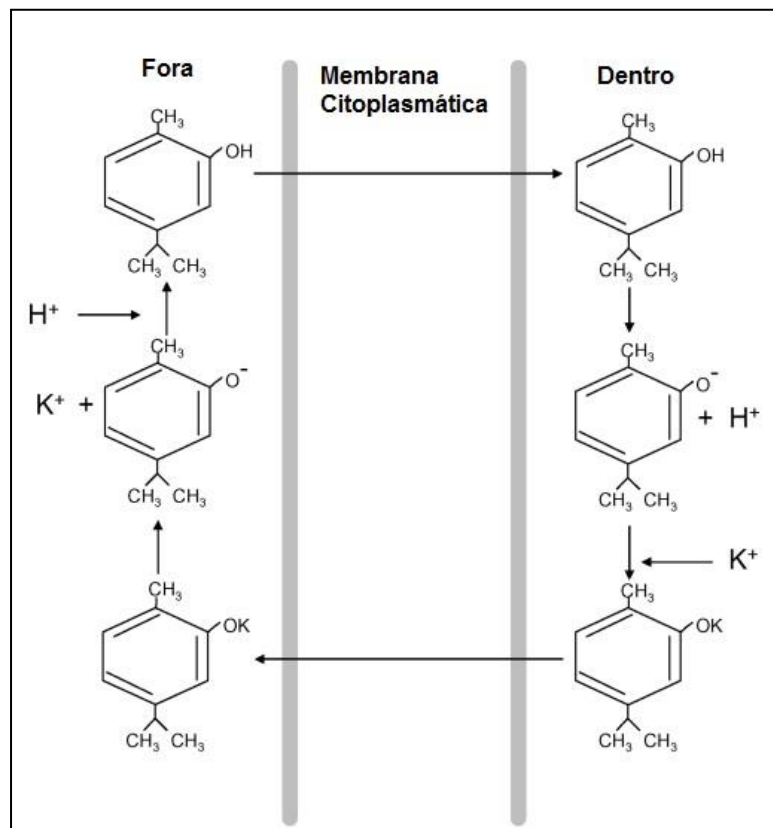


Figura 4 - Mecanismo hipotético da ação do carvacrol na membrana citoplasmática (ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002)

2.3 Diarreia em bezerros leiteiros

A diarreia é a principal doença que afeta os bezerros nas primeiras semanas de vida e sendo sua ocorrência comum dias após o nascimento do animal. A severidade da diarreia varia de acordo com a capacidade do animal em superar essa adversidade. Portanto, animais que não foram corretamente colostrados, com

imunidade baixa causada por outra doença ou sobre estresse (ambiental ou comportamental), tendem a sofrer mais com a diarreia, o que pode levá-los à morte.

Em estudos prospectivos, Curtis et al. (1988) constataram que a diarreia que ocorre dentro dos primeiros 14 dias de idade de bezerros leiteiros é um fator de risco para doenças respiratórias. Os autores ainda verificaram que bezerros acometidos por diarreia têm maior chance de morrer dos 15 aos 90 dias de idade.

A diarreia em bezerros pode ser relacionada com a imunidade neonatal, tamanho do rebanho, nutrição, instalação e época do ano (FRANK; KANEENE, 1992). Em países tropicais, como o Brasil, a época ou estação do ano exerce grande influência sobre o desempenho de bezerros leiteiros, bem como na resistência a diarreia. No verão, os animais acometidos por diarreias passam por desidratação severa, perdendo muito líquido corporal e importantes eletrólitos. Assim, se os animais não forem medicados e a desidratação corrigida a tempo, os animais podem morrer.

A massa fecal sólida é formada por absorção de água a partir do conteúdo líquido intestinal pelas células que revestem o intestino grosso. A diarreia ocorre quando a capacidade do intestino em absorver o fluido é prejudicada. A interferência absorptiva do intestino pode ocorrer de duas maneiras: (1) danos às células que revestem o intestino, devido a ação de agentes infecciosos, causando perda da capacidade de absorção do intestino, bem como inflamações; (2) agentes infecciosos produzem toxinas que estimulam as células de revestimento do intestino a perderem mais fluido ao invés de absorver (BICKNELL; NOON, 1993). A desidratação e perda de eletrólitos ocorre em ambos os casos e tem efeitos gravíssimos em animais recém-nascidos.

O bezerro acometido por diarreia pode apresentar fezes amareladas, acinzentadas ou esverdeadas, contendo muco e também coágulos de sangue. A desidratação ocorre devido a perda de água pelas fezes. O animal também apresenta olhos fundos, pele seca e fraqueza. A temperatura corporal pode variar, podendo ou não apresentar febre, de acordo com a causa do distúrbio. Se a doença não for tratada, o progresso da infecção leva a perda de eletrólitos, como sódio, potássio e bicarbonato.

A diarreia pode ser causada por um agente infeccioso único, mas também por uma combinação de agentes. Os principais agentes infecciosos causadores da diarreia são as bactérias (*Escherichia coli* e *Salmonella*), os vírus (Coronavírus e

Rotavírus) e os protozoários (*Cryptosporidium* e *Eimeria*) (DAVIS; DRACKLEY, 1998). O intestino dos bezerros é um reservatório de *Escherichia coli*, mas as cepas só passam a exercer sua forma patogênica quando se reproduzem de forma anormal ou por transferência de plasmídeos que conferem a patogenicidade (BICKNELL; NOON, 1993).

A diarreia causada por *Escherichia coli* é chamada de colibacilose. Existem diversas espécies de *Escherichia coli*, no entanto as cepas patogênicas geralmente são as hemolíticas (*Escherichia coli* O157:H7; *Escherichia coli* STEC) (MAGALHÃES et al., 1991).

As colibaciloses podem ser classificadas em enterotóxicas, enterotoxêmicas, invasoras locais e septicêmicas. As septicêmicas são de extrema importância para a criação de bezerros, já que a sua ocorrência nesses animais é alta. Sua infecção é caracterizada pela invasão via umbilical, respiratória e digestiva, onde as bactérias produzem toxinas responsáveis pelas lesões, como artrites, infecção urinária e inflamação de serosas (MAGALHÃES et al., 1991).

A salmonelose é outra importante doença causada por enterobactérias, nesse caso a *Salmonella*. Os principais sintomas são diarreia, febre, baixo apetite, prostração, desidratação e, frequentemente, inchaço nas articulações. Diferentemente da colibacilose, a salmonelose é mais severa em bezerros com mais de um mês de idade (MAGALHÃES et al., 1991).

Vírus e protozoários também podem causar diarreia em bezerros leiteiros. Rotavírus e coronavírus atingem os bezerros logo nos primeiros dias de vida causando desidratação severa e danos nas células intestinais (JEREZ et al., 2002). Causas não infecciosas como dieta inadequada, práticas alimentares erradas e má qualidade do substituto do leite também são fatores responsáveis por diarreia (OWEN et al, 1958).

2.4 Efeitos dos óleos essenciais sobre a microbiota intestinal

As fêmeas de reposição representam um investimento na produtividade e na rentabilidade das explorações leiteiras. Especial atenção deve ser dada para proteger estes animais jovens de doenças intestinais e respiratórias de forma a garantir o seu bom desenvolvimento, maximizando seu potencial de produção futura.

O relatório de 2011 (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2011) revelou que 89% dos animais jovens são alimentados com sucedâneo lácteo com algum tipo de antibiótico. O relatório adverte para a utilização maciça de antibióticos na alimentação animal e a futura resistência de cepas bacterianas.

Em outro estudo realizado nos Estados Unidos verificou-se que 71% dos substitutos do leite utilizados contém alguma medicação (HEINRICHS; JONES; HEINRICHS, 2003). Uma prática comum em fazendas leiteiras é fornecer o substituto do leite para recém-nascidos juntamente com um antibiótico para prevenir diarreias e melhorar o desempenho geral. No entanto, o uso de antibióticos tem sido cada vez mais evitado, o que tem resultado na busca por aditivos alternativos mais seguros.

Os óleos essenciais possuem efeito antimicrobiano no trato intestinal de bezerros, e já foram encontradas variadas respostas frente a suplementação, devido principalmente as diferentes doses e vias de fornecimento. Dentre os efeitos podemos citar melhora da digestão e do equilíbrio da eficiência alimentar, manutenção da microflora, inibição de patógenos e prevenção de diarreia. No entanto, efeitos negativos também já foram relatados, como redução da atividade enzimática e alteração da anatomia da parede intestinal (DURMIC; BLACHE, 2012).

A diarreia, principal doença que acomete bezerros, é também responsável por baixos índices de desempenho animal. Assim, a redução de microrganismos patogênicos intestinais melhora a qualidade de vida do animal, aumentando seu desempenho. Hill et al. (2007) realizaram estudos com uma mistura de extratos vegetais (50 mg/kg) e observaram aumento no consumo de concentrado inicial e melhor eficiência de conversão para bezerros leiteiros. Greathead et al. (2000) também encontraram efeitos positivos com a utilização de óleos essenciais para bezerros. Os animais que receberam os OE tiveram significativo aumento no ganho de peso diário em comparação aos animais controle, no entanto, a conversão alimentar foi menor para os animais tratados. Nesse mesmo estudo, o escore fecal foi avaliado e não houve efeito do fornecimento de OE.

Estudos realizados por Bampidis et al. (2006) revelaram a eficiência na utilização de OE de orégano comparada aos antibióticos comumente utilizados em casos de diarreia em bezerros. O óleo de orégano é responsável por diminuir vários agentes patológicos, inclusive a *Escherichia coli*, uma das principais bactérias causadoras da diarreia em animais jovens, resultando em escores fecais muito

semelhantes a bezerros tratados com neomicina (BAMPIDIS et al., 2006). O orégano é capaz de inibir completamente o crescimento *in vitro* de *Escherichia coli*, sugerindo-se que também possa suprimir o crescimento desses microorganismos no intestino dos animais (MARIANO; BERSANI; COMI, 2001).

Um experimento conduzido na unidade de pesquisa de bezerros e novilhas da Universidade de Minnesota (EUA) avaliou o impacto de sucedâneo de leite, suplementado com um produto fitogênico (Biomin ®PEP) no desempenho de bezerras e novilhas da raça Holandesa (CHESTER-JONES et al., 2010). Os animais tratados com o produto fitogênico (880 mg/kg no sucedâneo lácteo (sem monensina) ou 410 mg/kg no concentrado inicial (com monensina no sucedâneo lácteo)) foram comparados com animais tratados apenas com monensina e com animais controle (sem suplementação). Observou-se aumento do ganho de peso e maior consumo de ração para os animais tratados somente com produto fitogênico, confirmando a premissa de que alguns compostos extraídos das plantas (fitogênicos) atuam no aumento da produção de saliva e muco, bem como enzimas digestivas, o que maximiza a digestão de alimentos para a absorção dos nutrientes. Os distúrbios intestinais foram reduzidos para os animais tratados com o suplemento fitogênico.

A flora intestinal dos suínos é muito semelhante a dos bezerros e por isso os estudos com os leitões são passíveis de comparação com os realizados com bezerros. Castillo et al. (2006) observou diferença na relação de lactobacilos: enterobactérias presentes no ceco de leitões suplementados com extrato de plantas. Os animais que receberam a mistura de óleos essenciais (30 mg/kg no concentrado) tiveram essa relação mais elevada, quando comparados com animais que receberam a dieta controle. Esse mesmo efeito foi encontrado no jejuno de leitões desmamados, suplementados com o mesmo extrato de plantas, porém para dose aplicada de 150 e 300 mg/kg (MANZANILLA et al., 2004).

Em outros estudos com leitões avaliando o desempenho, os óleos essenciais (300mg/kg no concentrado) provocaram efeitos positivos no ganho de peso, conversão alimentar e digestibilidade. A utilização de aditivos fitogênicos a base de óleo de hortelã, erva-doce, cravo da índia e canela melhorou a conversão alimentar durante as primeiras seis semanas após o desaleitamento (MAENNER; VAHJEN; SIMON, 2011). Os autores não atribuem esse efeito benéfico à modificações na ingestão ou microbiota intestinal, mas sim por maior digestibilidade dos aminoácidos e também maior quantidade de proteína ileal.

A flora intestinal dos bezerros responde de forma diferente aos aditivos utilizados, devido a variedade microbiana existente. No entanto, de forma geral, os estudos realizados até o momento apontam na mesma direção, ou seja, a inibição dos principais e patogênicos microrganismos intestinais.

2.5 Desenvolvimento ruminal de bezerros leiteiros

A capacidade do ruminante jovem em se sustentar nutricionalmente é dependente do desenvolvimento do rúmen, o qual está associado com o estabelecimento da população microbiana. O crescimento das papilas ruminais ocorre em resposta a presença de AGCC, produzidos por estes microrganismos através da fermentação dos alimentos. Ao nascimento, as papilas apresentam altura inferior a 1 mm, mas crescem rapidamente com a introdução da alimentação sólida e atingem seu comprimento máximo de 5 a 7 mm em oito semanas (HUBER, 1969). O ácido butírico e, em menor extensão, o ácido propiônico, são os principais AGCC responsáveis pelo desenvolvimento do epitélio ruminal (TAMATE et al., 1962).

O desenvolvimento microbiano do rúmen é dependente do tipo de alimento oferecido ao bezerro. Dietas ricas em grãos ou ricas em forragem estimulam o crescimento de diferentes microrganismos ruminais, o que resulta em diferentes proporções molares de AGCC. Além disso, quando o aleitamento é prolongado o crescimento normal da microflora ruminal é retardado, principalmente devido ao menor consumo de alimento sólido como os concentrados. Estudos apontam que entre a 1^a-3^a semanas de vida, o rúmen de bezerros é colonizado por bactérias celulolíticas e fermentadoras de lactato (DAVIS; DRACKLEY, 1998). Segundo Eadie; Hobson e Mann (1959) observações microscópicas sugeriram que o número de protozoários no fluido ruminal de bezerros foi inversamente proporcional ao número de lactobacilos, e isso foi diretamente relacionado a maior proporção de concentrado na dieta.

Em estudos realizados por Beharka et al. (1998), avaliou-se o desenvolvimento microbiano do rúmen de bezerros leiteiros em função da forma física do concentrado (inteiro x moído), com composição nutricional idêntica. A forma física da dieta não afetou o número de bactérias anaeróbicas totais. No entanto, os bezerros que consumiram ração moída apresentaram contagens de bactérias anaeróbicas numericamente superiores. Os bezerros que consumiram

rações moídas apresentaram menor ($P < 0,1$) contagem de bactérias celulolíticas, em contrapartida a contagem de amilolíticas foi maior ($P < 0,1$).

Anderson et al. (1987) realizaram estudo comparando o desaleitamento precoce de bezerros leiteros (6ª semana) com o desaleitamento convencional (8ª semana), forçando os animais do grupo precoce a intensificar o consumo de concentrado antecipadamente. Nesse estudo, um dos parâmetros avaliados foi o desenvolvimento da microflora ruminal. A contagem viável de bactérias anaeróbicas bem como a contagem de *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus* não foi afetada pelo manejo para o desaleitamento. No entanto, na 6ª semana dos animais do desaleitamento precoce, o número de lactobacilos e bactérias amilolíticas foi maior ($P < 0,1$). As bactérias celulolíticas, diferentemente das demais, estavam presentes no fluido ruminal a partir do terceiro dia de idade dos bezerros. Os autores concluíram que as populações bacterianas adequadas estão presentes muito cedo no rúmen dos bezerros, e que o fornecimento de alimento sólido estimula ainda mais o crescimento desses microrganismos.

A introdução de forragem durante o período de aleitamento é conflitante entre a comunidade científica, devido ao fato de substituir o consumo de concentrado em alguns animais e, portanto, atrasar o desenvolvimento ruminal. O desenvolvimento da microflora ruminal dos bezerros é altamente dependente de alimento sólido, principalmente do concentrado inicial. Se fornecido dias após o nascimento, os primeiros microrganismos já começam a colonizar o rúmen, iniciando a fermentação e a produção dos AGCC, importantes para o alongamento das papilas ruminais.

2.6 Efeitos dos óleos essenciais na fermentação ruminal

Os óleos essenciais de uma variedade de fontes têm sido utilizados para alterar o crescimento bacteriano e metabolismo de vários tipos de bactérias, incluindo as bactérias do rúmen (WALLACE, 2004). Grande parte da pesquisa com os OE na nutrição animal de ruminantes tem focado no potencial dos mesmos em melhorar o aproveitamento do N ruminal e utilização de energia (Tabela 3). Alguns estudos *in vivo* foram realizados para avaliar a eficácia dos óleos essenciais em manipular a fermentação ruminal, melhorar a utilização de nutrientes e desempenho de vacas leiteiras (BENCHAAR et al., 2006).

Tabela 3 - Efeito dos compostos biotivos das plantas no rúmem (Adaptado de DURMIC; BLACHE, 2012)

Benefícios	Limitações
Melhora atividade microbiana	Reduz atividade microbiana
Redução de metano	Reduz utilização da fibra
Melhora digestão da fibra	Atonia ruminal
Aumenta AGCC	
Aumenta propionato	

O carvacrol, um dos terpenos mais estudados no ambiente ruminal, é capaz de dissolver a dupla camada fosfolipídica da membrana celular, alinhando-se entre os ácidos graxos de membrana (ARAÚJO, 2010). Isto promove a formação de canais na membrana, já que os óleos essenciais são capazes de separar os ácidos graxos uns dos outros, alterando a seletividade da membrana bacteriana, podendo resultar nos mesmos efeitos observados com os terpenóides e fenilpropanóides (ARAÚJO, 2010). No contexto do fluxo contínuo no rúmen, uma alteração nas taxas de crescimento bacteriano provoca alterações na proporção da população de bactérias do rúmen, resultando em alterações do perfil de fermentação (DORMAN; DEANS, 2000; COX; MANN; MARKHAM, 2001).

Uma das misturas comercialmente disponível de óleos essenciais (Crina Ruminantes, DMS Nutritional Products, Parsippany, NJ) tem se mostrado promissora em melhorar o metabolismo ruminal. Usando procedimentos *in vitro*, melhores respostas ruminais, tais como a inibição da metanogênese e diminuição de produção de amônia têm sido observadas (CALSAMIGLIA et al., 2007). Alterações na eficiência alimentar também foram detectadas em estudos utilizando óleos essenciais como alternativa aos antibióticos (TASSOUL; SHAVER, 2009). No entanto, a maioria dos dados examinando respostas a óleos essenciais diferem por espécies, tratamento utilizado, dieta e quantidade dos OE (MEYER et al., 2009).

Os trabalhos iniciais de BORCHERS (1965) mostraram que a adição de timol (1g/L) em fluido ruminal contendo caseína resultou em acúmulo de aminoácidos e diminuição na concentração de N amoniacal (N-NH₃), sugerindo a inibição da desaminação de aminoácidos pelas bactérias ruminais. Mais recentemente, vários

estudos têm mostrado que os fatores tais como a composição química e taxa de dosagem dos OE podem influenciar nos efeitos dos mesmos sobre o metabolismo ruminal de nitrogênio e perfil dos AGCC.

Castillejos et al. (2005) realizaram estudos com uma mistura de óleos essenciais comercial (timol, limoneno e guaiacol, na dose de 1,5 mg/L) influenciando na fermentação ruminal, em fermentador de cultura contínua. Diferentemente da maioria dos estudos sobre a modificação que os OE causam nos parâmetros ruminais, os autores obtiveram resultados de aumento da produção dos AGCC totais, sendo que a proporção individual dos ácidos não foi modificada. Posteriormente, os autores realizaram estudo semelhante com doses maiores da mesma mistura dos óleos essenciais (5, 50 e 500 mg/L). A dose de 5 mg/L foi a única capaz de modificar os parâmetros fermentativos. Houve aumento ($P < 0,05$) dos AGCC totais, das proporções do acetato e também da relação acetato: propionato. Já as doses maiores (50 e 500 mg/L) não alteraram nenhuma variável (CASTILLEJOS et al., 2007). Os autores concluíram que o timol, reconhecido como forte modulador da fermentação ruminal, é apenas parte da mistura de OE, e que o aumento de 5 para 500 mg/L da mistura não significa que a concentração de timol tenha aumentado na mesma proporção. Além disso, existe uma diversidade enorme entre as misturas de óleos essenciais, o que dificulta a comparação entre os estudos.

O pH do rúmen é outro parâmetro de extrema importância, em alguns trabalhos verificou-se que o efeito dos OE em fermentadores de cultura contínua variou de acordo o pH do meio. Isso pode inferir uma informação errônea, quando esses dados são comparados ao que realmente ocorre no rúmen do animal. O rúmen tem variações diárias de pH, dependendo do tipo e da frequência de alimentação do animal. Os estudos com fermentadores devem ser bem explanados e cuidadosamente comparados aos experimentos *in vivo*. Cardozo et al. (2004) realizaram estudos com OE de canela em fermentadores de cultura contínua e observaram que os resultados variaram de acordo com o pH do meio. Em pH 7 ocorreu aumento de acetato e propionato, ao passo que em pH 5,5 esses AGCC tiveram sua concentração diminuída.

Newbold et al. (2004) também avaliaram o efeito dos óleos essenciais sobre a fermentação ruminal em pequenos ruminantes. Os animais foram suplementados com 234 mg/kg de uma mistura de OE (timol, limoneno e guaiacol) no concentrado. O

perfil de AGCC não foi alterado ($P < 0,05$) em comparação ao grupo controle, bem como o pH ruminal e concentração de amônia.

Busquet et al. (2006) observaram que a adição de óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) a um fermentador de cultura contínua reduziu cerca de 2,0 mg/L (80%) a concentração de peptídeos grandes, mas não teve efeito sobre a concentração de N-NH₃, sugerindo que o OE de cravo reduziu apenas a quebra de peptídeos grandes realizada pelas bactérias ruminais. A adição da mesma concentração de eugenol, componente principal do cravo-da-índia, não teve efeito sobre o metabolismo do N, o que sugere que a redução de peptídeos grandes causada pelos OE não é devida ao seu componente principal, mas é resultado dos compostos não identificados dentro da fração do óleo.

A microbiota ruminal é outro parâmetro afetado pela suplementação com os óleos essenciais. Giannenas et al. (2011) avaliaram o efeito dos OE sobre o desempenho de ovelhas leiteiras suplementadas com doses de 50, 100 e 150 mg/kg de OE no concentrado. A produção de leite aumentou com a inclusão dos OE na dieta, no entanto o efeito foi independente da dose ministrada. Em contrapartida, os protozoários e os microrganismos celulolíticos não foram influenciados pelos tratamentos. As bactérias hiper produtoras de NH₃ apresentaram contagem viável reduzida para o tratamento de maior dose (150mg/kg) em comparação com o grupo controle.

Em estudo com bois fistulados foi testada a eficiência da capim limão (*Cymbopogon citratus* Stapf.) em modular a fermentação e população microbiana ruminal (WANAPAT et al., 2008). O processamento do capim limão consistiu no corte da planta fresca e moagem (1mm), após a secagem a 60°C por 2 dias. Os animais foram suplementados na dose de 0, 100, 200 e 300 g/d de capim limão, além de palha de arroz tratada com 5% de uréia para todos os tratamentos. O perfil dos AGCC não foram alterados pela suplementação em nenhuma dose do capim limão. A contagem viável de bactérias amilolíticas e celulolíticas foram diferentes entre os tratamentos ($4,7 \times 10^9$; $1,7 \times 10^7$ e $2,0 \times 10^9$ UFC/mL, para 100, 200 e 300g/d respectivamente). No entanto, os protozoários foram reduzidos para todos as doses administradas (WANAPAT et al., 2008).

Os mecanismos de ação dos óleos essenciais sobre a fermentação e microbiota ruminal, bem como as suas consequências no metabolismo do animal ainda não estão bem esclarecidos. Apesar dos OE se apresentarem como

promissores alternativos aos antibióticos, existe pouca informação sobre a dose eficaz a ser usada, sem induzir efeitos tóxicos ou transmitir impurezas indesejáveis à carne ou produtos lácteos (CASTILLEJOS et al., 2005). Questões relacionadas a quantidade e qualidade da dose, bem como a utilização de apenas um extrato vegetal ou uma mistura de extrato estão em crescente discussão.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local, animais e manejo alimentar

O trabalho foi realizado no bezerreiro experimental do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - USP/ESALQ, Piracicaba, SP. Foram utilizados 30 bezerros machos da raça Holandês provenientes de fazenda comercial da região (Agrindus S/A), com idade entre 1 a 5 dias, no período de outubro de 2012 a janeiro de 2013. Após o nascimento, os animais foram separados da mãe, e receberam colostro de acordo com o manejo da fazenda de origem, sendo o fornecimento mínimo de 2L na primeira alimentação e mais 2L na segunda. Após o transporte para a área experimental, os bezerros foram alojados em abrigos individuais, sendo contidos por corrente e coleira.

Os animais receberam 6L de dieta líquida diariamente, divididos em duas refeições (7h e 18h), composta por sucedâneo lácteo (Sprayfo Violeta (20% Proteína Bruta (PB):15% Extrato Etéreo (EE) Sloten do Brasil Ltda., Santos, SP, Brasil). Além disso, os animais tiveram livre acesso à água e ao concentrado inicial, formulado de acordo com as recomendações do National Research Council - NRC (2001), sendo fornecida quantidade máxima por animal de 2 kg/dia.

Os animais foram distribuídos em delineamento de blocos casualizados, nos seguintes tratamentos: 1) Controle: sem suplementação com óleos essenciais (C); 2) Suplementação: 400 mg/kg de blend de óleos essenciais no sucedâneo lácteo (S) e 3) Suplementação: 200 mg/kg de blend de óleos essenciais no sucedâneo lácteo e 200 mg/kg no concentrado inicial (SC).

O blend utilizado é um produto comercial (Activio®, Grasp), o qual é composto por uma combinação de óleos essenciais microencapsulados e um veículo. Carvacrol, cineol, cinamaldeído e óleo resina de pimenta são os componentes da mistura e somam 10% do total do produto. O restante (90%) é composto pelo veículo mananoligossacarídeo (MOS). Para a suplementação via sucedâneo, o blend foi misturado no momento da sua diluição, antes do fornecimento para os animais. No caso da suplementação via concentrado, a mistura foi realizada no momento da mistura dos ingredientes que compuseram o mesmo.

O concentrado farelado foi fornecido toda manhã, *ad libitum* pesando-se a sobra do dia anterior, de forma a se obter o consumo diário de concentrado. Após o

desaleitamento, realizado abruptamente na oitava semana, os animais receberam feno de “*coast cross*” *ad libitum* até a décima semana, sendo o consumo monitorado semanalmente.

3.2 Bromatologia das amostras de alimentos

Os alimentos ofertados aos animais (concentrado, sucedâneo lácteo e feno de “*coast cross*”) tiveram amostras colhidas durante o período experimental para posteriores análises bromatológicas (Tabela 3.1 e 3.2). As amostras foram moídas em moinho tipo Wiley, com peneira com crivos de 1 mm para a determinação de matéria seca (MS) a 105°C, matéria mineral (MM) e extrato etéreo (EE) de acordo com Campos, Nussio e Nussio (2002).

As análises de proteína bruta (PB) foram realizadas através de combustão, conforme método de Dumas, utilizando-se o analisador de nitrogênio LECO, modelo FB-528 (LECO Corporation, St Joseph, MI, EUA); fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina pelo método descrito por Van Soest, Robertson e Lewis (1991). Os teores de nitrogênio ligado ao FDN e ao FDA foram determinados conforme Licitra, Hernandez e Van Soest (1996). Os valores de nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados de acordo com a equação proposta por Weiss (1993); e de carboidratos não fibrosos (CNF) conforme Hall et al., (2000) através da equação (1):

$$(1) \quad \text{CNF} = 100 - [\%PB + \%FDN_{lp} + \%EE + \%cinzas]$$

Onde,

PB, EE, $FDN_{\text{livre de proteína (LP)}}$ e MM são expressos em % de MS

Tabela 3.1 – Ingredientes e composição químico-bromatológicas do concentrado

Ingredientes	Concentrado	
	Ração sem OE	Ração com OE (200mg/kg)
Milho moído, %MS	52	52
Farelo de soja, %MS	29	29
Casca de soja, %MS	3,5	3,5
Farelo de trigo, %MS	8,0	8,0
Premix mineral/vitamínico ¹ , %MS	1,5	1,5
Melaço, %MS	6,0	6,0
Composição Química		
Matéria Seca, %MS	86,84	87,13
Matéria Mineral, %MS	5,54	5,79
Proteína Bruta, %MS	23,14	23,02
Extrato Etéreo, %MS	3,53	3,68
FDN, %MS	14,65	14,80
FDA, %MS	7,17	7,25
N-FDN, %N total	10,34	8,88
N-FDA, %N total	5,16	4,19
Lignina, %MS	1,07	1,00
CNF, %MS	53	53
NDT	81,52	82,27

¹Composição do Premix mineral/vitamínico: Ca 16,8%; P 4,2%; S 2,3%; Na 11,6%; Cl 8,0%; Mg 2,4; Co 38,2 ppm; Cu 343 ppm; I 30,2 ppm; Fe 578,2 ppm; Mn 1146,4 ppm; Se 15,5 ppm; Zn 1176,2 ppm; Vit. A 68.760 UI/kg; Vit. E 764 UI/kg; Vit. D 57.300 UI/kg

Tabela 3.2 – Composição químico-bromatológicas do sucedâneo lácteo e feno

	Alimento	
	Sucedâneo ¹	Feno ²
Matéria Seca, %	95,64	88,47
Matéria Mineral, % MS	8,62	7,89
Proteína, % MS	20,36	12,61
Extrato Etéreo, % MS	14,51	1,77
FDN, % MS	0,03	68,64
FDA, % MS	0,0	33,11
N-FDN, % N total	0,0	36,62
N-FDA, % N total	0,0	9,92
Lignina, % MS	0,0	4,27
CNF, %MS	56	9
NDT	-	55,67

¹Sprayfo Violeta Sloten do Brasil Ltda., Santos, SP, Brasil

²Feno de "coast-croos"

3.3 Desempenho e desenvolvimento corporal

Os animais foram pesados ao nascer e semanalmente até completarem 10 semanas de vida, sempre antes do fornecimento da dieta líquida da manhã. Após cada pesagem, os animais tiveram a altura de cernelha, largura da garupa e perímetro torácico aferidos. Para obtenção da altura de cernelha e largura da garupa foi utilizada régua biométrica. O perímetro torácico foi aferido através de fita flexível. Ambos equipamentos apresentam escala em centímetros.

3.4 Escore fecal e sanidade geral

As fezes foram avaliadas diariamente, no período da manhã, de acordo com sua coloração, consistência e componentes conforme Larson et al. (1977). A classificação foi realizada conforme a fluidez (1; normal; 2: mole; 3: aquosa; 4: fluida); severidade, anotando-se o número de dias com diarreia; coloração das fezes (a: branca/amarelada; b: cinza; c: amarelo; d: marrom; e: vermelha/rósea; f: verde/verde escuro; g: muito escura/preta); consistência (a: normal; b: espumosa; c: com muco; d: grudenta; e: muito firme) e odor (a: normal; b: ligeiramente ofensivo; c: altamente ofensivo). Além disso, diariamente foi realizada o monitoramento da saúde dos animais, sendo registradas todas as intervenções e os medicamentos ministrados.

3.5 Avaliações da microbiota intestinal

Amostras de fezes foram colhidas de todos os animais semanalmente, a partir da 2^o semana, para contagem de microrganismos. A técnica para contagem dos microrganismos intestinais utilizada foi a sugerida por Kawakami et al. (2011), na qual as amostras de fezes são retiradas diretamente do reto dos animais. Cerca de 1 g de amostra foi homogeneizado em 9 mL de água destilada esterilizada, para a realização de diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-10} . De cada diluição foram retiradas alíquotas de 50 μ L para crescimento e contagem de enterobactérias e bactérias ácido-láticas (BAL).

Placas Petrifilm™ (3M do Brasil®, Sumaré, SP, Brasil) foram utilizadas para contagem de enterobactérias. As mesmas foram incubadas a $32,5\pm 1^\circ\text{C}$ em incubadora BOD Modelo TE-402 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) por 24 ± 2 horas. Após o período de incubação, a contagem prosseguiu, considerando as colônias vermelhas com zonas amarelas e/ou colônias vermelhas com bolhas de gás, com ou sem bordas amarelas como positivas para enterobactérias.

Placas de Petri com ágar nutriente Man Rogosa Sharper (MRS) foram utilizadas para contagem de bactérias ácido-láticas (BAL) (KAWAKAMI et al., 2011). As mesmas foram incubadas a $32\pm 1^\circ\text{C}$ em incubadora BOD Modelo TE-402 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) por 48 ± 3 horas. As placas foram colocadas para incubação em jarras fechadas contendo gerador de atmosfera de anaerobiose (ANAEROBAC, Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil).

As placas utilizadas para contagem continham de 30 a 300 colônias. Os valores das contagens foram correlacionados com as respectivas diluições e os resultados apresentados em unidades formadoras de colônia (UFC).

3.6 Avaliações do ambiente e microbiota ruminal

Colheitas de fluido ruminal foram realizadas semanalmente em todos os animais, a partir da 2ª semana de vida, com auxílio de sonda esofágica e bomba de vácuo. As amostras (50 mL) foram filtradas em fralda de pano e submetidas à determinação de pH imediatamente após a colheita, através de potenciômetro Modelo TEC-5 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil). Uma alíquota foi utilizada para a quantificação de microrganismos ruminais: bactérias amilolíticas, celulolíticas e protozoários. O restante da alíquota foi armazenado a -10°C para posterior determinação das concentrações de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e N-amoniaco.

3.6.1 Determinação de ácidos graxos de cadeia curta

As amostras de fluido ruminal foram centrifugadas a $15.000 \times g$ a 4°C por 60 minutos, e analisadas em cromatógrafo gasoso (Hewlett Packard 5890 Series II Integrator) e injetor automático (Hewlett Packard 6890 Series Integrator), conforme descrito por Campos, Nussio e Nussio (2002).

O padrão interno utilizado foi o ácido 2-metilbutírico sendo acrescentado, em cada tubo para leitura no cromatógrafo, um volume de 100 µL do padrão interno, 800 µL da amostra e 200 µL de ácido fórmico. Uma mistura de ácidos graxos de cadeia curta com concentração conhecida foi utilizada como padrão externo para a calibração do equipamento.

3.6.2 Determinação de nitrogênio amoniacal (N-NH₃)

As amostras de fluido ruminal destinadas para determinação de N-NH₃ foram descongeladas e centrifugadas a 11 000 x *g* a 4°C durante 30 minutos para obtenção do sobrenadante. As amostras foram analisadas segundo o método de Chaney e Marbach (1962), adaptado para leitura em Sistema Automático para Bioquímica - Modelo SBA-200 (CELM, Barueri, SP, Brasil) com filtro de absorvância de 540 nm. Para a obtenção da curva de calibração foram utilizadas soluções de 0; 1; 2; 4; 8; 16; 32 mg/dL de N-amoniacal. Uma alíquota de 40 µL de amostra e 40 µL de água foi transferida para um tubo de ensaio, adicionada de 2,5 mL de reagente fenol e 2,0 ml de reagente hipoclorito e incubada em banho-maria a 37°C, por 10 minutos. Em seguida, alíquotas foram pipetadas em cubetas para leitura no referido equipamento. Os dados de absorvância da curva de calibração foram utilizados para construção de curva de regressão, permitindo a determinação das concentrações de N-amoniacal das amostras.

3.6.3 Contagem dos microrganismos ruminais

Para a contagem das bactérias celulolíticas e amilolíticas uma alíquota de 1 mL de fluído ruminal foi misturada a 9 mL de água destilada esterilizada, para a realização das diluições seriadas de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰. De cada tubo de diluição, 50 µL foram espalhados em meio de cultura sólido em placas de Petri. As placas foram colocadas em jarras de anaerobiose e incubadas em incubadora do tipo BOD, a 38° C por cerca de 48h ou até o aparecimento das colônias. As bactérias celulolíticas e amilolíticas tiveram como fonte de crescimento o mesmo meio de cultura, meio mineral de Bushnell Hass (GOSHE, 1987), diferindo no substrato de degradação suplementado, 1% de celulose para celulolíticas e 1% de amido para amilolíticas. As

placas utilizadas para contagem continham de 30 a 300 colônias. Os valores das contagens foram correlacionados com as respectivas diluições e os resultados apresentados em unidades formadoras de colônia (UFC).

A metodologia para quantificação de protozoários utilizada foi uma adaptação da proposta por Dehority (1977), onde após filtração em 2 camadas de gaze 500 µL de conteúdo ruminal foi adicionado a 500 µL de solução formaldeído a 18,5%. A esse conteúdo foi acrescentado 2 mL de solução corante (formaldeído 35%, NaCl, methyl green e água), obtendo uma solução de 1:2 do produto final. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer onde a média de n quadrados contados foi multiplicada pela constante (10 000) e pelo fator de diluição (3) da metodologia.

3.7 Análises plasmáticas bioquímicas

A partir da segunda semana de vida dos animais foram realizadas, semanalmente, colheitas de sangue 2 horas após a alimentação da manhã, através de punção da veia jugular, utilizando-se tubos vacuolizados contendo fluoreto de sódio como antiglicolítico e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) como anticoagulante. Uma alíquota do sangue foi destinada para determinação de hematócrito, sendo o restante imediatamente centrifugado para a obtenção do plasma e posterior determinação de glicose, proteína total e β-hidroxiacetato (BHBA).

3.7.1 Determinação de hematócrito

As amostras de sangue colhidas semanalmente foram acondicionadas em tubos capilares para microhematócrito (Classcyto®), sem heparina, preenchendo-se cerca de $\frac{3}{4}$ dos tubos. Uma extremidade do tubo foi vedada com o auxílio de um isqueiro.

Os tubos capilares foram centrifugados em centrífuga de microhematócrito – Modelo SPIN 1000 (MICROSPIN), a 12 000 x g, por 10 minutos. Após centrifugação, a leitura dos valores de hematócrito foi realizada em régua própria para este fim, e os resultados expressos em porcentagem.

3.7.2 Determinação de glicose

As concentrações de glicose foram obtidas através do kit enzimático GLICOSE HK LIQUIFORM – Ref.: 85 (LABTEST Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) por espectrofotometria de ponto final, utilizando-se o filtro de absorvância de 505 nm em Sistema Automático para Bioquímica – Modelo SBA – 200 (CELM, Barueri, SP, Brasil). Para o ensaio foram utilizados 4 µL de amostra e 400 µL de reagente, pipetados em cubetas de reação. Após 10 minutos de incubação, a leitura da absorvância foi feita, sendo obtidos valores de glicose em mg/dL. A calibração do equipamento foi realizada com uma solução padrão fornecida pelo kit, na concentração de 100mg/dL de glicose.

3.7.3 Determinação de proteínas totais

As concentrações de proteínas totais foram obtidas através do kit enzimático PROTEÍNAS TOTAIS- Ref.: 99-250 (LABTEST Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) por espectrofotometria de ponto final, utilizando-se filtro de absorvância de 540nm em Sistema Automático para Bioquímica- Modelo SBA-200 (CELM, Barueri, SP, Brasil). Para o ensaio foram utilizados 400 µL de reagente biureto e 8 µL de amostra ou solução padrão (4g/dL), incubados por 1 minuto a 37° C. Após incubação, as amostras, juntamente com o reagente formam um composto de cor púrpura, cuja absorvância foi relacionada com a concentração de proteínas totais.

3.7.4 Determinação β-hidroxibutirato

A determinação de β-hidroxibutirato foi realizada através do kit enzimático RANBUT – Ref.: RB1007 (RANDOX Laboratories – Life SciencesLtd., Crumlin, UK), utilizando-se filtro de absorvância de 340 nm, em Sistema Automático para Bioquímica – Modelo SBA-200 (CELM, Barueri, SP, Brasil). Para o ensaio foram utilizados 12,5 µL de amostra, acrescido de 500 µL de reagente enzimático pipetados em cubeta de reação. O primeiro tempo de reação foi de 60 segundos, seguido de leitura da absorvância. O segundo tempo de reação foi de 120 segundos, seguido de mais uma leitura da absorvância. A diferença entre as duas absorvâncias resultou nas concentrações de BHBA, de acordo com os valores

obtidos para o padrão. A calibração foi realizada com a solução padrão do kit, com concentração de 1,000mmol/L.

3.8 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, sendo os animais alocados nos blocos de acordo com seu peso ao nascer. Os dados de consumo de concentrado, ganho de peso diário, medidas corporais e parâmetros sanguíneos foram analisados como medidas repetidas no tempo com auxílio do procedimento MIXED do pacote estatístico SAS (version 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC), conforme modelo (2). Para as análises dos dados de contagem de microrganismos fecais e ruminais, os dados foram transformados para log₁₀ e posteriormente avaliados, utilizando-se o mesmo modelo estatístico. Para efeito de comparação de médias foi utilizado o teste t de Student, sendo as médias estimadas através do método dos quadrados mínimos (LSMEANS), com nível de significância de 5%.

$$(2) Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + W_k + E_{ijk}$$

Onde,

Y_{ijk} = variável resposta;

μ = média geral;

T_i = efeito do tratamento (inclusão e via de fornecimento de óleos essenciais);

B_j = efeito do bloco;

W_k = efeito da idade dos animais (semana de colheita do dado/amostra);

E_i = efeito devido ao acaso (resíduo).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desempenho e avaliações intestinais

Os dados de consumo de concentrado inicial (g/dia), peso corporal (kg) e ganho de peso diário (g) dos animais durante o período experimental são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Consumo de concentrado (g/dia), peso corporal (kg) e ganho de peso diário (g/d) de bezerros suplementados com blend de óleos essenciais

	Tratamentos ⁽¹⁾				P< ⁽³⁾		
	C	S	SCI	EPM ⁽²⁾	T	I	TxI
Consumo							
Concentrado, g/dia	589,1	450,9	545,7	56,00	0,205	<,0001	0,044
Feno, g/semana	703,4	859,8	860,8	162,44	0,735	<,0001	0,4912
Peso Corporal, kg	50,7	46,6	49,3	1,53	0,179	<,0001	0,819
Ganho de Peso, g/dia	395,5	378,3	392,1	36,12	0,908	<,0001	0,766

⁽¹⁾ C= controle; S= 400 mg/kg de OE no sucedâneo lácteo; SCI= 200 mg/kg de OE no sucedâneo lácteo e 200 mg/kg de OE no concentrado inicial

⁽²⁾ EPM = erro padrão da média

⁽³⁾ T = efeito do tratamento; I = efeito da idade dos animais; T x I = efeito da interação tratamento e idade dos animais

Nenhuma das variáveis foi afetada pela suplementação com o blend de óleos essenciais. Ocorreu interação entre tratamento e idade para o consumo de concentrado ($P < 0,05$), no entanto, essa interação não foi observada para os tratamentos na mesma semana de vida dos animais (Figura 4.1). Como já era esperado, ocorreu efeito de idade ($P < 0,0001$) para o consumo de concentrado, uma vez que aumenta a necessidade de consumir maior quantidade de alimento sólido com o avançar da idade.

O consumo de feno, ofertado nas semanas 9 e 10, também apresentou efeito significativo de idade ($P < 0,0001$). Segundo Davis e Drackley (1998), a incorporação de feno de alta qualidade em complemento ao concentrado inicial é recomendado para bezerros leiteiros. Contudo, essa complementação só foi realizada após o desaleitamento para que os bezerros não desviassem o consumo da ração

concentrada para o feno, que por sua vez não proporciona o mesmo desenvolvimento ruminal que o concentrado.

Quanto mais cedo se inicia o consumo de alimento sólido (concentrado inicial) pelo animal, mais rapidamente ocorrerá à transição do bezerro da condição de pré-ruminante para ruminante funcional, ocorrendo mudanças na digestão e no metabolismo animal (DAVIS; DRACKLEY, 1998). Essas mudanças estão associadas ao aumento da síntese microbiana e, por consequência, o desenvolvimento físico e metabólico do rúmen. A partir da primeira semana os bezerros já são capazes de ingerir alimentos sólidos, no entanto, somente após o primeiro mês de vida são capazes de ingerir quantidades suficientes de concentrado que irão contribuir com apreciável quantidade de energia metabólica (COELHO et al., 2009). Segundo Drackley (2008), as semanas 2 e 3 contemplam a fase de pré-ruminantes, em que os bezerros consomem quantidades bastante reduzidas de alimento sólido e dependem quase que exclusivamente da dieta líquida. A partir de então, o bezerro passa para a fase de transição, momento este onde ocorrem as transformações ruminoreticulares, com uma rápida expansão de volume e de diferenciação do epitélio ruminal, bem como a produção dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).

O maior ou menor consumo de concentrado está relacionado ao volume de dieta líquida (leite integral ou sucedâneo lácteo) oferecida ao animal (DAVIS; DRACKLEY, 1998). Segundo Kertz (1979), a ingestão de concentrado é responsável por mais de 65% da variação no ganho de peso de bezerros jovens com limitação de alimentação líquida. O consumo de concentrado ao longo das semanas foi crescente (Figura 4.1), mas a partir da 6ª semana é possível observar uma mudança de comportamento na curva, com aumento no consumo de concentrado; e na 8ª semana, momento do desaleitamento, o consumo dos animais aumenta rapidamente.

Os animais consumiram diariamente 6 litros de sucedâneo lácteo, o que pode ter retardado a procura por parte dos mesmos ao concentrado inicial. Esse volume de sucedâneo lácteo dividido em duas refeições está acima do tradicionalmente fornecido (4L/d). Em dietas de 4L de leite por dia o animal não consegue atingir altos valores de ganho de peso, porém ocorre o estímulo do bezerro em consumir o concentrado inicial mais precocemente e, portanto, iniciar o desenvolvimento ruminal. O ganho de peso esperado para essas circunstâncias gira em torno de 200 a 400 g/d (DRACKLEY, 2008). Os animais experimentais apresentaram ganho de

peso dentro dessa faixa, mesmo, recebendo maior volume de leite. A média de consumo de concentrado antes do desaleitamento permaneceu em torno de 500 g/d, valor este que refletiu significativamente no peso corporal (PC) e ganho de peso diário (GPD). Após o desaleitamento o consumo aumentou de 500 g/d para 2 kg, em apenas duas semanas.

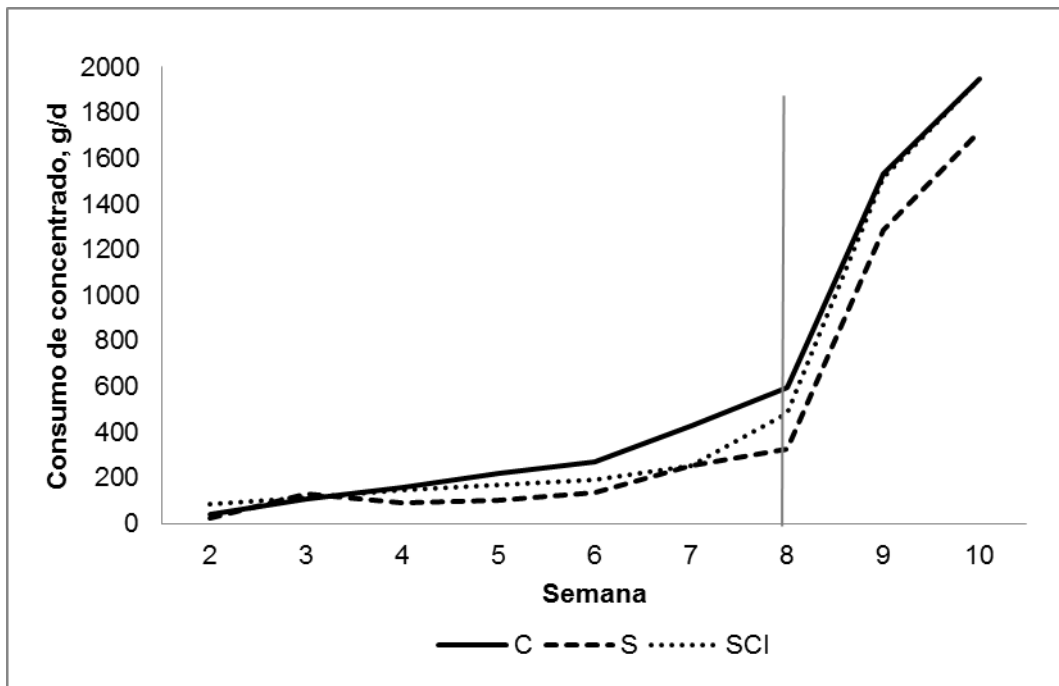


Figura 4.1 – Consumo de concentrado (g/d) ao longo das semanas, em bezerros suplementados com blend de óleos essenciais (C=controle; S=400mg/kg de OE no sucedâneo lácteo; SCI=200mg/kg de OE no sucedâneo lácteo e 200mg/kg no concentrado inicial)

A suplementação com o blend de óleos essenciais não foi rejeitada pelos animais em nenhuma das vias de fornecimento, indicando que se houve mudança da palatabilidade, esta não influenciou no consumo. Afinal, os animais do grupo controle apresentaram consumo semelhante aos animais suplementados. Esperava-se que a suplementação dos OE via concentrado inicial melhorasse o desenvolvimento ruminal, no que diz respeito à modulação das bactérias. A produção de AGCC seria intensificada e por consequência anteciparia o crescimento das papilas ruminais, provavelmente elevando o consumo de alimento sólido desses animais.

O PC e o GPD são diretamente proporcionais ao consumo de concentrado. Embora a suplementação com óleos essenciais não tenha afetado o PC ou GPD, houve efeito significativo da idade para estas variáveis ($P < 0,0001$). Conforme

ocorreu o desenvolvimento e crescimento dos animais o PC o GPD tiveram aumentos progressivos até a 10ª semana de vida (Figura 4.2). Os valores de ganho de peso são semelhantes aos encontrados por Ferreira e Bittar (2011), em que outros aditivos foram testados com a função de melhorar o desempenho geral de bezerros leiteiros.

Resultados semelhantes aos descritos também foram encontrados por Manzanilla et al. (2004), onde leitões na fase inicial após o desmame foram suplementados com um blend de óleo essenciais (0, 150 e 300mg/kg), contendo 5% de carvacol, 3% de cinamaldeído e 2% de óleo resina de pimenta. A composição do blend utilizado pela equipe de Manzanilla foi bastante semelhante ao utilizado no presente estudo, bem como os resultados. O ganho de peso diário dos animais não diferiu para nenhum nível utilizado, sendo 452, 403 e 423 g/d para dose de 0, 150 e 300 mg/kg de OE, respectivamente.

A dose necessária para que o animal responda em aumento de peso corporal e conseqüente ganho de peso diário é um enigma entre a comunidade científica. Além disso, ela está associada às condições de fornecimento, concentração e pureza dos OE utilizados. No presente estudo foi utilizada dose de 400mg OE/kg, em duas vias de fornecimento, no entanto, a mesma não foi capaz de melhorar o desempenho dos animais.

Resultados similares foram encontrados com a suplementação de outros aditivos, também alternativos aos antibióticos, promotores de crescimento. Pinos-Rodríguez et al. (2008) avaliaram o efeito de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii*) no desempenho de bezerros leiteiros e não observaram efeito do aditivo no consumo de concentrado inicial, GPD ou peso corporal. Por outro lado, observou-se efeito da idade, com valores crescentes no consumo de concentrado até a 10ª semana de vida ($P < 0,0001$).

Magalhães et al. (2008) também testaram a suplementação com leveduras em bezerros leiteiros, e não encontram diferença significativa no GPD ou consumo de concentrado entre tratamentos. No entanto a média de consumo de concentrado durante o período experimental ficou em torno de 900 g/d, muito superior ao encontrado no presente estudo. Igualmente ao que ocorre com os OE, o efeito da suplementação com leveduras depende da dose e da estirpe do microrganismo, bem como o método de fornecimento.

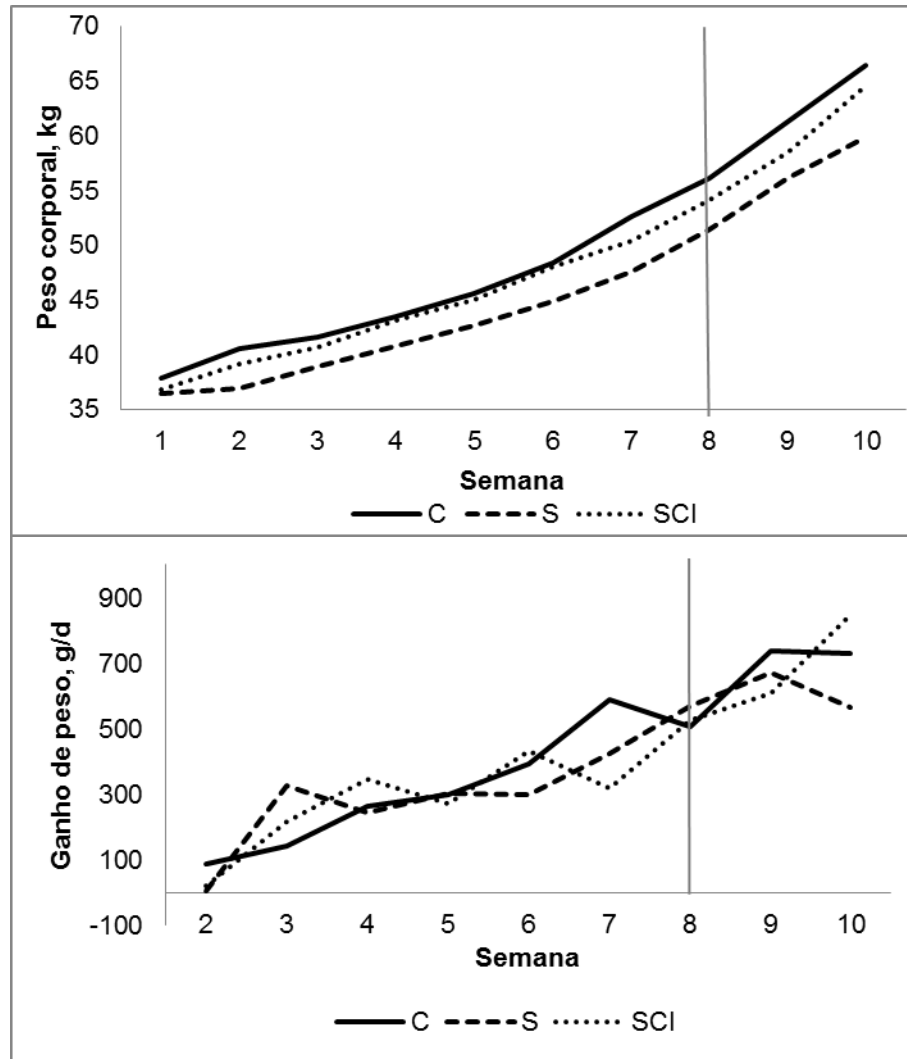


Figura 4.2 - Peso corporal (A), ganho de peso diário (B), ao longo das semanas, de bezerros suplementados com blend de óleos essenciais (C=controle; S=400mg/kg de OE no sucedâneo lácteo; SCI=200mg/kg de OE no sucedâneo lácteo e 200mg/kg no concentrado inicial)

A média das mensurações corporais (altura de cernelha, perímetro torácico e largura de garupa) não foi afetada pela suplementação com óleos essenciais (Tabela 4.2). Para todas as medidas foi encontrado efeito de idade ($P < 0,0001$). É notável que a partir da sexta semana o crescimento é intensificado, principalmente para largura de garupa e perímetro torácico (Figura 4.3). Segundo Hoffman (1997), definições de outros critérios de crescimento esquelético, tais como comprimento, largura de garupa, perímetro torácico ou profundidade do peito são dados limitados. Destas medições, os autores consideram o comprimento com o maior potencial para utilização como segunda medida de crescimento.

Tabela 4.2 – Altura de cernelha (cm), perímetro torácico (cm) e largura de garupa (cm) de bezerros suplementados com blend de óleos essenciais

	Tratamentos ⁽¹⁾				P< ⁽²⁾		
	C	S	SCI	EPM ⁽¹⁾	T	I	TxI
Altura na cernelha							
Média do período, cm	81,6	81,0	81,6	0,81	0,836	<,0001	0,089
Ganho, cm/semana*	0,12	0,16	0,11	0,02	0,062	0,147	0,072
Perímetro torácico							
Média do período, cm	85,6	84,5	85,3	0,93	0,689	<,0001	0,101
Ganho, cm/semana	0,202	0,216	0,218	0,02	0,886	0,004	0,091
Largura de garupa							
Média do período, cm	22,7	22,3	22,4	0,30	0,638	<,0001	0,278
Ganho, cm/semana	0,046	0,053	0,051	0,01	0,781	0,038	0,147

⁽¹⁾ C= controle; S= 400 mg/kg de OE no sucedâneo lácteo; SCI= 200 mg/kg de OE no sucedâneo lácteo e 200 mg/kg de OE no concentrado inicial

⁽²⁾ EPM = erro padrão da média

⁽³⁾ T = efeito do tratamento; I = efeito da idade dos animais; T x I = efeito da interação tratamento e idade dos animais

*Contraste significativo (P<0,005) entre via de fornecimento de blend de OE (S vs. SCI)

Apesar dos dados limitados, as mensurações corporais são de fácil realização e não são dispendiosas. Os resultados dessas aferições fornecem dados auxiliares e importantes, que ajudam no entendimento do crescimento ósseo e muscular dos bezerros. Segundo Heinrichs et al. (2007), as medidas de desenvolvimento corporal têm alta correlação com o peso e desempenho do animal. Através da análise dos contratos foi observada diferença significativa entre as vias de fornecimento de blend de OE (P=0,0316), para ganho em altura de cernelha. Os resultados das mensurações corporais são ligeiramente inferiores aos encontrados por Bartlett et al. (2006) e Ferreira e Bittar (2011). Nos dois estudos foram testados aditivos comerciais alternativos aos antibióticos promotores de crescimento.

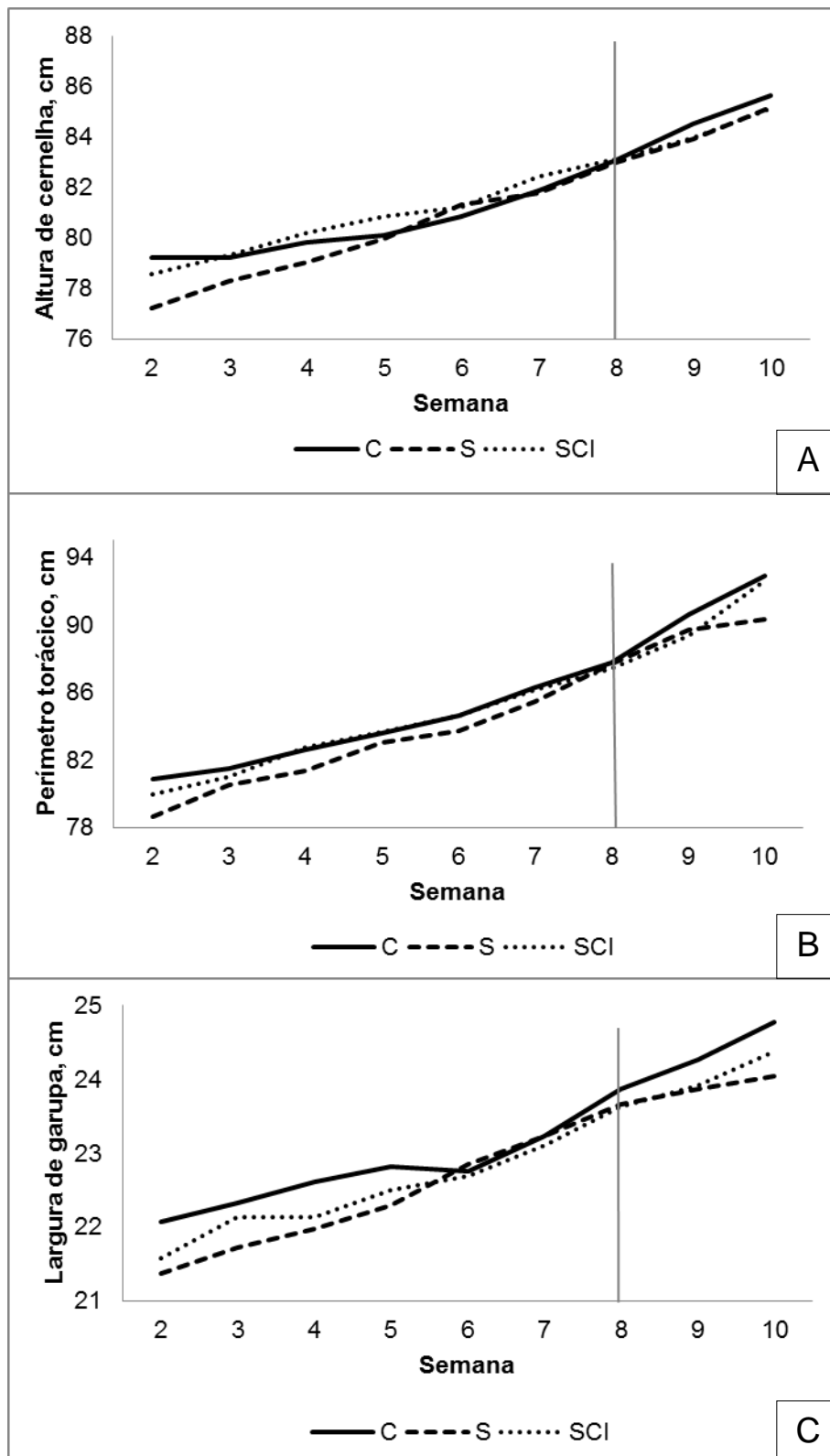


Figura 4.3 – Altura de cernelha (A), largura de garupa (B), perímetro torácico (C), ao longo das semanas, de bezerros suplementados com blend de óleos essenciais (C=controle; S=400mg/kg de OE no sucedâneo lácteo; SCI=200mg/kg de OE no sucedâneo lácteo e 200mg/kg no concentrado inicial)

As primeiras duas semanas de vida dos bezerros são consideradas críticas e decisivas. Os animais não possuem ainda o sistema imune completamente desenvolvido, bem como a flora gastrointestinal, tornando-os susceptíveis a invasões microbianas. Os altos índices de diarreia nas propriedades leiteiras estão relacionados com a segunda semana de vida dos animais, aproximadamente entre os 10 a 15 dias de idade. Animais que não foram bem colostrados e que apresentam outras enfermidades sofrem mais com a diarreia nessa fase e muitos não conseguem vencer a invasão microbiana e vêm a óbito.

As pontuações médias de escore fecal para todas as variáveis testadas (fluidez, cor, consistência e odor) não foram afetadas pela suplementação dos óleos essenciais. No entanto, a idade influenciou significativamente ($P < 0,0001$) na evolução das mensurações realizadas nas fezes dos bezerros (Tabela 4.3). Segundo Larson et al. (1977), o animal apresenta diarreia quando a pontuação para fluidez é $>2,5$. É possível observar na Figura 4.4 que apenas na semana 4 os animais do grupo S (400 mg/kg do blend de OE no sucedâneo) ultrapassaram a pontuação de 2,5.

Tabela 4.3 – Escores de fluidez, cor, consistência e odor das fezes de bezerros suplementados com blend de óleos essenciais

	Tratamentos ⁽¹⁾				P _{<} ⁽³⁾		
	C	S	SCI	EPM ⁽²⁾	T	I	TxI
Escore Fecal							
Fluidez	1,8	1,7	1,8	0,091	0,5279	<,0001	0,4812
Cor	3,8	4,0	4,2	0,220	0,4482	<,0001	0,9292
Concistência	1,5	1,5	1,4	0,078	0,8024	<,0001	0,9462
Odor	1,5	1,5	1,6	0,083	0,8757	<,0001	0,7948
Micorganismos, log 10 UFC/gMS							
Enteboractérias	4,45	4,53	4,28	0,243	0,6522	0,0001	0,6363
Bact. ácido-Láticas	7,01	7,13	7,01	0,262	0,8596	0,0059	0,7441

⁽¹⁾ C= controle; S= 400 mg/kg de OE no sucedâneo lácteo; SCI= 200 mg/kg de OE no sucedâneo lácteo e 200 mg/kg de OE no concentrado inicial

⁽²⁾ EPM = erro padrão da média

⁽³⁾ T = efeito do tratamento; I = efeito da idade dos animais; T x I = efeito da interação tratamento e idade dos animais

Em estudos de Bampidis et al. (2006) foi comparado o efeito da neomicina com o óleo essencial de orégano para bezerros leiteiros, e não foram encontradas diferenças significativas na pontuação de escore fecal (2,58 e 2,67 para tratamento neomicina e tratamento OE, respectivamente). Segundo Durmic e Blache (2012), os óleos essenciais são responsáveis por manter a flora intestinal em equilíbrio e minimizar os casos de diarreia em animais de produção.

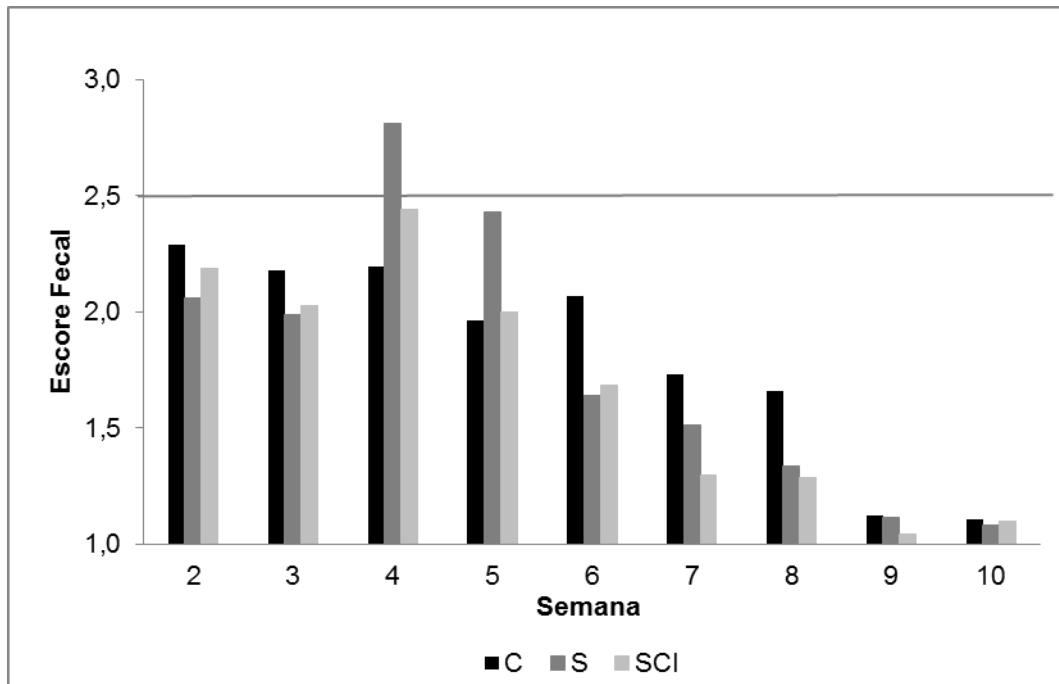


Figura 4.4 – Pontuação de escore fecal ao longo das semanas de bezerros suplementados com blend de óleos essenciais (C=controle; S=400mg/kg de OE no sucedâneo lácteo; SCI=200mg/kg de OE no sucedâneo lácteo e 200mg/kg no concentrado inicial)

A coloração das fezes dos animais foi bastante variável, desde branca até o verde escuro. A coloração verde foi associada com as fezes de animais desaleitados, onde o consumo de concentrado já estava estabilizado, se assemelhando bastante ao do ruminante adulto. Já a coloração amarela está associada a infecções por *Escherichia coli* e fezes com muco a infecções por Coronavírus (MILLEMANN, 2009). Os animais em tratamento tiveram uma média de coloração marrom, consistência normal e odor ligeiramente ofensivo. Nas primeiras semanas de vida, onde ocorreu a maioria dos casos de diarreia, as fezes tiveram um padrão de coloração branco-amarela, consistência fluida e odor altamente ofensivo.

A severidade da diarreia, ou seja, a quantidade de dias que os animais permaneceram com escore fecal acima de 2,5 não foi afetada pela suplementação

de blend de óleos essenciais ($P>0,5$). Contudo, foi observado efeito da idade ($P<0,0001$), com redução no número de dias com escore superior a 2,5, ao passar das semanas os animais diminuíram a quantidade de dias em diarreia, até chegar à zero nas semanas 9 e 10 (Figura 4.5). A média dos dias totais com diarreia também não foi diferente entre os tratamentos ($P>0,5$), sendo 13, 15 e 14 dias para o tratamento controle, OE na dieta líquida e OE na dieta total, respectivamente. Observou-se que os animais que receberam OE via sucedâneo lácteo tenderam a permanecer mais tempo em diarreia, apesar de não ter havido diferença significativa. Essa tendência é confirmada pela porcentagem de animais com escore fecal $>2,5$, com valores de 90% para os animais suplementados via sucedâneo lácteo, 80% para aqueles suplementados em ambas as vias e de 67% para os animais não suplementados.

O blend de óleos essenciais utilizado resultou em efeito contrário a hipótese levantada. Esperava-se que os OE diminuíssem a pontuação de escore fecal, bem como os dias em diarreia. No entanto, o tratamento controle obteve menor número de animais com pontuação $>2,5$ (67%); além disso, as pontuações de escore fecal e a severidade da diarreia também tenderam a ser menor para animais não suplementados. Uma possível explicação para o ocorrido seria uma reação adversa causada pelos OE no trato intestinal desses animais. Em revisão, Durmic e Blache (2012) levantaram os efeitos, benéficos e prejudiciais, dos OE no trato intestinal dos animais, e relataram que os OE podem estar associados à redução da atividade enzimática e mudanças na anatomia e fisiologia da parede intestinal, contribuindo, portanto, para o desenvolvimento de problemas intestinais.

A flora intestinal avaliada (Tabela 4.3) não apresentou diferença significativa em resposta a suplementação dos OE ($P>0,5$). A comparação entre os microrganismos benéficos (BAL) e os prejudiciais (Enterobactérias) levou a conclusão que a flora intestinal dos bezerros esteve predominantemente povoada de bactérias que ajudam a manter o equilíbrio e o funcionamento normal do intestino. A contagem de BAL ficou em torno de 7,0 \log_{10} UFC/gMS, ao passo que a contagem de enterobactérias foi de 4,5 \log_{10} UFC/gMS (Tabela 4.3). Esses valores confirmam a pontuação de escore fecal, afinal apenas na semana 4 os animais que receberam OE apenas na dieta líquida tiveram fluidez acima de 2,5 (Figura 4.4).

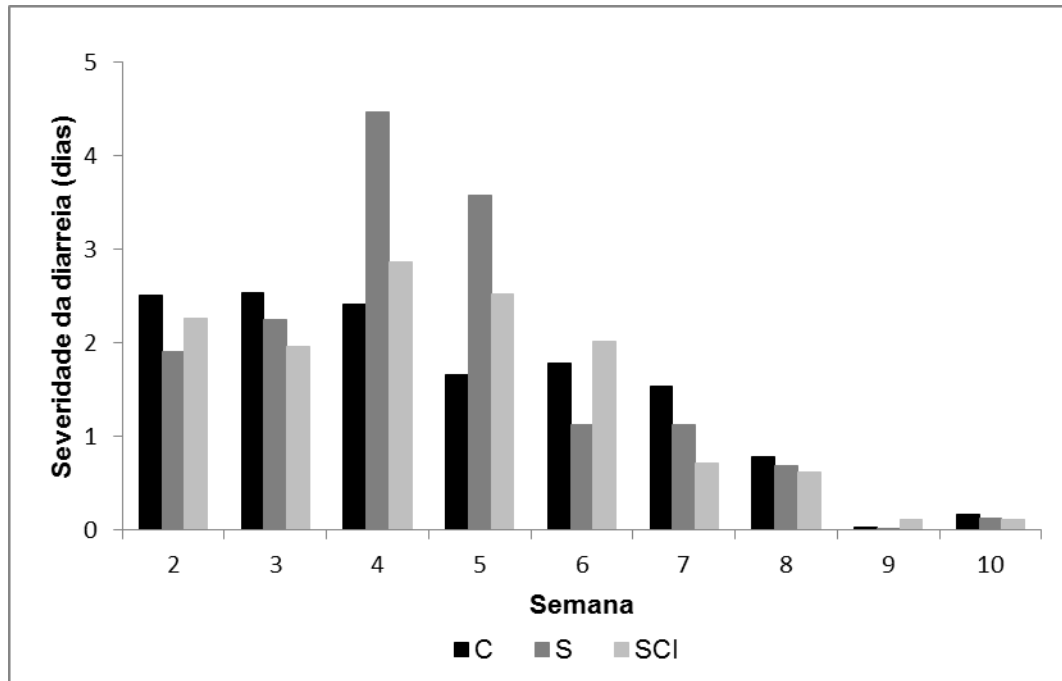


Figura 4.5 – Severidade da diarreia (dias) ao longo das semanas de vida de bezerros suplementados com blend de óleos essenciais (C=controle; S=400mg/kg de OE no sucedâneo lácteo; SCI=200mg/kg de OE no sucedâneo lácteo e 200mg/kg no concentrado inicial)

As BAL são um grupo de microrganismos gram-positivos que crescem sob condições microaerófilas ou estritamente anaeróbicas. Os mais importantes gêneros de BAL são os *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Enterococcus* (KLEIN et al., 1998). Os *Lactobacillus* representam o maior grupo de microrganismos do intestino delgado, seguido pela *Eschechiria coli*, principal enterobactéria causadora da diarreia em bezerros. As BAL são responsáveis por manter o equilíbrio intestinal, o pH e também controlam o crescimento das Enterobactérias, principalmente *Eschechiria coli* (MANZANILLA et al., 2004).

Semelhante ao comportamento das pontuações do escore fecal, a contagem das enterobactérias diferiram para o efeito da idade. Ao longo das semanas o número de microrganismos foi diminuindo progressivamente ($P>0,0001$) (Figura 4.6). Apesar da contagem das BAL diminuir ao longo das semanas, essa redução foi muito menor quando comparada a queda na contagem das enterobactérias. A carga microbiana como um todo tende a diminuir ou estabilizar com o desenvolvimento do animal e conseqüente desenvolvimento do sistema imune. Observa-se que as BAL tiveram um comportamento praticamente constante até a semana 6, momento este em que as enterobactérias estiveram em maior concentração, apesar de já indicarem queda no crescimento. Isso provavelmente devido a ação de controle que

os *Lactobacillus* exercem sobre as cepas de *Eschechiria coli*. A partir da semana 6 ambos os grupos de microorganismos tiveram a taxa de crescimento reduzida, indicando estabilidade do trato intestinal, o que pode ser confirmado pelas características das fezes, uma vez que a partir da semana 6 os animais suplementados apresentam pontuação de fluidez ≤ 2 .

Os valores das contagens para enterobactérias foram inferiores e para BAL superiores aos encontrado por Kawakami et al. (2011), os quais avaliaram a suplementação de probióticos via sucedâneo lácteo. O grupo controle apresentou contagem de 5,23 UFC para enterobactérias e 5,11 UFC para BAL, já os animais suplementados com o aditivo apresentaram 4,60 UFC para enterobactérias e 6,66 UFC para BAL. Esses últimos valores se assemelham aos encontrados no presente trabalho, onde a proporção de bactérias benéficas foi superior às bactérias prejudiciais.

Resultados similares foram encontrados por Manzanilla et al. (2004) em suínos na fase inicial, não havendo efeito da suplementação 0, 150 e 300 mg/kg de OE no que diz respeito a persistência de diarreia Os principais microrganismos intestinais foram avaliados em amostras colhidas no intestino delgado, sendo que a contagem individual de enterobactérias e BAL não apresentou diferenças significativas. Segundo Buddle e Bolton (1992) a população microbiana do intestino delgado é fator determinante no surgimento de diarreias. No presente trabalho as contagens foram realizadas nas fezes dos animais, as quais foram colhidas diretamente no reto dos mesmos.

Em estudos posteriores Manzanilla et al. (2009) levantaram a hipótese de que o teor da proteína da dieta pode afetar diretamente na ação antimicrobiana dos óleos essenciais em suínos, o que pode explicar parte dos resultados do presente estudo. Os autores testaram o mesmo blend de óleos essenciais do trabalho de 2004, nas doses de 0 e 200 mg/kg, em dietas onde os níveis de proteína foram crescente (18% PB-10% de farinha de peixe; 18% PB- de 5% de farinha de peixe e 9% de soja extrusada e 20%PB- 10% de farinha de peixe e 6,3% de soja extrusada). Apesar da hipótese levantada, não foram encontrados efeitos significativos no desempenho e nos casos de diarreia de animais suplementados com o OE recebendo dietas com diferentes níveis de proteína bruta. No entanto, maiores contagens de lactobacilos foram observadas para animais consumindo dieta com 18% de PB e suplementados com 200 mg/kg de OE. Alguns pesquisadores

hipotetizam que a limitação de nutrientes induz a concorrência de grupos de microrganismos, tornando assim as bactérias mais sensíveis aos efeitos externos, nesse caso a ação dos OE (FRANÇOIS, 1962).

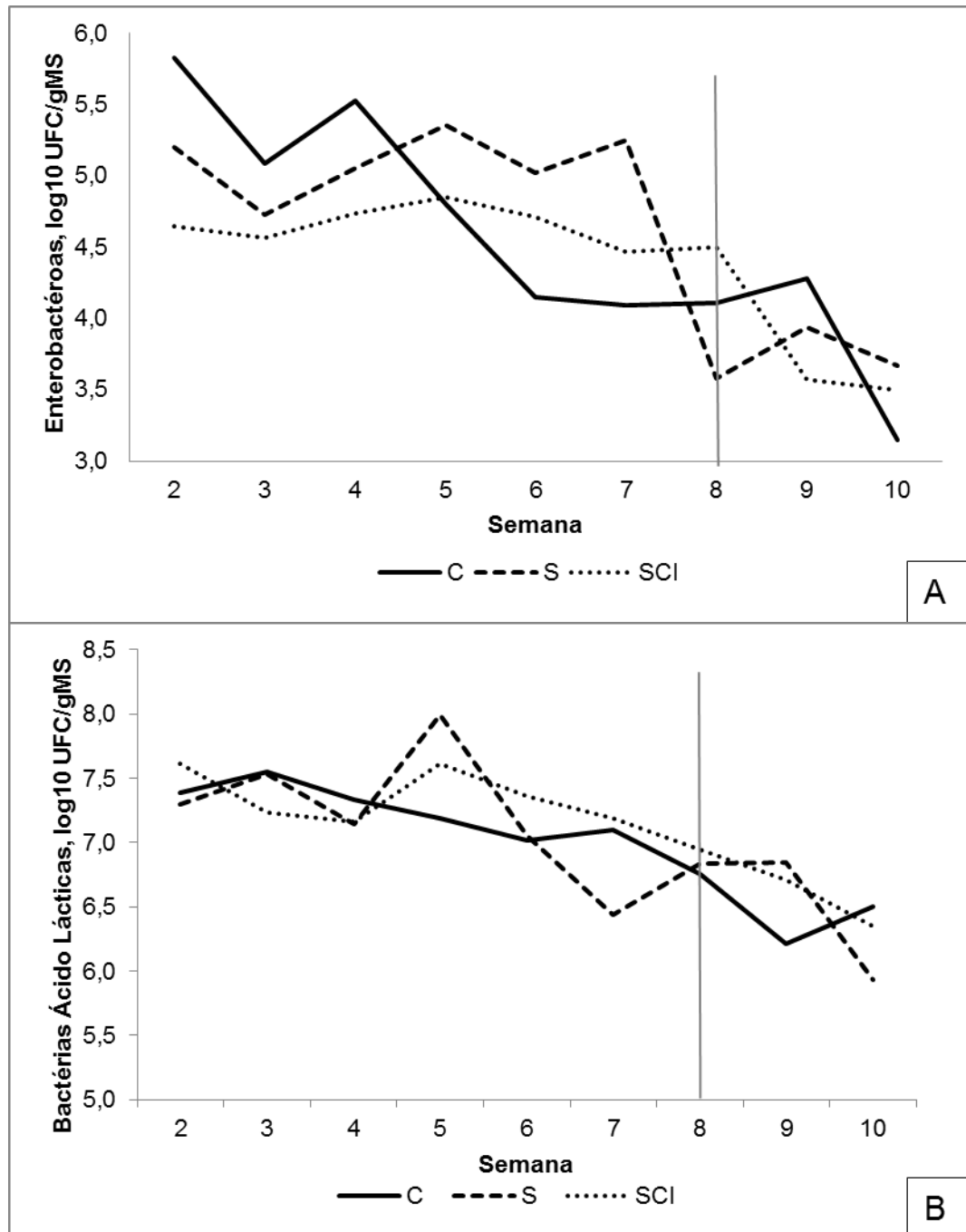


Figura 4.6 – Contagem de enterobactérias (A) e bactérias ácido lácticas (B) (log₁₀ UFC/gMS), ao longo das semanas de bezerros suplementados com blend de óleos essenciais (C=controle; S=400mg/kg de OE no sucedâneo lácteo; SCI=200mg/kg de OE no sucedâneo lácteo e 200mg/kg no concentrado inicial)

O teor de proteína bruta do concentrado inicial (23%) fornecido aos animais está acima do normalmente recomendado para bezerros, entre 18% e 20%. Contudo, Drackley, Barillet e Bloom (2003) testaram maior teor de proteína bruta no concentrado inicial (22%) e verificaram que os animais são mais eficientes, ou seja, apresentam maior ganho de peso e perímetro torácico em comparação aos animais com dieta base de 18% de PB. Hill et al. (2001) testaram valores ainda maiores de proteína bruta no concentrado inicial: 18, 20, 22, 24 e 26%. Os teores de PB superiores a 18% não afetaram no ganho de peso corporal, ingestão de concentrado, largura de garupa e escore de condição corporal. A excreção de nitrogênio, tanto plasmático como uréico, é maior quando os animais consomem mais proteína.

A ideia levantada por François (1962) e testada por Manzanilla et al. (2009) pode ter sido um dos fatores para explicar a falta de eficiência dos OE testados. O alto teor de proteína bruta do concentrado inicial não proporcionou disputa dos grupos de microrganismos para obter os nutrientes e isso não os tornou sensíveis à ação dos óleos essenciais.

4.2 Parâmetros ruminais

Os valores de pH do fluido ruminal não foram afetados pelos tratamentos ($P > 0,7$) ou pela idade dos animais ($P > 0,1$) (Tabela 4.4). Contudo, é possível observar oscilações ao longo das semanas. Na semana 6 iniciou-se redução do pH para os três grupos. O tratamento que recebeu OE apenas na dieta líquida (S) apresentou uma constância a partir da semana 8 e esta persistiu até a semana 10, com o término do experimento (Figura 4.7).

Tabela 4.4 – Valores médios de pH, ácidos graxo de cadeia curta (AGCC) e nitrogênio amoniacal (N-NH₃) de bezerros suplementados com blend de óleos essenciais

	Tratamentos ⁽¹⁾				EPM ⁽²⁾	P< ⁽³⁾		
	C	S	SCI	T		I	TxI	
pH	5,8	5,9	5,8	0,12	0,8111	0,1134	0,0631	
N-NH ₃ , mg/dL	11,48b	12,73b	16,67a	1,517	0,0425	0,0863	0,9198	
Ácidos Graxos de Cadeia Curta, µmol/ mL								
Acético	57,4	56,01	62,8	3,42	0,3423	<,0001	0,1615	
Propiônico	23,8	20,8	26,5	2,58	0,2837	<,0001	0,1077	
Butírico	8,9	7,8	8,8	0,88	0,6561	<,0001	0,2511	
Isobutírico	0,4	0,4	0,3	0,04	0,8614	0,0249	0,5625	
Valérico	2,6	2,1	2,6	0,28	0,3586	<,0001	0,2071	
Isovalérico	0,7	0,7	0,6	0,08	0,8365	0,0819	0,5421	
Total	93,6	88,1	101,3	6,91	0,3880	<,0001	0,0891	
Acético: propiônico	2,6	2,9	2,7	0,21	0,7602	0,0030	0,0016	

⁽¹⁾ C= controle; S= 400 mg/kg de OE no sucedâneo lácteo; SCI= 200 mg/kg de OE no sucedâneo lácteo e 200 mg/kg de OE no concentrado inicial

⁽²⁾ EPM = erro padrão da média

⁽³⁾ T = efeito do tratamento; I = efeito da idade dos animais; T x I = efeito da interação tratamento e idade dos animais

O consumo de concentrado está altamente correlacionado com a queda do pH, devido ao conteúdo do alimento sólido altamente fermentescível, produzindo grandes quantidades de ácidos (LORENZ, 2009). Segundo Coelho et al. (2009), dos 30 aos 60 dias de idade, os bezerros passam por um grande desafio, que é a manutenção do pH adequado no rúmen. A produção dos ácidos oscila com a variação do consumo de concentrado e, por esta razão, existe a dificuldade em manter um pH estável.

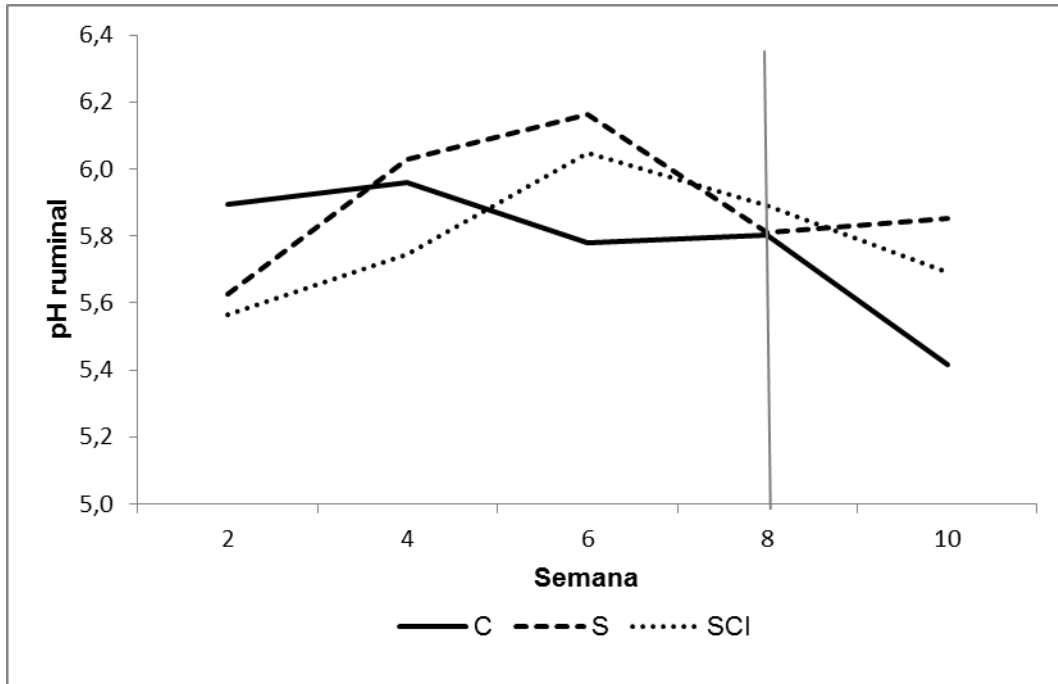


Figura 4.7 – Valores de pH ruminal ao longo das semanas de bezerros suplementados com blend de óleos essenciais (C=controle; S=400mg/kg de OE no sucedâneo lácteo; SCI=200mg/kg de OE no sucedâneo lácteo e 200mg/kg no concentrado inicial).

Os ácidos que influenciam na mudança do pH são os ácidos fortes, dentre eles estão o ácido butírico e o propiônico. O aumento da concentração dos mesmos é consequência do aumento da capacidade fermentativa do rúmen, ou seja, desenvolvimento ruminal. O teor de FDN no concentrado tem grande influência sobre o pH do fluido ruminal, afinal o fornecimento de feno durante o aleitamento não é recomendado, sendo o concentrado responsável por suprir a exigência da fração fibrosa. A fonte de fibra deve ser de qualidade e capaz de estimular mais a salivação e ruminação, elevando o pH ruminal. A casquinha de soja se apresenta como uma boa alternativa de inclusão.

Além da importância do teor de FDN na ração concentrada, a granulometria dos concentrados normalmente utilizados para bezerros também podem afetar o processo. A forma farelada não provoca estímulo físico sobre o retículo-rúmen para a movimentação e a ruminação (salivação, tamponamento); a forma peletizada também não proporciona estímulo físico suficiente, pois os alimentos são facilmente quebrados na boca do animal (COELHO et al., 2009). Segundo Lorenz (2004) os animais estão em acidose ruminal quando o pH está abaixo de 5. No entanto, esse valor não foi verificado nos animais do presente estudo.

O perfil de ácidos graxos de cadeia curta também não foi afetado pela suplementação com OE. Contudo, com o passar das semanas os AGCC totais foram aumentando (Figura 4.8), comportamento inverso ao observado para o pH. Os AGCC são os produtos finais da fermentação e estão altamente correlacionados com o consumo de concentrado. Após o desaleitamento os animais apresentaram um aumento significativo do consumo de concentrado, o que resultou em comportamento semelhante para os AGCC.

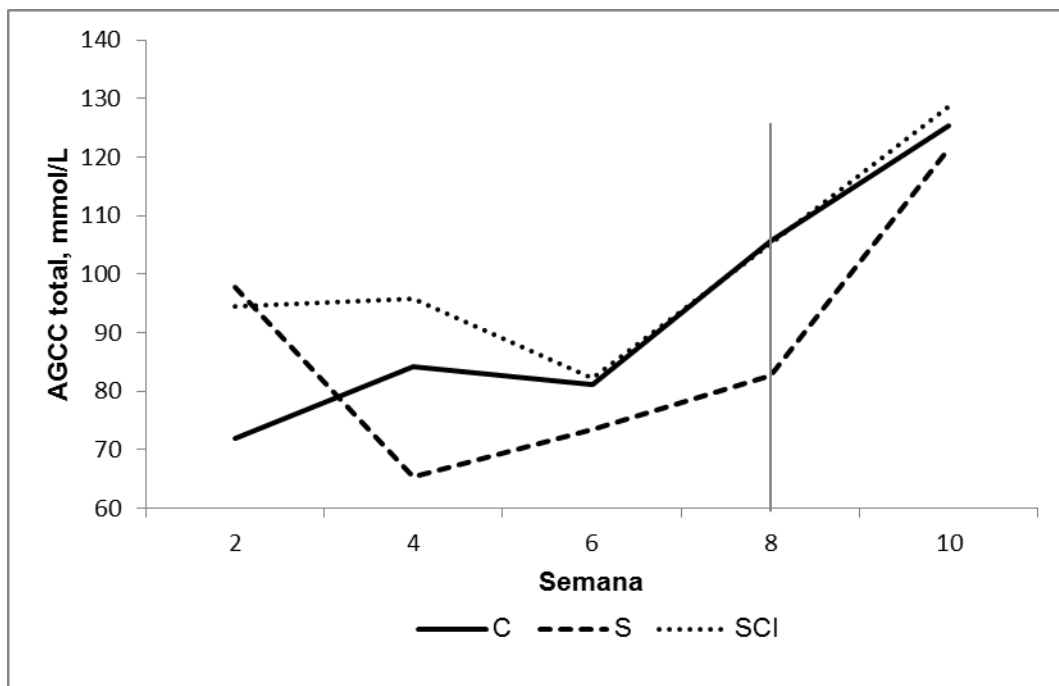


Figura 4.8 – Concentração molar de ácidos graxos de cadeia curta totais ($\mu\text{mol/mL}$) ao longo das semanas de bezerros suplementados com blend de óleos essenciais (C=controle; S=400mg/kg de OE no sucedâneo lácteo; SCI=200mg/kg de OE no sucedâneo lácteo e 200mg/kg no concentrado inicial)

Os principais ácidos graxos de cadeia curta, acetato, butirato e propionato, tiveram aumento significativo ($P < 0,0001$) após o desaleitamento na 8ª semana (Figura 4.9). Além disso, houve efeito significativo da idade para os ácidos isobutírico, ($P = 0,0249$) e valérico ($P < 0,0001$), assim como para a relação acetato: propionato ($P = 0,0030$). Antigamente pensava-se que o desenvolvimento ruminal acontecia devido ao atrito causado pela dieta sólida dentro do rúmen. Com a intensificação das pesquisas descobriu-se que os estímulos primários para o desenvolvimento do epitélio ruminal é químico e totalmente dependente da produção

de AGCC (COELHO et al., 2009), particularmente o ácido butírico e o propiônico, que são responsáveis pelo desenvolvimento das papilas ruminais.

Segundo Bergman (1990), até 70% da energia requerida pelos ruminantes pode ser suprida pelos AGCC. Costa et al. (2008), infundiram butirato no rúmen de bezerros recebendo diferentes dietas, e o número de papilas foi significativamente maior em comparação aos animais controle. Os autores ainda concluíram que o crescimento anatômico do compartimento aglandular foi induzido pela presença de AGCC, sem a necessidade de trabalho mecânico de digestão. Assim, é importante que a dieta destes animais resultem em adequadas concentrações de AGCC, de forma a estimular o desenvolvimento ruminal, mas sem alterar fortemente o seu pH a ponto de interferir no consumo de alimento. No presente trabalho, os aumentos nas concentrações de AGCC ocorreram em função do aumento no consumo de concentrado, sem efeito da suplementação com OE.

Resultados similares, em que os OE foram utilizados como modulares da fermentação, foram encontrados por Benchaar et al. (2006). Vacas leiteiras foram suplementadas com blend de OE (2g/d) contendo timol, eugenol e limoneno. Os ácidos graxos totais, acetato, propionato, butirato e a relação acetato: propionato não foram alteradas com a suplementação do blend de OE comercial. Em estudos posteriores, Benchaar et al. (2007) suplementaram vacas leiteiras com dose menor (0,75g/d) do mesmo blend de OE, não observando efeitos no perfil de fermentação ruminal. Aparentemente os óleos essenciais nas doses testadas não foram capazes de modular a fermentação ruminal.

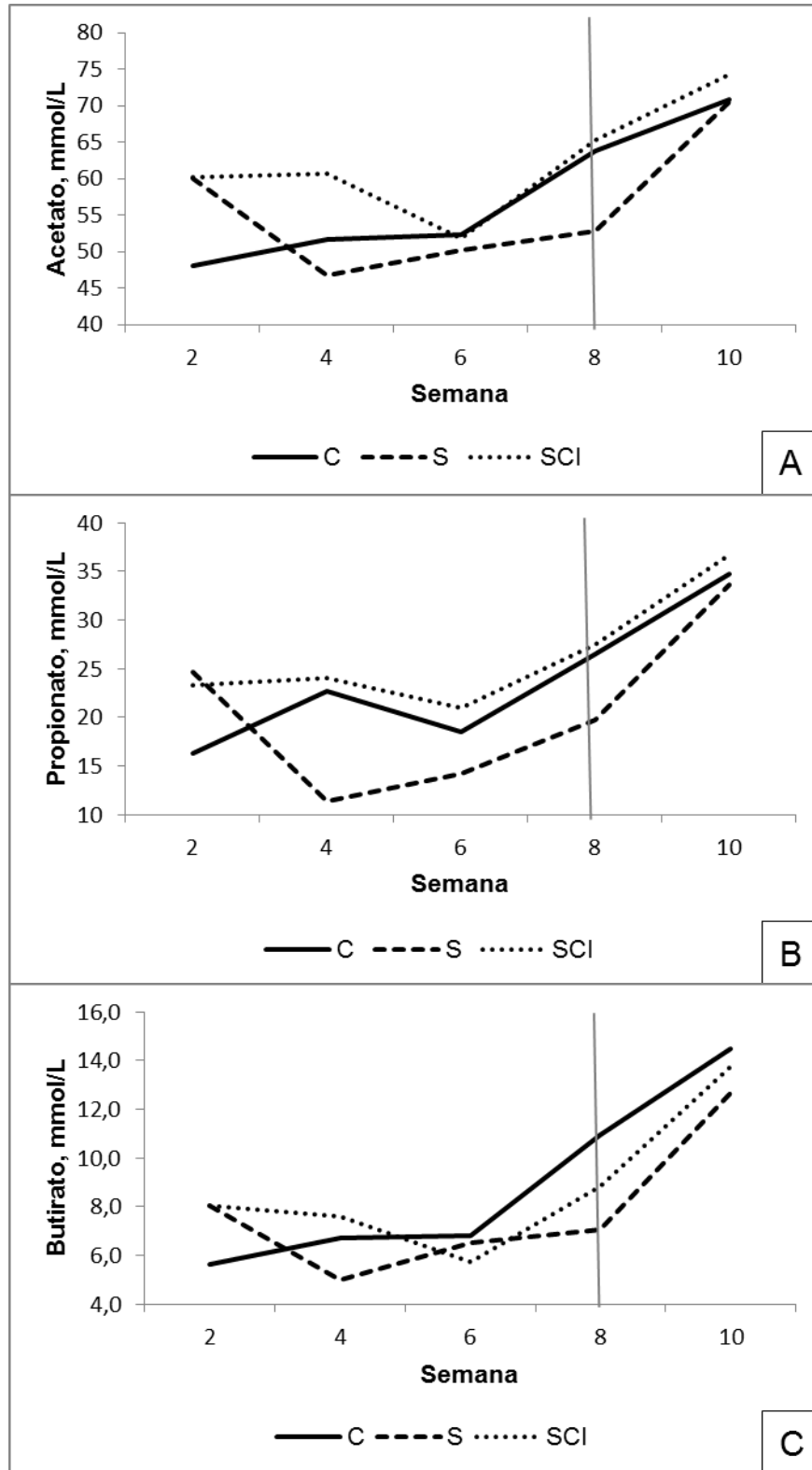


Figura 4.9 – Concentração molar dos ácidos acético (A), propiônico (B) e butírico (C) em $\mu\text{mol/mL}$ ao longo das semanas de bezerros suplementados com blend de óleos essenciais (C=controle; S=400mg/kg de OE no sucedâneo lácteo; SCI=200mg/kg de OE no sucedâneo lácteo e 200mg/kg no concentrado inicial)

Busquet et al. (2006) avaliaram a fermentação ruminal in vitro frente a diversos óleos essenciais individualmente, em variadas doses (0, 3, 30, 300 e 3.000 mg/L). O carvacrol, componente do blend de OE testado é um dos principais antimicrobianos utilizados no ambiente ruminal, e comprovou sua eficiência em modular a fermentação ruminal em algumas doses. O acetato reduziu sua concentração em 4% ($P < 0,05$) na dose de 300 mg/mL de carvacrol. Para o propionato a concentração reduziu em 7% para dose de 300 mg/mL e aumentou em 11% para a maior dose de carvacrol. Para o butirato, ocorreu o inverso, as concentrações aumentaram em 41% para dose de 300 mg/mL e reduziram em 10% para a maior dose de carvacrol. O cinamaldeído, óleo essencial extraído da canela, só modificou a concentração de propionato, na dose de 3.000 mg/L, as concentrações aumentaram em 9%. Por outro lado, o óleo de resina de pimenta não alterou nenhuma das concentrações dos AGCC do fluido ruminal. Os autores concluíram que em alguns casos, altas doses de alguns extratos de plantas resultaram em efeitos prejudiciais sobre a fermentação microbiana no rúmen, com a redução da concentração dos principais AGCC.

A relação acetato: propionato se comportou de forma diferente dos AGCC totais. Apesar de todos os AGCC aumentarem com o desenvolvimento do animal e, conseqüentemente, do rúmen, alguns deles aumentam em proporções maiores, como foi o caso do propionato. A relação entre o acetato e o propionato cai ao desaleitamento na 8ª semana (Figura 4.10) devido a um aumento em maior proporção do propionato do que do acetato, apesar de ambos terem aumentado após essa semana. O aumento do propionato está associado ao aumento do consumo de concentrado nessa ocasião. Ocorreu interação entre o tratamento e idade ($P = 0,0016$) para a relação acetato: propionato, no entanto, essa interação não ocorreu em uma mesma semana de vida dos animais em diferentes tratamentos.

As concentrações de $N-NH_3$ foram alteradas com a suplementação do blend de OE ($P < 0,05$). Os animais que receberam OE na dieta total (SCI) apresentaram maiores concentrações de N-amoniacoal que animais não suplementados ou suplementados somente via dieta líquida (Tabela 4.4). Resultados estes que discordam dos encontrados por Giannenas et al. (2011), onde as concentrações de $N-NH_3$ reduziram com a suplementação de OE.

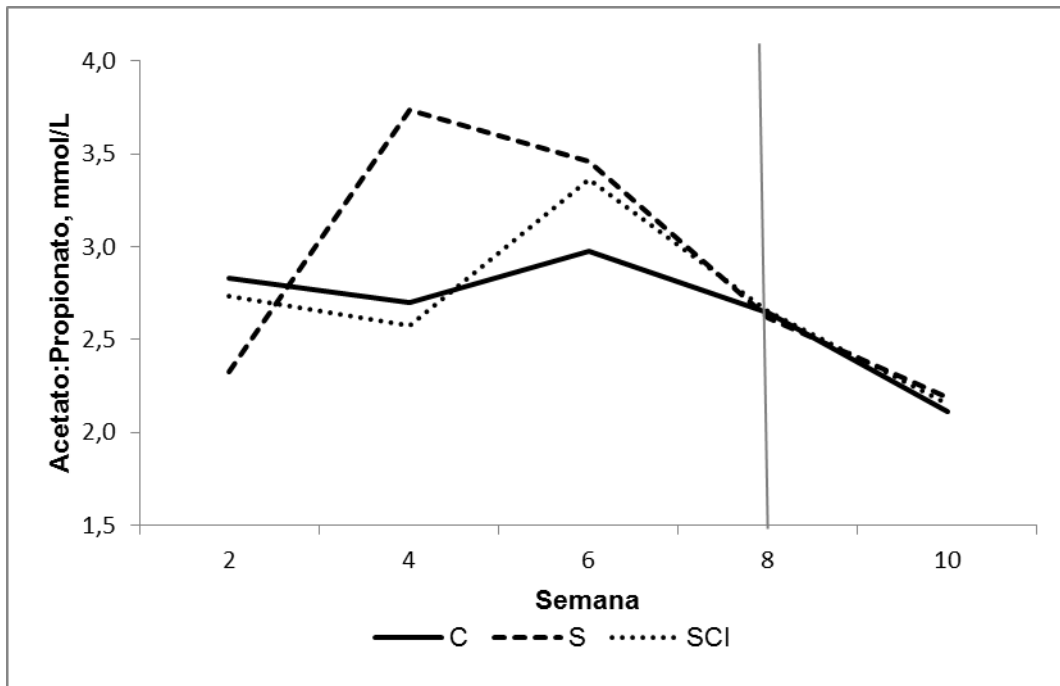


Figura 4.10 – Concentração molar da relação acetato: propionato ao longo das semanas de bezerros suplementados com blend de óleos essenciais (C=controle; S=400mg/kg de OE no sucedâneo lácteo; SCI=200mg/kg de OE no sucedâneo lácteo e 200mg/kg no concentrado inicial)

Os OE são reconhecidos por modular o metabolismo do nitrogênio no ambiente ruminal, reduzindo a desaminação e também a população de bactérias hiper produtoras de $N-NH_3$. Busquet et al. (2006) também avaliaram a concentração de nitrogênio amoniacal na fermentação ruminal *in vitro*, frente às mesmas doses de OE (0, 3, 30, 300 3.000 mg/kg). As concentrações de $N-NH_3$ reduziram significativamente com o aumento da dose testada (32,2 mg/dL para o grupo controle e 11,6 mg de N/100mL para a dose de 3.000mg/L).

Macheboeuf et al. (2008) realizaram estudos *in vitro* com variadas doses de OE em fluido ruminal de carneiros. A concentração de $N-NH_3$ variou dependendo da dose de OE infundida, no entanto a maioria apresentou redução da produção de $N-NH_3$. O cinamaldeído, óleo essencial de canela, foi o único responsável por elevar as concentrações de $N-NH_3$ na dose de 3 mM de OE. Os autores hipotetizaram que um número substancial de bactérias estava na fase estacionária, após as 16h de fermentação *in vitro*, e que o aumento na produção de nitrogênio amoniacal foi consequência da lise bacteriana. A concentração de $N-NH_3$ para o tratamento que recebeu OE na dieta total (SCI) estava alta desde a semana 2 e permaneceu alta

até o término do experimento na semana 10 em comparação aos demais tratamentos (Tabela 4.11).

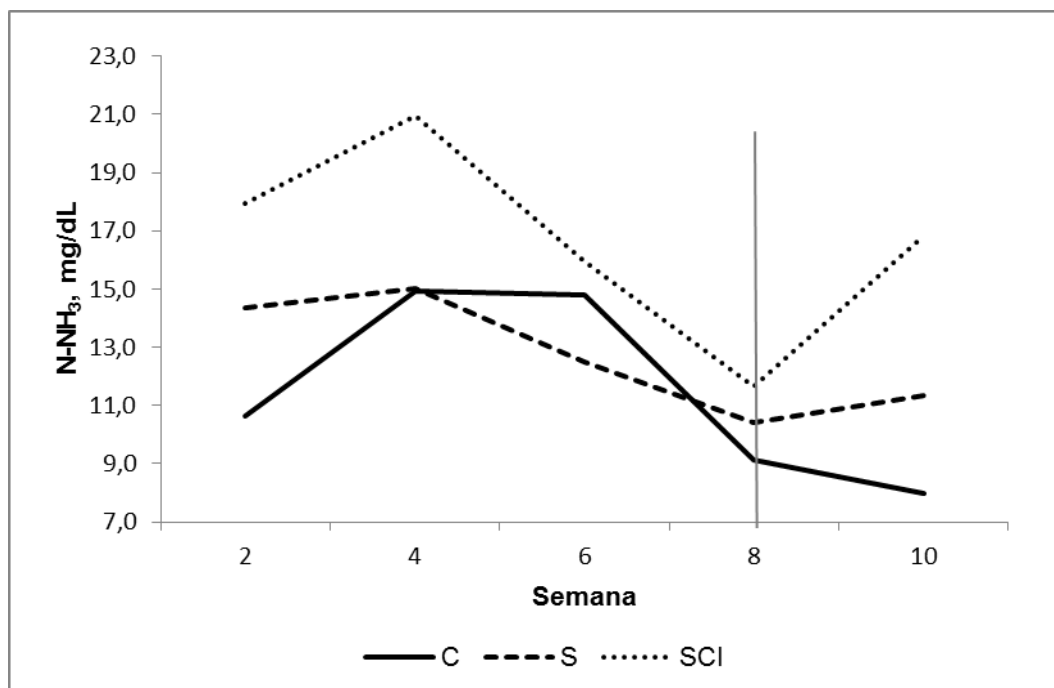


Figura 4.11 – Concentração ruminal de N-NH₃ (mg/dL) ao longo das semanas de bezerros suplementados com blend de óleos essenciais (C= controle; S=400mg/kg de OE no sucedâneo lácteo; SCI=200mg/kg de OE no sucedâneo lácteo e 200mg/kg no concentrado inicial)

Os microrganismos ruminais avaliados, bactérias celulolíticas, amilolíticas e protozoários não tiveram crescimento modificado pela adição de óleos essenciais na dieta dos bezerros (Tabela 4.5). O crescimento dos microrganismos ruminais também está associado ao consumo de concentrado (ANDERSON et al., 1987) e por sua vez a produção de ácidos. Em estudos realizados por Benchaar et al. (2007), com suplementação de OE para vacas leiteiras de alta produção, a contagem dos microrganismos ruminais se comportou de maneira semelhante aos dados observados no presente estudo. As bactérias celulolíticas não foram afetadas pela suplementação e mantiveram os valores de contagem semelhantes aos do grupo controle. O mesmo foi observado para a contagem de protozoários.

As bactérias celulolíticas e os protozoários apresentaram efeito significativo da idade dos animais ($P < 0,05$), ou seja, com o decorrer das semanas a contagem desses microrganismos foi modificada (Figura 4.12). Os protozoários aumentaram progressivamente, sendo que nas primeiras semanas, devido ao baixo consumo de concentrado, a contagem também foi inferior. A intensificação do crescimento

ocorreu após o desaleitamento dos animais, na 8ª semana. Os protozoários utilizam bactérias como principal fonte de aminoácidos e de ácidos nucléicos, sendo que o engolfamento é mais intenso em dietas ricas em grãos (OLIVEIRA; ZANINE; SANTOS, 2007).

Os microrganismos celulolíticos apresentaram oscilações nas contagens, sendo que com o aumento do consumo de alimento sólido a concentração desses microrganismos diminuiu. Isso provavelmente ocorreu devido à redução do pH, que interfere na viabilidade de crescimento de microrganismos que degradam fibra. Segundo Silveira et al. (2009), quando o pH atinge valores inferiores a 5,5 ou 5,0 o crescimento dos microrganismos celulolíticos e a digestão da fibra podem ser completamente inibidos.

Tabela 4.5 – Contagem microbiana de bactérias amilolíticas (log₁₀UCF/mL), celulolíticas (log₁₀UFC/mL) e protozoários (n^o/mL) de bezerros suplementados com blend de óleos essenciais

	Tratamentos ⁽¹⁾				P< ⁽³⁾		
	C	S	SCI	EPM ⁽²⁾	T	I	TxI
Amilolíticas, log 10 UFC/mL	3,92	3,98	3,94	0,160	0,9603	0,1376	0,2801
Celulolíticas, log 10 UFC/mL	4,11	3,95	3,98	0,112	0,4471	0,0055	0,1206
Protozoários, n^ox10⁴/mL	4,91	5,15	4,62	2,558	0,3246	<,0001	0,8214

⁽¹⁾ C= controle; S= 400 mg/kg de OE no sucedâneo lácteo; SCI= 200 mg/kg de OE no sucedâneo lácteo e 200 mg/kg de OE no concentrado inicial

⁽²⁾ EPM = erro padrão da média

⁽³⁾ T = efeito do tratamento; I = efeito da idade dos animais; T x I = efeito da interação tratamento e idade dos animais

O crescimento de bactérias amilolíticas foi consideravelmente constante ao longo das semanas, sendo que após o desaleitamento ocorreu uma ligeira queda do crescimento (Figura 4.12). Estes dados não estão de acordo com o que ocorreu no trabalho de Anderson et al. (1987), onde a proporção média das bactérias amilolíticas do total de bactérias anaeróbias tendeu a aumentar ao longo das semanas.

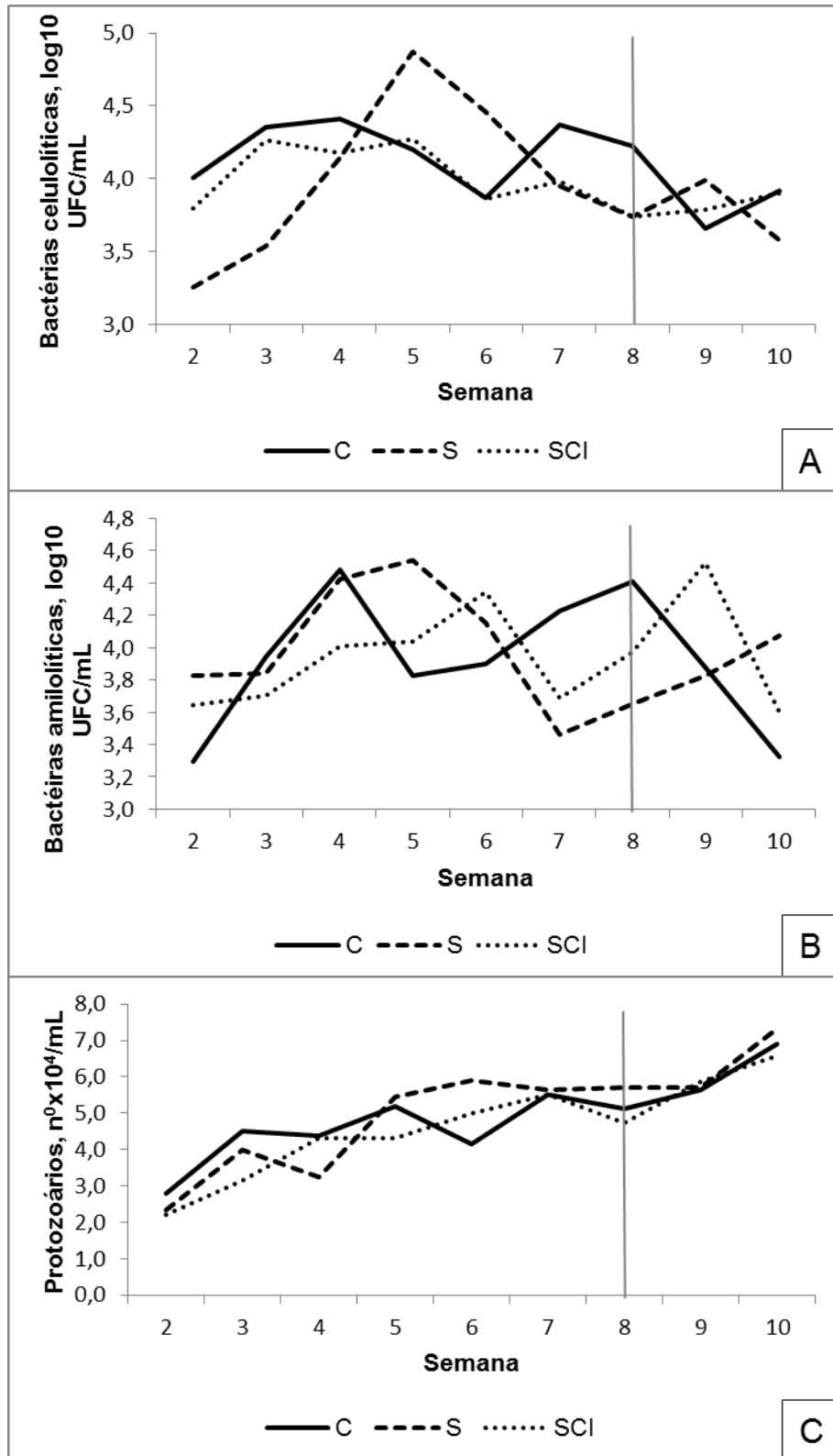


Figura 4.12 – Contagem de bactérias celulolíticas (log₁₀UFC/mL) (A), bactérias amilolíticas (log₁₀UFC/mL) (B) e protozoários (n°x10⁴/mL) (C) de bezerras suplementadas com blend de óleos essenciais (C= controle; S=400mg/kg de OE no sucedâneo lácteo; SCI=200mg/kg de OE no sucedâneo lácteo e 200mg/kg no concentrado inicial)

Segundo Beharka et al. (1998), os microrganismos amilolíticos são mais tolerantes as variações do pH e, portanto, não sofrem oscilações como as bactérias celulolíticas. Os autores testaram a forma física da dieta no desenvolvimento ruminal de bezerros leiteiros. A contagem dos microrganismos degradadores de amido foi maior para o tratamento do concentrado moído em comparação ao não moído. Apesar das diferenças entre os tratamentos a contagem de bactérias foi constante ao longo das semanas, semelhante ao ocorrido no presente estudo.

4.3 Parâmetros sanguíneos

Os valores médios dos parâmetros sanguíneos avaliados em bezerros suplementados com blend de OE estão apresentados na Tabela 4.6. Os perfis metabólicos são importantes para o monitoramento e diagnóstico de transtornos metabólicos, além de deficiências nutricionais. Alguns metabólitos diminuem de concentração à medida que os animais passam a se alimentar de alimento sólido, outros aumentam, sugerindo o desenvolvimento e amadurecimento do sistema digestório dos bezerros.

Tabela 4.5 – Hematócrito e concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL), proteínas totais (g/dL) e β -hidroxibutirato (mmol/L) de bezerros suplementados com blend de óleos essenciais

	Tratamentos ⁽¹⁾				P< ⁽³⁾		
	C	S	SCI	EPM ⁽²⁾	T	I	TxI
Hematócrito, %	20,25	19,95	21,05	0,616	0,3956	<,0001	0,9721
Glicose, mg/dL	107,21	105,74	102,93	6,062	0,8830	<,0001	0,1746
Proteína Total, g/dL	7,45	6,79	6,90	0,400	0,4427	0,0206	0,7631
BHBA, mmol/L	0,14	0,14	0,19	0,018	0,9257	<,0001	0,8258

⁽¹⁾ C= controle; S= 400 mg/kg de OE no sucedâneo lácteo; SCI= 200 mg/kg de OE no sucedâneo lácteo e 200 mg/kg de OE no concentrado inicial

⁽²⁾ EPM = erro padrão da média

⁽³⁾ T = efeito do tratamento; I = efeito da idade dos animais; T x I = efeito da interação tratamento e idade dos animais

Os valores médios de hematócrito, porcentagem de eritrócitos no sangue, não foram afetados pela suplementação com o blend de OE ($P>0,05$). Através das porcentagens de hematócrito é possível detectar anemia, quando os valores estão baixos (<18%), e também a desidratação, quando os valores estão altos (>46%),

segundo Jezek et al. (2011). Nas primeiras semanas os valores de hematócritos foram altos, em torno de 23-25%, mas com o avançar da idade dos animais esses valores foram reduzidos ($P>0,0001$), ficando próximo a valores de 18-20% (Figura 4.13). Todas as porcentagens de hematócrito estão de acordo com as encontradas na literatura (MARÇAL et al., 1995; JEZEK et al., 2011).

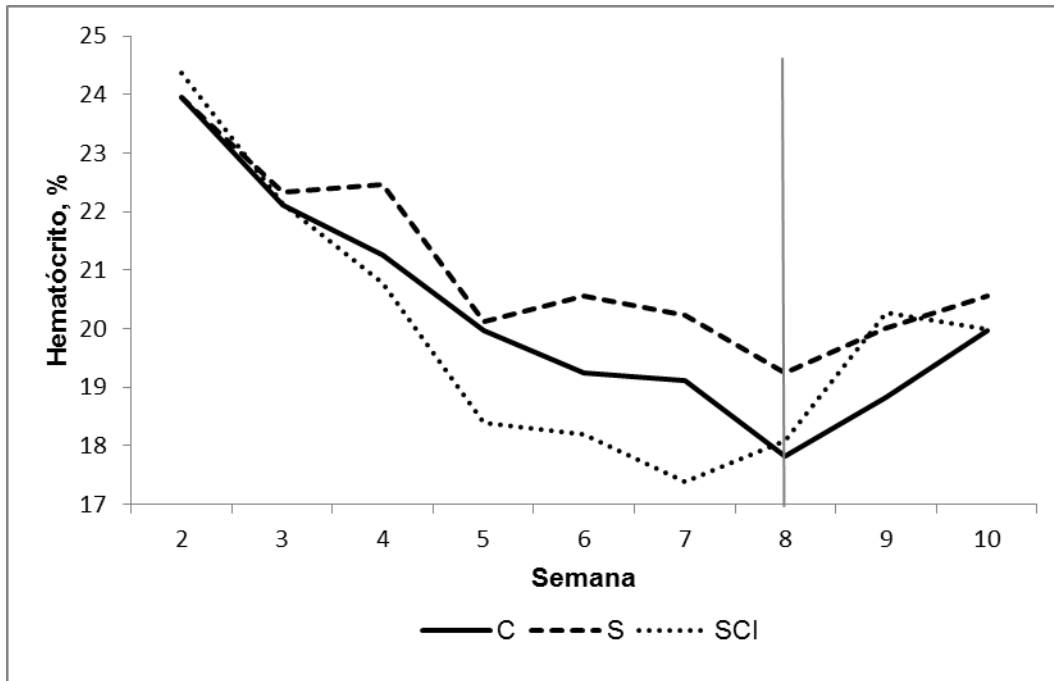


Figura 4.13 – Valores de hematócrito (%) de bezerros suplementados com blend de óleos essenciais (C=controle; S=400mg/kg de OE no sucedâneo lácteo; SCI=200mg/kg de OE no sucedâneo lácteo e 200mg/kg no concentrado inicial)

As concentrações plasmáticas de glicose não foram afetadas pela suplementação com os óleos essenciais ($P>0,5$). Os valores apresentados estão de acordo com a normalidade segundo a literatura (HUBER, 1969). Nas primeiras duas semanas de idade os bezerros exibem alta capacidade para utilização de glicose, afinal o rúmen não está desenvolvido e, portanto, os AGCC não são utilizados como principal fonte de energia. Além disso, a relação entre a disponibilidade da glicose e a sua utilização nos tecidos é maior quando os animais são alimentados com leite em comparação com aqueles alimentados com dieta sólida (HUBER, 1969).

Segundo Quigley (1991) os valores de glicose plasmática são maiores no período de aleitamento em comparação a fase de desaleitamento. As concentrações de glicose nas primeiras semanas foram altas, em torno de 100 a 140 mg/dL, mas a partir da semana 7 essa concentração se reduziu significativamente de 70 para 80

mg/dL (Figura 4.14). A partir do desaleitamento a principal fonte de energia dos bezerros advém dos AGCC produzidos pela microbiota ruminal estimulada pelo consumo de concentrado. Com isso ocorre a drástica queda das concentrações de glicose sanguínea dos bezerros.

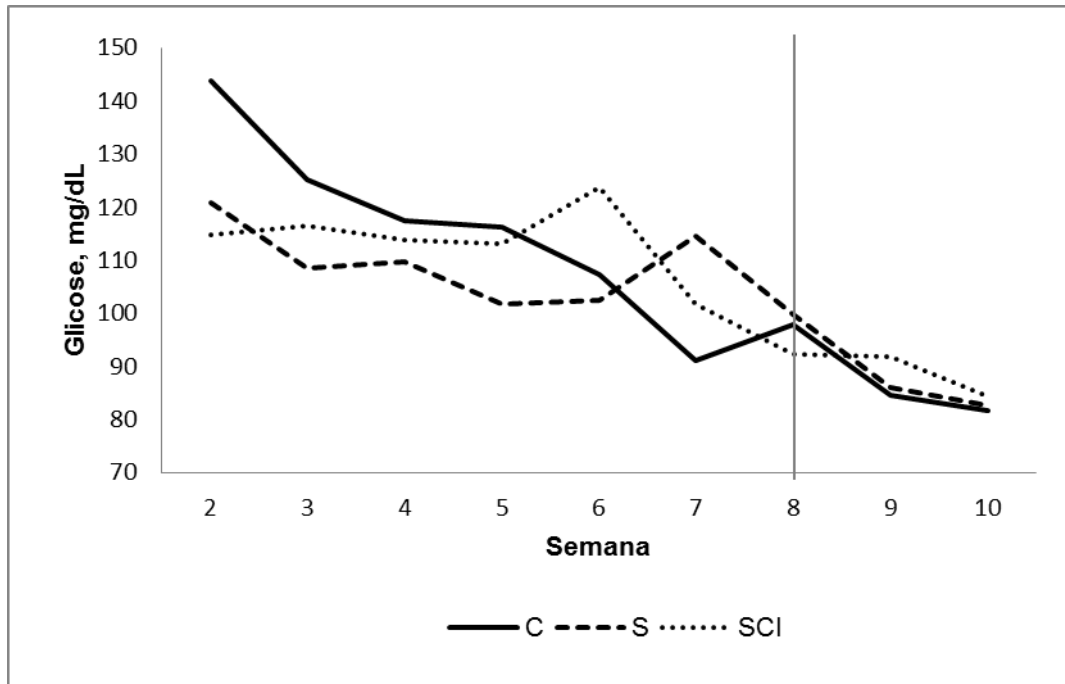


Figura 4.14 – Concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL) de bezerros suplementados com blend de óleos essenciais (C=controle; S=400mg/kg de OE no sucedâneo lácteo; SCI=200mg/kg de OE no sucedâneo lácteo e 200mg/kg no concentrado inicial)

As concentrações plasmáticas de proteína total não sofreram influência da suplementação com o blend de OE ($P > 0,05$). Os valores médios ficaram em torno de 6,5 a 7,5 g/dL, os quais estão dentro da normalidade para bovinos (LUCA; REIS, 2001). Contudo, houve efeito de idade ($P < 0,05$) para essa variável, gerando uma curva com comportamento flutuante, no entanto, bem demarcado ao desaleitamento, momento onde as concentrações de proteínas totais aumentam (Figura 4.15). A diminuição das proteínas totais no plasma está relacionada à deficiência nutricional, quando são descartadas causas patológicas (GONZÁLEZ et al., 2000). Portanto, conclui-se que os animais não passaram por deficiências nutricionais ao longo do experimento. Além disso, a proteína total é um efetivo parâmetro para descrever a eficiência da transmissão da imunidade passiva dos bezerros. Segundo Naylor et al. (1977) valores maiores que 6,0 g/dL indicam transferência satisfatória de imunidade

passiva, ao passo que valores menores que 5,0 g/dL indicam falhas nessa transferência.

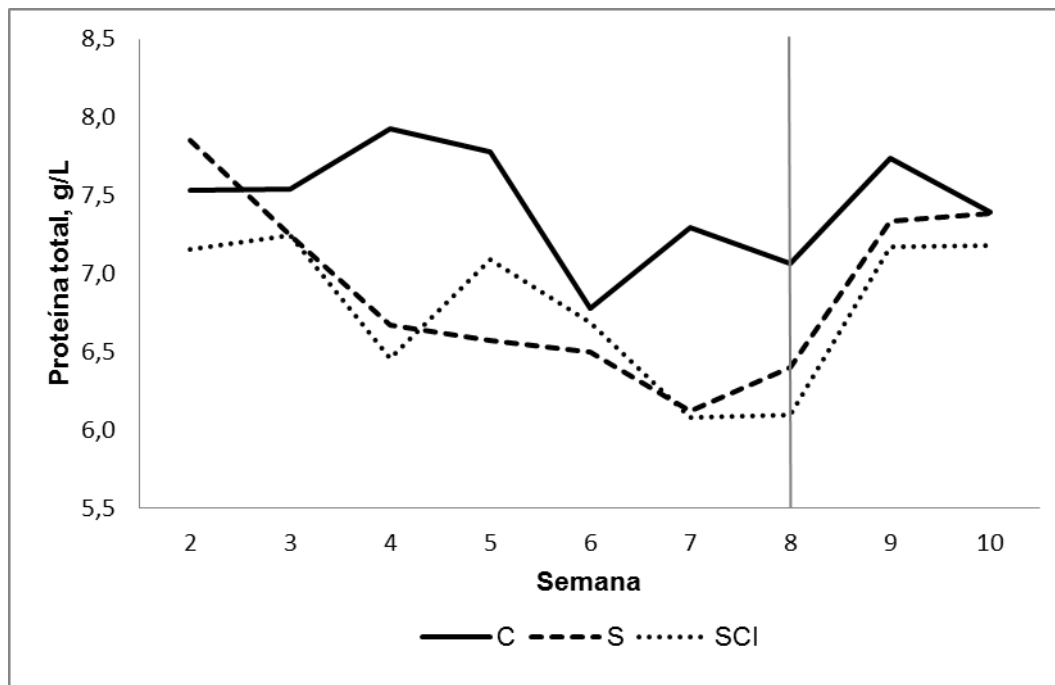


Figura 4.15 – Concentrações plasmáticas de proteína total (g/L) de bezerros suplementados com blend de óleos essenciais (C=controle; S=400mg/kg de OE no sucedâneo lácteo; SCI=200mg/kg de OE no sucedâneo lácteo e 200mg/kg no concentrado inicial)

As concentrações plasmáticas de β -hidroxibutirato não apresentaram diferença significativa em resposta a suplementação com blend de OE. Segundo Quigley e Bernard (1992) as concentrações plasmáticas de BHBA antes do desaleitamento são menores que 0,2 mmol/L, exatamente o que ocorreu no presente estudo. A fase de aleitamento é caracterizada por baixas concentrações de BHBA, a partir do momento em que o consumo de concentrado passar a ser expressivo as concentrações tendem a aumentar. O BHBA é o principal indicador sanguíneo de desenvolvimento ruminal. Ele está intimamente associado com o consumo de concentrado, que por sua vez aumenta a produção dos AGCC, principalmente o propionato e o butirato. Os corpos cetônicos são produzidos concomitantemente ao desenvolvimento ruminal. O aumento da produção de butirato faz com que este se torne o principal substrato para ser oxidado, gerando energia e aumentando os níveis de BHBA no sangue.

As concentrações de BHBA foram afetadas pela idade dos animais ($P < 0,0001$), sendo observado grande aumento na concentração de BHBA, de

aproximadamente 0,15mmol/L na semana 8 para 0,50 mmol/L na semana 10 (Figura 4.16), caracterizando o desenvolvimento ruminal desses animais por época do desaleitamento.

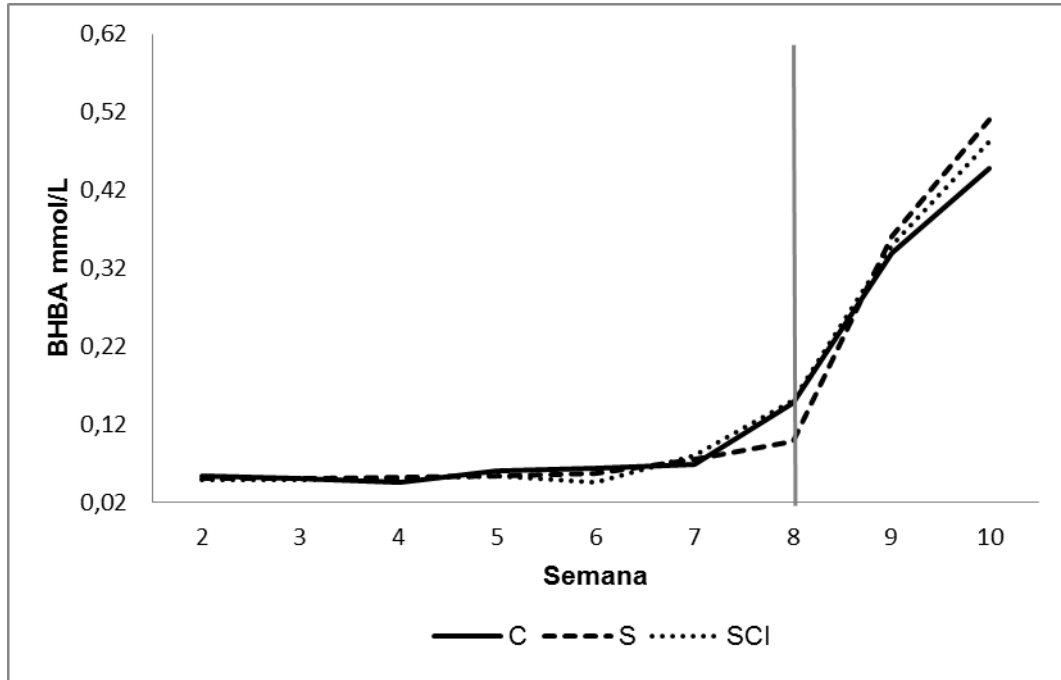


Figura 4.16 – Concentrações plasmáticas de BHBA (mmol/L) de bezerras suplementados com blend de óleos essenciais (C=controle; S=400mg/kg de OE no sucedâneo lácteo; SCI=200mg/kg de OE no sucedâneo lácteo e 200mg/kg no concentrado inicial)

5 CONCLUSÕES

A suplementação com os óleos essenciais nas doses e nas vias de fornecimento testadas não melhorou o desempenho dos bezerros, bem como não diminuiu os casos de diarreia. Contudo, a flora intestinal dos bezerros permaneceu praticamente todo o período experimental com microrganismos benéficos em maior contagem, levando a concluir que a suplementação com OE não prejudicou a população microbiana intestinal. Os parâmetros ruminais e sanguíneos também não foram modificados de forma a beneficiar o desempenho ou o desenvolvimento ruminal dos animais.

Os óleos essenciais apresentam-se como promissores substitutos dos antibióticos promotores de crescimento. No entanto, a dose e as vias de fornecimentos merecem maiores estudos, de forma que sejam alcançados maiores desempenho e saúde animal.

REFERÊNCIAS

ACAMOVIC, T.; BROOKER, J.D. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 64, p. 403-412, 2005.

ANDERSON, K.L.; NAGARAJA, T.G.; MORRILL, J.L.; AVERY, T.B.; GALITZER, S.J.; BOYER, J.E. Ruminant microbial development in conventionally or early-weaned calves. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 64, p. 1215-1226, 1987.

ANGIONI, A.; BARRA, A.; CORONEO, V.; DESSI, S.; CABRAS, P. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 4364-4370, 2006.

ARAUJO, R.C. **Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação ruminal in vitro**. 2010. 181 p. Tese (Doutorado em Ciência Animais e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

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

BAMPIDIS, V.A.; CHRISTODOULOU, V.; FLOROU-PANERI, P.; CHRISTAKI, E. Effect of dried oregano leaves versus neomycin in treating newborn calves with colibacillosis. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v. 53, p. 154-156, 2006.

BARTLETT, K.S.; MCKEITH, F.K.; VANDEHAAR, M.J.; DAHL, G.E.; DRACKLEY, J.K. Growth and body composition of dairy calves fed milk replacers containing different amounts of protein at two feeding rates. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 1454-1467, 2006.

BEHARKA, A.A.; NAGARAJA, T.G.; MORRILL, J.L.; KENNEDY, G.A.; KLEMM, R.D. Effects of form of the diet on anatomical, microbial, and fermentative development of the rumen of neonatal calves. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, p. 1946-1955, 1998.

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

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

BENCHAAR, 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**, Champaign, v. 90, p. 886-897, 2007.

BERGMAN, E.N. Energy contribution of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 70, p. 567-590, 1990.

BICKNELL, E.J.; NOON, T.H. **Neonatal calf diarrhea**. Disponível em: <<http://ag.arizona.edu/arec/pubs/rmg/4%20animalcare&healthmaintenance/25%20neonatalcalfdiarrhea93.pdf>>. Acesso em: 22 set. 2013.

BORCHERS, R. Proteolytic activity of rumen fluid in vitro. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 24, p. 1033-1038, 1965.

BUDDLE, J.R.; BOLTON, J.R. **The pathophysiology of diarrhea in pigs**. Disponível em: <http://assurance.redtractor.org.uk/rtassurance/farm/pigs/pg_about.eb>. Acesso em: 24 set. 1992.

BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. Screening for effects of plant extracts and secondary plant metabolites on rumen microbial fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123/124, p. 597-613, 2006.

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

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**, Champaign, v. 90, p. 2580-2595, 2007.

CAMPOS, F.P.; NUSSIO, C.M.B.; NUSSIO, L.G. **Métodos de análises de alimentos**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 135 p.

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

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 a continuous culture system. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 119, p. 29-41, 2005.

_____. Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.132, p. 186-201, 2007.

- CASTILLO, M.; MARTÍN-ORÚE, S.M.; ROCA, M.; MANZANILLA, E.G.; BADIOLA, I.; PEREZ, J.F.; GASA, J. The response of gastrointestinal microbiota to avilamycin, butyrate, and plant extracts in early-weaned pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 2725-2734, 2006.
- CHANEY, A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 8, p. 130-132, 1962.
- CHESTER-JONES, H.; STEINER, T.; WATKINS, M.; TAYLOR, D.; ZIEGLER, D.; RAETH-KNIGHT, M.; GOLOMBESKI, G. Pre- and post-weaning performance and health of calves fed milk replacers and calf starters with or without essential oils. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 88, suppl. 2, p. 421, 2010.
- COELHO, S.G.; GONÇALVES, L.C.; COSTA, T.C.; FERREIRA, C.S. Alimentação de bezerras leiteiras. In: GONÇALVES, L.C.; BORGES, I.; FERREIRA, P.D.S. **Alimentação de gado de leite**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2009. cap. 3, p. 50-67.
- COSTA, R.G.; FREITAS, C.R.G.; GALINDO, M.C.T.; SILVA, L.S. Alimentação de ovinos em regiões semiáridas do Brasil. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 4, n. 4, p. 233-241, 2010.
- COSTA, S.P.; PEREIRA, M.N.; MELO, L.Q.; RESENDE JR, J.C.; CHAVES, M.L. Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactato sobre a mucosa ruminal e a epiderme de bezerros. I. Aspectos histológicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, p. 1-9, 2008.
- COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, p. 564-582, 1999.
- COX, S.D.; MANN, C.M.; MARKHAM, J.L. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, p. 492-497, 2001.
- CURTIS, C.R.; SCARLETT, J.M.; ERB, H.N; WHITE, M.E. Path model of individual-calf risk factors for calfhooood morbidity and mortality in New York Holstein herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 6, p. 43-62, 1988.
- DAVIS, C.L.; DRACKLEY, J.K. **The development nutrition and management of the young calf**. Ames: Iowa State University Press, 1998, 339 p.
- DEHORITY, B.A. **Classification and morphology of rumen Protozoa**. Columbus: University of Ohio, 1977. 82 p.
- DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, p. 308-316, 2000.

DRACKLEY, J.K. Calf nutrition from birth to breeding. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 24, p. 55-86, 2008.

DRACKLEY, J.K.; BARTLETT, K.S.; BLOME, R.M. **Protein content of milk replacers and calf starters for replacement calves**. Disponível em: <http://traill.outreach.uiuc.edu/dairynet/paperDisplay.cfm?ContentetID=269>. Acesso em: 18 out. 2013.

DURMIC, Z.; BLACHE, D. Bioactive plants and plant products: effects on animal function, health and welfare. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 176, p. 150-162, 2012.

EADIE, J.M.; HOBSON, P.N.; MANN, S.O. A relationship between some bacteria, protozoa and diet in early weaned calves. **Nature**, London, v. 183, p. 624-625, 1959.

EVANS, J.D.; MARTIN, S.A. Effects of thymol on ruminal microorganisms. **Current Microbiology**, New York, v. 41, p. 336-340, 2000.

FERREIRA, L.S.; BITTAR, C.M.M. Performance and plasma metabolites of dairy calves fed starter containing sodium butyrate, calcium propionate or sodium monensina. **Animal Journal**, Cambridge, v.5, p. 239-245, 2011.

FRANÇOIS, A.C. Mode of action of antibiotics on growth. **World Review of Nutrition and Dietetics**, Basel, v. 3, p. 21-64, 1962.

FRANK, N.A.; KANEENE, J.B. Management risk factors associated with calf diarrhea in Michigan dairy herds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 1313-1323, 1992.

FRANZ, C.; BASER, K.H.C.; WINDISCH, W. Essential oils and aromatic plants in animal feeding: a European perspective. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 25, p. 324-340, 2010.

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 Dairy Science**, Champaign, v. 94, p. 5569-5577, 2011.

GONZÁLEZ, F.H.D.; CONCEIÇÃO, T.R.; SIQUEIRA, A.J.S.; LA ROSA, V.L. Variações sanguíneas de uréia, creatinina, albumina e fósforo em bovinos de corte no Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 20, p. 59-62, 2000.

GOSHE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, Oxford, v. 59, p. 257-268, 1987.

GREATHEAD, H. Plant and plant extract for improving animal productivity. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 62, p. 279-290, 2003.

- GREATHEAD, H.M.R.; FORBES, J.M.; BEAUMONT, D.; KAMEL, C. The effect of a formulation of natural essential oils used as an additive with a milk replacer and a compound feed on the feed efficiency of calves. In: BRITISH SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE, 2000, Midlothian. **Proceedings...** Penicuik: British Society of Animal Science 2000. p. 68.
- 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**, Chichester, v. 4, p. 322-332, 1999.
- HALL, M.B.; JENNINGS, J.P.; LEWIS, B.A.; ROBERTSON, J.B. Evaluation of starch analysis methods for feed samples. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 81, p. 17-21, 2000.
- HEINRICHS, A.J.; JONES, C.M.; HEINRICHS, B.S. Effects of mannan oligosaccharide or antibiotics in neonatal diets on health and growth of dairy calves. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 86, p. 4064-4069, 2003.
- HEINRICHS, A.J.; ERB, H.N.; ROGERS, G.W.; COOPER, J.B.; JONES, C.M. Variability in Holstein heifer heart-girth measurements and comparison of prediction equations for live weight. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 78, p. 333-338, 2007.
- HILL, T.M.; ALDRICH, J.M.; PROESCHEL, A.J.; SCHLOTTERBECK, R.L. Protein levels in calf starters. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 84, suppl. 1, p. 265, 2001.
- HILL, T.M.; ALDRICH, J.M.; SCHLOTTERBECK, R.L.; BATEMAN, H.G. Apex plant botanicals for neonatal calf milk replacers and starters. **The Professional Animal Scientist**, Champaign, v. 23, p. 521-526, 2007.
- HOFFMAN, P.C. Optimum body size of Holstein replacement heifers. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 75, p. 75:836-845, 1997.
- HUBER, J.T. Development of the digestive and metabolic apparatus of the calf. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 52, p. 1303-1315, 1969.
- JEREZ, J.A.; BRANDÃO, P.E.; BUZINARO, M.G.; GREGORI, F.; ROSALES, C.A.R.; ITO, F.H.; SAKAI, T. Detecção de rotavírus e coronavírus em fezes de bezerros neonatos com diarreia criados em vários municípios do estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, p. 19-23, 2002.
- JEZEK, J.; NEMEC, M.; STARRIC, J.; KLINKON, M. Age relates chances and reference intervals of haematological variables in dairy calves. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, Pulawy, v. 55, p. 471-478, 2011.
- KAWAKAMI, S.I.; YAMADA, T.; NAKANISHI, N.; CAI, Y. Feeding of lactic acid bacteria and yeast affects fecal flora of Holstein calves. **Journal Animal and Veterinary Advances**, Hong Kong, v. 10, p. 269-271, 2011.

KERTZ, A.F.; PREWITT, L.R.; EVERETT JR, J.P. An early weaning calf program: summarization and review. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 62, p. 1835-1843, 1979.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 41, p. 103–125, 1998.

KNAAK, N.; FIUZA, L.M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, São Leopoldo, v. 5, p. 120-132, 2010.

LARSON, L.L.; OWEN, F.G.; ALBRIGHT, J.L.; APPLEMAN, R.D.; LAMB, R.C.; MULLER, L.D. Guidelines toward more uniformity in measuring and reporting calf experimental data. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 60, n. 6, p. 989-991, 1977.

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T.M.; VAN SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 57, p. 347-358, 1996.

LORENZ, I. Influence of D-lactate on metabolic acidosis and on prognosis in neonatal calves with diarrhoea. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v. 51, p. 425-428, 2004.

LUCA, G.C.; REIS, B.F. Espectrofotometria de proteínas totais em plasma de sangue bovino por análise em fluxo. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, p. 251-256, 2001.

MACHEBOEUF, D.; MORGAVI, D.P.; PAPON, Y.; MOUSSET, J.L.; ARTURO-SCHAAN, M. Dose-response effects of essential oils on in vitro fermentation activity of the rumen microbial population. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, p. 335-350, 2008.

MAENNER, K.; VAHJEN, W.; SIMON, O. Studies on the effects of essential-oil-based feed additives on performance, ileal nutrient digestibility, and selected bacterial groups in the gastrointestinal tract of piglets. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 89, p. 2106-2112, 2011.

MAGALHÃES, H.; FREITAS, M.A.Q.; GONÇALVES, W.M.; SANTOS, J.A.; MEDEIROS, M.I.M.; COSTA, C.H.C.; VOLLU, E.W. Ocorrência, aspectos bacteriológicos e histopatológicos na colibacilose de bezerros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 555-564, 1991.

MAGALHÃES, V.J.A.; SUSCA, F.; LIMA, F.S.; BRANCO, A.F.; YOON, I.; SANTOS, J.E.P. Effect of feeding yeast culture on performance, health, and immunocompetence of dairy calves. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 91, p. 1497-1509, 2008.

MANZANILLA, E.G.; PEREZ, J.F.; MARTIN, M.; KAMEL, C.; BAUCCELLS, F.; GASA, J. Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, p. 3210-3218, 2004.

MANZANILLA, E.G.; PÉREZ, J.F.; MARTÍN, M.; BLANDÓN, J.C.; BAUCCELLS, F.; KAMEL, C.; GASA, J. Dietary protein modifies effect of plant extracts in the intestinal ecosystem of the pig at weaning. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, p. 2029-2037, 2009.

MANZANILLA, E.G.; NOFRARÍAS, M.; ANGUITA, M.; CASTILLO, M.; PEREZ, J.F.; MARTÍN-ORÚE, S.M.; KAMEL, C.; GASA, J. Effects of butyrate, avilamycin, and a plant extract combination on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 2743-2751, 2006.

MARÇAL, W.S.; BIRGEL, E.H.; D'ANGELINO, J.K.; MIGUEK, O. Avaliação cronológica da variação no volume globular sanguíneo de bovinos leiteiros. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, p. 239-243, 1995.

MARIANO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 67, p. 187-195, 2001.

MASOTTI, V.; JUTEAU, F.; BESSIERE, J.M.; VIANO, J. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 7115-7121, 2003.

MATHLOUTHI, N.; BOUZAIENNE, T.; OUESLATI, I.; RECOQUILLAY, F.; HAMDY, M.; URDACI, M.; BERGAOUI, R. Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: In vitro antimicrobial activities and effects on growth performance. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 90, p. 813-823, 2012.

MEYER, N.F.; ERICKSON, G.E.; KLOPFENSTEIN, T.J.; GREENQUIST, M.A.; LUEBBE, M.K.; WILLIAMS, P.; ENGSTROM, M.A. Effect of essential oils, tylosin, and monensin on finishing steer performance, carcass characteristics, liver abscesses, ruminal fermentation, and digestibility. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 87, p. 2346-2354, 2009.

MILLEMANN, Y. Diagnosis of neonatal calf diarrhea. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Toulouse, v. 160, p. 404-409, 2009.

NAYLOR, J.M.; KRONFELD, D.S.; BECH-NIELSEN, S.; BAERTHOLOMEW, R.C. Plasma total protein measurement for prediction of disease and mortality in calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 171, p.635-638, 1977.

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**, Amsterdam, v. 114, p. 105-112, 2004.

OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION. Regulation (EC) N°1831/2003 of the European Parliament and Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. **Official Journal of the European Union**, L268, p. 29-43, 2003.

Disponível em:

<http://eurex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L2003:268:0029:0043:EN:pdf>. Acesso em: 23 out. 2013.

OLIVEIRA, J.S.; ZANINE, A.M.; SANTOS, E.M. **Diversidade microbiana no ecossistema ruminal**. Disponível em:

<<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060607/060703.pdf>> Acesso em: 21 out. 2013.

OWEN, F.G.; JACOBSON, N.L.; ALLEN, R.S.; HOMEYER, P.G. Nutritional factors in calf diarrhea. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 41, p. 662-670, 1958.

PATRA, A.K. Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, Seoul, v. 6, p. 416-428, 2011.

PINOS-RODRÍGUEZ, J.M.; ROBINSON, P.H.; ORTEGA, M.E.; BERRY, S.L.; MENDOZA, G.; BARCENA, R. Performance and rumen fermentation of dairy calves supplemented with *Saccharomyces cerevisiae* 1077 or *Saccharomyces boulardii* 1079. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.140, p.223-233, 2008.

QUIGLEY, J.D.; BERNARD, J.K. Effects of nutrient source and time of feeding on changes in blood metabolites in young calves. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, p. 1543-1549, 1992.

QUIGLEY, J.D.; CALDWELL, L.A.; SINKS, G.D. Changes in plasma volatile fatty acids in response to weaning and feed intake in young calves. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, p. 258-263, 1991.

SILVEIRA, R.N.; BERCHIELLI, T.T.; CANESIN, R.C.; MESSANA, J.D.; FERNANDES, J.J.R. PIRES, A.V. Influência do nitrogênio degradável no rúmen sobre a degradabilidade in situ, os parâmetros ruminais e a eficiência de síntese microbiana em novilhos alimentados com cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, p. 570-579, 2009.

SOYLU, S.; YIGITBAS, H.; SOYLU, E.M.; KURT, S. Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 103, p. 1021-1030, 2007.

SPANGHERO, M.; ZANFI, C.; FABBRO, E.; SCICUTELLA, N.; CAMELLINI, C. Effect of milk replacers added with microencapsulated organic acids or essential oils on the performance of weaning calves. **Italian Journal of Animal Science**, Bologna, v. 6, suppl. 1, 2007.

TAMATE, H.; MCGILLIAR, A.D.; JACOBSON, N.L.; GETTY, R. Effect of various dietaries on the anatomical development of the stomach in the calf. **Journal of Dairy Science**, v. 45, p. 408-420, 1962.

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

TROUILLAS, P.; CALLISTE, C.A.; ALLAIS, D.P.; SIMON, A.; MARFAK, A.; DELAGE, C.; DOUROUX, J.L. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the *Limousin countryside* as herbal teas. **Food Chemistry**, London, v. 80, p. 399-407, 2003.

ULTEE, A.; BENNIK, 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**, Washington v. 68, p. 1561-1568, 2002.

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

UNITED STATES. Department of Agriculture. **NAHMS-National Animal Health Monitoring System, 2011**: an overview of operations that specialize in raising dairy heifers. Washington, 2011. 150 p. (Dairy, 2011).

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

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

WALLACE, R.J.; MCEWAN, N.R.; MCINTOSH, F.M.; TEFEREDEGNE, B.; NEWBOLD, C.J. Natural products as manipulators of rumen fermentation. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, Seoul, v. 15, p. 1458-1468, 2002.

WANAPAT, M.; CHERDTHONG, A.; PAKDEE, P.; WANAPAT, S. Manipulation of rumen ecology by dietary lemongrass (*Cymbopogon citratus Stapf.*) powder supplementation. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. 3497-3503, 2008.

WEISS, W.P. Predicting energy values of feeds. In SYMPOSIUM: PREVAILING CONCEPTS IN ENERGY UTILIZATION BY RUMINANTS. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 1802-1811, 1993