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

Adição de óleos essenciais e algas marinhas calcárias em dietas para vacas no
terço final de lactação

Andrés Nelsis Oscar Navarro

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

Piracicaba
2018

Andrés Nelsis Oscar Navarro
Médico Veterinário

**Adição de óleos essenciais e algas marinhas calcárias em dietas para vacas no terço final
de lactação**

versão revisada de acordo com a com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **FLÁVIO AUGUSTO PORTELA SANTOS**

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

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Navarro, Andres Nelsis Oscar

Adição de óleos essenciais e algas marinhas calcárias em dietas para vacas no terço final de lactação / Andrés Nelsis Oscar Navarro. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

55 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Aditivos 2. Algas marinhas 3. Óleos essenciais 4. Tamponantes L. . I.
Título

DEDICATORIA

Ao meu sobrinho, Sebastián...

AGRADECIMENTOS

A minha família por ter me dado apoio nas minhas escolhas apesar de terem me levado a lugares distantes dela.

A minha namorada, Mariana, por ter me dado força e amor durante esta difícil conquista.

Ao Mauricio, Ludmila e T-kiero por terem madrugado tantos dias para me ajudar na difícil tarefa de realizar um experimento com vacas em lactação.

Ao Prof. Dr. Flávio Augusto Portela Santos por seus ensinamentos e por depositar sua confiança em uma pessoa de outra cultura e me permitir realizar um trabalho científico sob sua orientação.

Ao Wagner, Neko e Elvis por ter me ajudado a realizar os trabalhos e cuidar dos animais da fazenda.

Aos pós-graduando do grupo de pesquisa Nutribov: Farelo, Maria Erika, Camila, Anzor, Titaniq e Lilão, pela colaboração tanto nos experimentos como nas disciplinas e sobre tudo pela companhia.

Aos estagiários do grupo Nutribov por ajudarem nas laboriosas coletas.

A Gustavo, Tchitchola, Pedro, Daniel, Xena, Zé Paulo por compartilharem seus conhecimentos e experiências comigo.

À Prof^a. Dra. Carla Maris Bittar e ao Prof. Dr. Alexandre Vaz Pires por abrirem as portas dos seus laboratórios e brindar seus conhecimentos.

À ESALQ pelo elevado nível de ensino brindado por um excelente corpo docente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa regular de mestrado.

EPÍGRAFE

Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o Céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe.

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO	13
2.1. ÓLEOS ESSENCIAIS E ÓLEOS FUNCIONAIS.....	13
2.1.1. <i>Óleos funcionais da mamona, caju e copaíba</i>	14
2.1.2. <i>Mecanismos de ação dos principais óleos funcionais</i>	15
2.1.3. <i>Dados experimentais de metabolismo</i>	15
2.1.4. <i>Desempenho animal</i>	16
2.2. ALGAS MARINHAS CALCÁRIAS NA PRODUÇÃO LEITEIRA	17
3. MATERIAIS E METODOS	19
3.1. ANIMAIS, DELINEAMENTOS E TRATAMENTOS	19
3.2. MANEJO DA PASTAGEM E VARIÁVEIS RELACIONADAS	20
3.3. PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE.....	21
3.4. CONSUMO E DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES.....	21
3.4.1. <i>Produção fecal e consumo</i>	21
3.5. ANÁLISES QUÍMICAS.....	22
3.6. COLETA DE SANGUE	23
3.7. PESAGEM DOS ANIMAIS, ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E EFICIÊNCIA DE PRODUÇÃO	23
3.8. VARIÁVEIS RUMINAIS (EXPERIMENTO 2)	24
3.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1. AMBIENTE	27
4.1.1. <i>Pastagem</i>	28
4.2. DESEMPENHO PRODUTIVO	30
4.2.1. <i>Consumo</i>	30
4.2.2. <i>Digestibilidade</i>	33
4.2.3. <i>Peso vivo, Condição corporal e Metabólitos sanguíneos</i>	34
4.2.4. <i>Produção e composição do Leite</i>	35
4.2.5. <i>Balanço Energético</i>	37
4.3. PARÂMETROS RUMINAIS	38
4.3.1. <i>Ácidos graxos voláteis no rúmen</i>	38
4.3.2. <i>pH ruminal</i>	39
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
REFERÊNCIAS	43

RESUMO

Adição de óleos essenciais e algas marinhas calcárias em dietas para vacas no terço final de lactação

As algas marinhas calcárias (AMC) e os óleos essenciais vêm sendo utilizados como aditivos em dietas para ruminantes. As AMC têm sido adicionadas às dietas com o objetivo de modular o pH ruminal, enquanto os óleos essenciais, através de sua ação antimicrobiana, têm sido testados como alternativa aos aditivos antibióticos na produção animal. Os objetivos do presente estudo foram avaliar os efeitos de óleos essenciais e de algas marinhas calcárias (AMC), bem como a combinação de ambos, sobre desempenho e ambiente ruminal de vacas leiteiras em lactação. Foram realizados 2 experimentos com 32 vacas leiteiras sob sistema de pastejo rotativo com suplementação diária de 6 kg de alimento concentrado por vaca: o experimento 1 foi de desempenho e o experimento 2 de metabolismo ruminal. Em ambos os experimentos as vacas foram submetidas aos seguintes tratamentos: a) controle (CONT); b) óleos essenciais (OE); c) algas marinhas calcárias (AMC); d) AMC + OE. No experimento 1, as variáveis registradas foram consumo, produção e composição do leite, ganho de peso, condição corporal e parâmetros sanguíneos (glicose e ácidos graxos não esterificados [AGNE]). No experimento 2 foram utilizadas as mesmas 32 vacas em lactação para avaliação dos parâmetros ruminais. Os delineamentos utilizados foram: em quadrados latinos replicados (experimento 1) e em blocos inteiramente casualizados (experimento 2). No experimento 1 o CMS de pasto e os CMS e CMO totais foram maiores para o tratamento AMC em comparação com os tratamentos OE e OE+AMC. Os dados de consumo do tratamento CONT foram não diferiram dos demais tratamentos. As digestibilidades da MS e da MO foram maiores para os tratamentos OE e OE+AMC em comparação com o tratamento AMC. Os dados de digestibilidade do tratamento CONT não diferiram dos demais tratamentos. O escore de condição corporal médio foi maior para o tratamento OE em comparação com os demais, porém os aditivos testados não afetaram as concentrações sanguíneas de AGNE e de glicose. Os dados de produção e de composição do leite não foram afetados pelos aditivos testados, assim como os dados de concentração de energia das dietas, consumo de energia, secreção de energia no leite e eficiência de conversão da energia consumida em energia láctea. No experimento 2, a suplementação com OE aumentou a concentração molar de AGV totais e a de acetato em comparação com os tratamentos CONT e AMC, com valores intermediários e não diferentes para o tratamento OE+AMC. Houve aumento do pH ruminal no tratamento AMC em comparação com o tratamento OE. A inclusão de óleos essenciais e ou algas marinhas não alterou a resposta produtiva de vacas leiteiras, apesar do aumento na concentração de AGV e de pH ruminal respectivamente.

Palavras-chave: Aditivos; Algas marinhas; Óleos essenciais; Tamponantes

ABSTRACT

Addition of essential oils and calcareous marine algae in diets of dairy cows during late lactation

Essential oils (OE) and calcareous marine algae (AMC) are being used in ruminants diets. The AMC has been added to diets with the purpose of regulating the ruminal pH while the OE, due to their antimicrobial properties, had been tested as an alternative to the antibiotic additives used in animal production. The objectives of the current study were to evaluate the effects of OE and AMC as well as their interaction on performance and ruminal environment of lactating dairy cows. Two experiments with 32 cows were developed. The animals were in a rotational grazing system supplemented with 6 kg per cow of concentrate feed. Experiment 1 was designed to evaluate performance whereas experiment 2 for ruminal metabolism. During both experiments, cows were assigned to the followings treatments: a) control (CONT); b) blend of essential oils (OE); calcareous marine algae (AMC); d) AMC+OE. In experiment 1, the registered variables were intake, yield and milk composition, live weight, body condition score and blood parameters (glucose and non-esterified fatty acids, [NEFA]). In experiment 2 the same 32 lactating cows were used to evaluate ruminal parameters. The statistical designs used were: replicated Latin square (experiment1) and randomized complete block design (experiment 2). In experiment 1, grass and total DM and OM intakes were increased in AMC compared to OE and OE+AMC. The intakes observed for CONT did not differ from the other treatments. Digestibility of DM and OM were higher for OE and OE+AMC compared to AMC. Digestibility of CONT did not differ from other treatments. The average BCS was higher for OE, however the tested additives did not affect blood concentration of NEFA and glucose. Milk yield and composition were not affected by additives inclusion as well as energy concentration in diets, energy intake, secreted energy in milk and energy conversion efficiency. In experiment 2, OE increased molar concentration of acetate and total VFA when compared to CONT and AMC, but not differed from OE+AMC. The AMC increased ruminal pH when compared to OE. The inclusion of essential oils and/or calcareous marine algae did not alter the productive response of lactating dairy cows, even though there was an increase in VFA concentration and ruminal pH.

Keywords: Additives; Marine algae; Essential oils; Buffers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias metabólicas de biossínteses dos principais compostos ativos nos extratos de plantas..	14
Figura 2. Evolução diária das variáveis ambientais durante o período experimental.....	28
Figura 3. Massa de forragem dos pastos ao longo do período experimental.	29
Figura 4. Variação da estrutura do dossel forrageiro durante o período experimental.	29
Figura 5. Variação de escore corporal e concentração de ácidos graxos não esterificados em plasma sanguíneo durante período experimental.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proporção dos ingredientes e composição química da forragem e do concentrado base.	20
Tabela 2. Parâmetros ambientais durante o período experimental.	27
Tabela 3. Consumo e digestibilidade aparente de vacas suplementadas com aditivos de algas marinhas e/ou óleos essenciais mantidas em pastagem tropical.	31
Tabela 4. Metabólitos sanguíneos, peso e escore corporal de vacas suplementadas com aditivos de algas marinhas e/ou óleos essenciais mantidas em pastagem tropical.	34
Tabela 5. Produção e composição do leite de vacas suplementadas com aditivos de algas marinhas calcárias e/ou óleos essenciais mantidas em pastagem tropical.	36
Tabela 6. Consumo de energia líquida de lactação (ELL), ELL secretada por kg de leite, ELL secretada no leite por dia e eficiência de vacas suplementadas com aditivos de algas marinhas calcárias e/ou óleos essenciais mantidas em pastagem tropical.	37
Tabela 7. Concentração de ácidos graxos voláteis, amônia e pH no líquido ruminal de vacas suplementadas com aditivos de algas marinhas calcárias e/ou óleos essenciais mantidas em pastagem tropical.	38

1. INTRODUÇÃO

Forragens tropicais, mesmo quando os pastos são bem manejados, possuem concentrações de FDN superiores a 50% (pastejo simulado) e partículas com baixa fragilidade (Santos et al., 2014), fatores predisponentes para o enchimento ruminal e consequente limitação de consumo de vacas leiteiras em sistemas intensivos de produção de leite em pastagens (Allen, 1997). Logo, suplementos concentrados são incluídos na dieta para incrementar o consumo de energia a níveis superiores àqueles atingidos com dietas baseadas exclusivamente em pastagens (Peyraud e Delaby, 2001; Stockdale, 2000b). Suplementos concentrados também permitem aumentar a lotação animal de sistemas intensivos de produção de leite em pastagens, em virtude do efeito substitutivo que causam quando fornecidos em grandes quantidades ou em combinação com pastagens de alta qualidade. Maior produção por vaca associada à maior lotação dos pastos resulta em aumento expressivo da produção de leite por área de pasto (Santos et al., 2014).

Normalmente, o concentrado é fornecido durante ou após a ordenha da manhã e durante ou após a ordenha da tarde, ou seja, logo antes dos picos de pastejo da manhã e do anoitecer. Devido ao acúmulo de produtos da fermentação, o ambiente ruminal sofre variações importantes de pH, que podem comprometer os processos fisiológicos da flora microbiana, modificar o perfil dos ácidos graxos voláteis, produzir quedas no consumo diário de matéria seca e produção de leite e também prejudicar o bem estar animal. Portanto, sob estas condições de produção, os moduladores do pH e da fermentação ruminal podem constituir em ferramentas eficazes para evitar alterações abruptas no meio ruminal, que poderiam comprometer o desempenho dos ruminantes.

Substâncias tamponantes ou alcalinizantes, como algas marinhas calcárias, adicionadas à dieta de ruminantes, poderiam moderar as rápidas variações no pH, porém, ainda são escassos os trabalhos que avaliaram este aditivo. A alga marinha calcária é um termo genérico que designa várias espécies de algas vermelhas calcificadas, nas quais ocorre um pigmento rosa fotossinteticamente ativo na forma viva do organismo (Lee, 1999). Este aditivo é composto principalmente por carbonato de cálcio em três estruturas cálcicas diferentes: calcita (65%), aragonita (23%) e vaterita (12%). As algas marinhas calcárias possuem Ca (300g/kg), Mg (55 g/kg), K (7 g/kg), Fe (800 mg/kg), P (500 mg/kg), Mn (50 mg/kg), I (30 mg/kg), Cu (10 mg/kg), Zn (10 mg/kg), B (10mg/kg), Mo (0,2 mg/kg), Se (1,8 mg/kg), e Co (0,1 mg/kg), segundo Celtic Sea Minerals (2014). A dissociação dos sais minerais pode aumentar o pH e aumentar a disponibilidade destes no líquido ruminal criando um ambiente favorável para o desenvolvimento da flora microbiana.

A alteração das vias fermentativas mediante a seleção microbiana também se apresenta como possível ferramenta para controle do ambiente ruminal. Atualmente, os antibióticos ionóforos são o exemplo de aditivo mais utilizado com o intuito de selecionar populações microbianas mais eficientes na fermentação de carboidratos não estruturais, aumentar a população de bactérias capazes de metabolizar o ácido láctico e diminuir algumas populações de bactérias Gram + capazes de produzir ácido láctico. Os ionóforos têm potencial de reduzir perdas energéticas e proteicas no rúmen (Van Nevel e Demeyer, 1988, em Calsamiglia et al., 2007). No entanto, as autoridades reguladoras de países desenvolvidos têm limitado cada vez mais a utilização de tais antibióticos nas dietas de animais destinados à produção de alimentos (European Commission, 2003). Assim, os óleos essenciais têm sido estudados como alternativas aos antibióticos para modular a fermentação ruminal. O principal mecanismo de ação dos óleos essenciais é alterar a permeabilidade seletiva da membrana microbiana como os antibióticos ionóforos, porém não é o único mecanismo, outros mecanismos potenciais são a denaturação de proteínas celulares ou interações com ácidos

nucleicos (Calsamiglia et al., 2007). A composição química particular em cada mistura de óleos essenciais resulta em diferentes mecanismos de ação e na seleção de diferentes populações bacterianas, exigindo mais pesquisas sobre as diferentes misturas.

Em base à revisão apresentada as hipóteses do trabalho são que a inclusão de OE e AMC incrementaria o pH ruminal, aumentaria o consumo de MS, melhoraria na conversão alimentar, incrementaria a produção diária de leite e favoreceria a recuperação de PV e condição corporal. Porém são poucos os trabalhos que têm avaliado a utilização de aditivos moduladores do pH ruminal em pastejo e nenhum até o momento tem avaliado sua combinação com óleos essenciais nesse tipo de produção. Portanto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o desempenho de vacas leiteiras e o metabolismo ruminal em resposta à adição de algas marinhas calcárias ou óleos essenciais e sua combinação.

2. REVISÃO

2.1. Óleos essenciais e óleos funcionais

Os óleos pertencem à classe geral dos *lipídeos*, um grupo estruturalmente diverso de compostos hidrofóbicos, solúveis em solventes orgânicos e altamente insolúveis em água (Taiz e Zeiger, 2010). Os óleos utilizados na alimentação de ruminantes podem ser classificados sob diferentes categorias segundo sua origem e efeito no animal. Óleos funcionais são aqueles óleos que possuem a capacidade de alterar o metabolismo animal além do seu conteúdo energético. Dentro dessa categoria podem ser considerados óleos gerados a partir do metabolismo primário e secundário das plantas.

Entende-se por metabolismo primário o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial no vegetal, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Os compostos envolvidos no metabolismo primário possuem uma distribuição universal nas plantas (Taiz e Zeiger, 2010). Certos lipídios gerados a partir do metabolismo primário são tóxicos para as bactérias ruminais, por exemplo os ácidos graxos poli-insaturados com a consequente capacidade de gerar alterações na fermentação ruminal (Jenkins, 1993). Em contrapartida, as plantas produzem grande diversidade de compostos orgânicos derivados do metabolismo secundário que não parecem ter funções diretas no crescimento ou desenvolvimento delas (Balandrin e Klocke, 1985). Essas substâncias possuem funções ecológicas importantes como mensageiros químicos entre as plantas e o meio ambiente, e em ocasiões exibem atividade antimicrobiana contra grande variedade de bactérias, leveduras e mofo (Gershenzon e Croteau, 1991).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (alcaloides). Os óleos essenciais são metabólitos secundários obtidos por vaporização ou destilação em água da fração volátil da planta (Gershenzon e Croteau, 1991). Estes metabólitos especificamente correspondem aos grupos dos terpenos e compostos fenólicos. Apresentado na Figura 1, os terpenos são feitos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Entre tanto os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina). O termo “essencial” atribuído a estes metabólitos secundários deriva de essência que significa cheiro ou aroma e está relacionada à propriedade de estas substâncias de prover sabores e odores específicos a muitas plantas (Calsamigla, 2007). Hummelbrunner e Isman (2001) descrevem quimicamente os óleos essenciais como misturas complexas de mono e sesquiterpenos, e fenóis ou mono-fenóis biogenicamente relacionados.

Figura 1. Vias metabólicas de biossíntese dos principais compostos ativos nos extratos de plantas. Adaptado de Calsamiglia, 2007.

Estudos indicam que alguns óleos essenciais possuem ação contra vários tipos de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e protozoários conferindo eles a denominação de óleos funcionais (Prata e Saxena, 2010; Calsamiglia, 2007; Burt, 2004). Em decorrência da natureza hidrofóbica dos óleos essenciais, estes atuam na célula microbiana rompendo a membrana citoplasmática, aumentando a permeabilidade da membrana e extravasando os constituintes citoplasmáticos (Burt, 2004).

2.1.1. Óleos funcionais da mamona, caju e copaíba

Existem diversos óleos essenciais gerados a partir de extratos de diferentes plantas. A mamona (*Ricinus communis*), o caju (*Anacardium occidentale*) e a copaíba (*Copaifera langsdorffii*) são plantas amplamente disseminadas pelo Brasil e utilizadas na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. Elas possuem óleos funcionais com propriedades antimicrobianas permitidas na produção animal. Estas propriedades são resultado da presença principalmente do: ácido ricinoleico na mamona; ácido anacárdico, cardol e cardanol no caju; e copaeno na copaíba.

O ácido ricinoleico é um ácido graxo ômega 9 que difere do ácido oleico por ter uma hidroxila no décimo segundo carbono (12-OH, *cis*-9, 18:1). Este ácido não é considerado um óleo essencial por ser originado no metabolismo primário e não possuir essência. No entanto, segundo Wallace (2007), o ácido ricinoleico provou ser altamente tóxico para as bactérias ruminantes, sendo que nenhuma entre 4 tipos de bactéria utilizadas no experimento foram capazes de crescer no meio contendo 50mg/l de ácido ricinoleico.

O óleo essencial do caju contém 4 compostos principais chamados ácidos anacárdicos: o cardanol, cardol, ácido anacárdico propriamente dito e o 6-metil cardol (1,2, 11,3, 64,9, e 2,0% do peso, respectivamente) diferindo no nível de saturação da cadeia (Lubi e Thachil, 2000). O ácido anacárdico deriva de ácidos fenólicos e quando aquecido pode gerar derivados lipo-fenólicos como o cardol e cardanol. Segundo Stasiuk e Kozubek (2010) estes compostos exibem propriedades antibacterianas, antiprotazoários e antifúngica. Porém Branco et al. (2015) atribui essas características exclusivamente ao ácido anacárdico. Este ácido inibe as bactérias gram-positivas incluindo *Bacilli* e

Staphylococci (Kubo et al., 1993). Deste modo, o ácido anacárdico foi sugerido como possível potencializador da formação de ácido propiônico (Van Nevel et al., 1971).

O copaeno pertence ao grupo dos terpenos que derivam de uma estrutura básica de 5 carbonos (C₅H₈), normalmente chamado de unidades isoprênicas. Os terpenos são classificados dependendo do número de unidades isoprênicas na estrutura molecular (Calsamiglia, 2007). Assim o copaeno pertence à família dos sesquiterpenos dado que possui três unidades isoprênicas. Os sesquiterpenos incluindo o α -copaeno têm demonstrado possuir atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Lang e Buchbauer, 2011).

2.1.2. Mecanismos de ação dos principais óleos funcionais

O principal mecanismo de ação dos óleos essenciais consiste em gerar mudanças na estrutura da membrana bacteriana, favorecendo a perda da sua estabilidade e, conseqüentemente, aumentando o fluxo de íons, o que diminui o gradiente iônico entre o exterior e interior da célula. Ultee et al. (2002) sugeriu que os grupos hidroxilas dos compostos aromáticos atuam como transportadores transmembrana de prótons e cátions monovalentes. Este efeito deveria prejudicar principalmente às bactérias gram-positivas (Calsamiglia et al., 2007). Porém, a membrana externa das bactérias gram-negativas não é completamente impermeável a substâncias hidrofóbicas assim moléculas de baixo peso molecular podem interagir com água (mediante pontes de hidrogênio), atravessar lentamente a parede celular por difusão através da camada de lipo-polissacarídeos ou através de proteínas de membrana e interagir com a bicamada lipídica das células (Griffin et al., 1999; Dorman e Deans, 2000). Também Helander et al. (1998) reportou que alguns óleos essenciais como o timol e o carvacol têm a capacidade de desintegrar a membrana externa de bactérias gram-negativas e de incrementar a permeabilidade da membrana citoplasmática.

Gustafson e Bowen (1997) sugerem que alguns óleos essenciais têm o potencial de coagular constituintes celulares provavelmente mediante a denaturação de proteínas. Geralmente os fenóis interagem com proteínas mediante pontes de hidrogênio e ligações iônicas ou interações hidrofóbicas (Prescott et al., 2004). No entanto compostos não fenólicos interagem mediante outros grupos funcionais como grupos carbonilos do cinamaldeído (Ouattara et al., 1997). Outros compostos com grupos aldeídos interagem com ácidos nucleicos e proteínas resultando na sua inativação (Prescott et al., 2004). Também outros compostos conseguem interagir com grupos sulfidrilas como no caso dos tiosulfatos gerados no óleo essencial do alho durante o tratamento com vapor (Reuter et al., 1996).

2.1.3. Dados experimentais de metabolismo

A maioria dos estudos que avaliaram os efeitos dos óleos essenciais no metabolismo ruminal tem sido realizado em condições de laboratório ou são experimentos de curto prazo, mas indicam que os óleos essenciais podem alterar favoravelmente a fermentação ruminal (Benchaar et al., 2008). Em três experimentos “in vitro”, Watanabe et al. (2010) observaram que os óleos essenciais de caju aumentaram a produção de ácido propiônico e reduziram as emissões de metano e amoníaco sem diminuir a produção total de AGV. Em outro trabalho, também realizado in vitro em cultivos contínuos mantidos a pH constante, houve aumento da concentração total de AGV

após adicionar 1,5 mg L⁻¹ de uma mistura de óleos essenciais composta por timol, limoneno e guaiacol (Crina®) sem efeito na digestibilidade da matéria orgânica (Castillejos et al., 2005).

Resultados da suplementação com óleos essenciais no metabolismo ruminal “in vivo” têm sido inconsistentes. Giannenas et al. (2011) observaram respostas nas proporções molares dos AGV de ovelhas lactantes, evidenciadas por um aumento linear na produção de propionato, quando as doses diárias aumentaram de 0 a 150 mg de óleos essenciais (Crina®) kg⁻¹ de MS de concentrado. Na meta-análise realizada por Khiaosa-ard e Zebeli (2014) apesar da variação no tipo de óleo essencial, a suplementação com óleos essenciais aumentou o propionato em detrimento do acetato sem reduzir a produção de AGV totais. Porém, a suplementação com óleos essenciais (Crina®) não teve efeitos na concentração total de AGV nem nas proporções molares dos AGV individuais em outros estudos com ovelhas e com vacas leiteiras (Benchaar et al., 2003; Newbold et al., 2004).

Os efeitos dos óleos funcionais parecem estar limitados a alterações no metabolismo ruminal. Alves et al. (2017) observaram que o ácido ricinoleico é metabolizado a 12-OH-18:0 pelos microrganismos ruminantes e depois oxidado a 12-oxo-18:0 como produto principal. Grandes quantidades destes ácidos graxos são excretadas no leite e poderiam apresentar alguns benefícios na saúde do consumidor (Alves et al., 2017). Por outro lado, segundo Kohlert et al. (2000), os princípios ativos dos óleos essenciais são absorvidos no intestino pelos enterócitos e metabolizados rapidamente no organismo animal. Os produtos deste metabolismo são transformados em compostos polares, conjugação com o glicuronato, e excretados na urina. Portanto se considera que a acumulação dos óleos essenciais no organismo seja pouco provável.

2.1.4. Desempenho animal

Devido à capacidade de alterar a fermentação ruminal, os óleos essenciais poderiam melhorar a utilização de nutrientes e assim o desempenho de ruminantes. Porém os resultados da suplementação com óleos essenciais sobre o desempenho na produção leiteira têm sido inconsistentes. Em trabalhos com ovelhas em lactação, os óleos essenciais (Crina®) têm incrementado a produção de leite em 19,9% e 35% (com doses diárias de 100 e 150 mg kg⁻¹ de concentrado, respectivamente) sem modificar o consumo de matéria seca, melhorando a eficiência de conversão do alimento em leite (Giannenas et al., 2011). Em outro trabalho apresentado por Martins et al., (2015) observaram que a suplementação de vacas no terço médio de lactação com 500 mg kg⁻¹ DM com blend de óleos funcionais de caju e mamona (Essential®) aumentou o consumo de matéria seca (15,3 *vs* 16,67 kg dia⁻¹, controle e óleos funcionais, respectivamente), a produção diária de gordura no leite, a produção de leite corrigida a 3,5% de gordura e o teor e a produção diária de proteína no leite.

Outros trabalhos em vacas leiteiras não têm apresentado diferenças na produção nem consumo quando adicionados óleos essenciais (Crina®) sem outro aditivo (Benchaar et al., 2006; Benchaar et al., 2007). Segundo a meta-análise apresentada por Khiaosa-ard e Zebeli (2014) a suplementação com óleos essenciais não apresentou influências consideráveis na produção de leite independentemente do tipo de óleo essencial. No mesmo trabalho os autores não acharam alterações no teor de gordura no leite nem na produção diária de gordura, porém o teor de proteína no leite foi aumentado pela suplementação com óleos essenciais.

2.2. Algas marinhas calcárias na produção leiteira

As algas marinhas calcárias (AMC) do gênero *Lithothamnium sp.* possuem compostos alcalinizantes que poderiam beneficiar a produção leiteira evitando distúrbios metabólicos e consequentemente melhorara eficiência de conversão dos nutrientes. Reduções rápidas de pH por períodos prolongados podem levar à acidose ruminal. A acidose ruminal surge em consequência de alimentar ruminantes, adaptados para digerir e metabolizar dietas predominantemente forrageiras, com dietas de elevada concentração de grãos (Krause e Oetzel, 2004). Fornecer dietas com crescentes quantidades de grãos tende a incrementar a produção de leite, porém os ganhos em produção gerados no curto prazo podem ser substancialmente ou completamente compensados por problemas na saúde das vacas (Kennelly et al., 1999; Krause e Oetzel, 2004). As causas de acidose ruminal subaguda podem ser agrupadas em três categorias: tamponamento ruminal inadequado, consumo excessivo de carboidratos rapidamente fermentescíveis e adaptação ruminal inadequada à dietas altamente fermentescíveis.

O uso de concentrados é uma estratégia eficiente para corrigir as deficiências nutricionais dos animais em pastejo (Santos et al., 2000), principalmente com suplementos a base de milho, o que pode acarretar em queda do pH e aumentar a chance de acidose. Deste modo, o uso de aditivos para controlar o pH ruminal pode permitir a utilização de maiores quantidades de concentrado para aumentar a produção, uma vez que reduzem o risco de acidose.

A suplementação com aditivos tamponantes aumentou a produção leiteira e a produção de gordura no leite quando a silagem de milho foi a principal fonte de forragem oferecida (Erdman, 1988; Staples e Lough, 1989). O bicarbonato de sódio tem sido muito utilizado como tamponante nas dietas dos ruminantes (Chalupa et al., 1996; Russell e Chow, 1993). Este aditivo neutraliza e estabiliza o pH (Thomas et al., 1984; Solorzano et al., 1989) e melhora a eficiência da digestão da fibra, da síntese da proteína microbiana (Rogers et al., 1982) e a utilização da matéria orgânica (Mackie e White, 1990). Porém seu efeito no ambiente ruminal é efêmero (Van Soest, 1994). Ao contrário do bicarbonato de sódio, a disposição estrutural das AMC se apresenta em formato de favo de mel, e este tipo de estrutura permite que os minerais que possui sejam liberados lentamente em um ambiente ácido e esta liberação controlada permite assim um efeito de tamponamento mais prolongado (Cruywagen, 2015).

Nas AMC (*Lithothamnium sp.*) se acha uma grande proporção de carbonato de cálcio em três estruturas diferentes: calcita (65%), aragonita (23%) e vaterita (12%). Entretanto Hutjens (1991) mencionou que o carbonato de cálcio da pedra calcária tem pouca capacidade tamponante e traz poucos benefícios ao rúmen, por não ser solúvel em água, ao contrário do bicarbonato de sódio. Entretanto, quando comparado com bicarbonato de sódio, em dietas com grande quantidade de concentrado, as AMC (Acid buf®) aumentaram o pH comparado à dieta controle (Cruywagen et al., 2007).

Os estudos de metabolismo e desempenho de vacas leiteiras com AMC são escassos na literatura e têm proporcionado resultados inconsistentes. Cruywagen et al. (2007) reportaram que as AMC (Acid buf®) proporcionaram maior produção de leite em comparação às dietas sem e com bicarbonato de sódio, ao mesmo tempo em que aumentaram o pH ruminal. Em um experimento utilizando o mesmo produto foi reportado uma menor taxa na queda do pH de líquido ruminal devido ao efeito prolongado das AMC (Beya, 2007). Segundo Cruywagen et al. (2015) a duração do pH ruminal baixo (5,5) foi reduzida de 13 horas por dia a 4 horas, devido à inclusão de AMC, que também melhorou a eficiência da utilização do alimento na conversão e composição do leite. Além disso, a inclusão de AMC (Acid buf®) na dieta de vacas leiteiras melhorou a eficiência de produção leiteira após a sétima semana de suplementação em comparação ao bicarbonato de sódio (Bernard et al., 2014). Entretanto,

esses mesmos autores relataram ausência de efeitos na produção e composição do leite quando as vacas foram suplementadas com AMC ou bicarbonato de sódio. Em outro experimento, a suplementação de vacas lactantes com AMC (Calmin®) aumentou a produção pós-parto de proteína no leite, sem alterar os outros parâmetros produtivos registrados (Wu et al., 2015). Calitz (2009) não observou diferenças no consumo de matéria seca, produção de leite ou na composição do leite de vacas suplementadas com AMC (Acid buf®).

A adição de óleos essenciais e algas marinhas calcárias têm demonstrado o potencial de melhorar a conversão de nutrientes em leite. Porém são muitos os trabalhos que apresentaram ausência de efeitos. Ainda são necessárias mais pesquisas para formar uma conclusão sólida sobre seus efeitos no ambiente ruminal. Considerando que estes aditivos alteram diferentes aspectos da fermentação ruminal, seria importante estudar também seus efeitos conjuntos a fim de esclarecer possíveis interações.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado para avaliar os efeitos da adição dietética de óleos essenciais e algas marinhas calcárias sobre o desempenho (Experimento 1) e o metabolismo ruminal (Experimento 2) de vacas em lactação mantidas em pastagem tropical.

Os experimentos foram desenvolvidos nas instalações do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP entre os meses de novembro de 2016 e fevereiro de 2017, totalizando 87 dias de período experimental.

3.1. Animais, delineamentos e tratamentos

Foram utilizadas 32 vacas mestiças 7/8 Holandês x Gir, sendo 8 multíparas e 24 primíparas, com média de 253 ± 36 dias em lactação (DEL), 40 dias de prenhez, $18,2 \pm 2,7$ kg de leite dia^{-1} e 460 ± 38 kg de peso corporal no início do experimento.

No experimento I, as 32 vacas foram utilizadas em delineamento em quadrado latino 4x4 repetido 8 vezes. Os animais, em cada repetição do quadrado, foram agrupados pelo número de lactações (primíparas ou multíparas), produção de leite e DEL. Cada período consistiu de 21 dias, dos quais 14 dias foram de adaptação e 7 de medições e coletas, totalizando 84 dias de experimento.

Após a conclusão do experimento I, as vacas continuaram consumindo as dietas previamente designadas aleatoriamente no último período do experimento I, por mais 3 dias, e foram avaliados os parâmetros ruminais no experimento II. No Experimento II foi utilizado delineamento em blocos aleatorizados, em que os animais foram agrupados pelo número de lactações (primíparas ou multíparas), produção de leite e DEL, perfazendo 8 blocos.

As vacas foram submetidas aos seguintes tratamentos: CONT) Concentrado comercial sem adição de aditivos; OE) Concentrado comercial com adição de 4g dia^{-1} de óleo essencial Biophytus®; AMC) Concentrado comercial com adição de 60g dia^{-1} de algas marinhas calcárias Lithonutri®; OE+AMC) Concentrado comercial com adição de 4g dia^{-1} e 60g dia^{-1} de óleo essencial (Biophytus®) e (Lithonutri®) respectivamente. O aditivo de óleos essenciais Biophytus® é um blend de óleos funcionais extraídos da mamona, copaíba e do caju. Entretanto o aditivo Lithonutri® está constituído por algas marinhas calcárias secadas e moídas da espécie *Lithothamnion calcareum*.

Os concentrados foram fornecidos individualmente duas vezes ao dia, às 06h00 e às 17h00, antes da ordenha, totalizando 6 kg de matéria natural de concentrado dia^{-1} ($5,4\text{ kg de MS dia}^{-1}$). Os aditivos foram incluídos em premix formulados com metade da dose diária do aditivo correspondente segundo o tratamento (sem aditivo no controle) e 500g do concentrado controle. Os premix foram incorporados individualmente encima do concentrado base (top dressing). Cada tratamento foi identificado com um pano amarrado na coleira de cada vaca, e cada vaca possuía um brinco que identificava a unidade experimental.

Durante o experimento, os animais tiveram acesso à pastagem capim sempre verde (*Panicum maximum* Jack cv Sempre verde).

Os concentrados foram amostrados semanalmente, armazenados e congelados à -18°C . Ao final do período experimental, as amostras foram descongeladas, secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas, compostas por período (21 dias), moídas em moinho do tipo Willey em peneira de 1 mm e mantidas em recipientes plásticos vedados em temperatura ambiente para posteriores análises laboratoriais.

Tabela 1. Proporção dos ingredientes e composição química da forragem e do concentrado base.

	Forragem	Concentrado base
Ingredientes		% MS
Milho		80
Farelo de Soja		15
Mineral		5
Total		100
Composição química (% da MS)		
MS (%)	15,30	89,03
PB	21,09	16,24
EE	1,53	1,45
FDN	64,40	10,80
FDA	30,54	3,40
Cinzas (%)	10,53	7,33
EB (Mcal/kg)	4,32	4,11

MS: matéria seca; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; EB: Energia bruta.

3.2. Manejo da pastagem e variáveis relacionadas

Os animais permaneceram em pastagem de capim sempre verde (*Panicum maximum* Jacq cv Sempre verde) em uma área de cinco hectares. A pastagem foi adubada com 40 kg ha⁻¹ de nitrogênio (N) a cada ciclo de pastejo. O sistema de pastejo utilizado foi o rotativo, baseado na altura do dossel de 75 cm na entrada como indicado por Souza (2013) como a altura na qual se atinge o 95% interceptação luminosa na espécie *Panicum maximum* Jacq cv Sempre verde. Os animais pastejaram conjuntamente em piquetes de 2000 m², e permaneceram em média, meio dia em cada piquete, ingressando no novo piquete após cada ordenha. Quando altura de saída superou aproximadamente o 50% da altura de ingresso (37,5cm) os piquetes foram repassados por outro lote fora do experimento. A distância máxima percorrida pelos animais entre a sala de ordenhe e a área de pastejo mais distante foi 500m e a mínima 180m.

Cada piquete tinha acesso ilimitado a água e área de sombra. Os parâmetros ambientais na área de pastejo foram registrados pelo posto meteorológico “Professor Jesus Marden dos Santos” (ESALQ-USP) localizado a 200m da área experimental.

A altura média do dossel forrageiro foi medida em cada piquete, previamente à entrada do lote experimental, traçando quatro linhas imaginárias paralelas e equidistantes com a amostragem feita em pontos dentro de cada linha, totalizando 60 pontos por piquete.

As massas de forragem pré-pastejo foram determinadas pelo método destrutivo, cortando-se a planta a cinco centímetros do solo, em seis pontos por piquete, escolhidos de forma aleatória. A moldura utilizada na colheita teve as dimensões de 1,55m × 0,65m. As amostragens foram realizadas uma vez a cada sete dias. O material colhido nos seis pontos do piquete foi pesado e homogeneizado, e duas subamostras de 1000 g foram retiradas. A primeira foi utilizada para determinação da MS da forragem e foi seca em estufa de ventilação forçada a 105°C por 24 horas.

A segunda subamostra foi utilizada para a determinação da composição morfológica do dossel e separada em folha (lâmina foliar), colmo (bainha + colmo) e material senescido (folhas e colmos com mais de 50% da área seca). Após a devida separação, cada porção do dossel foi seca em estufa de ventilação forçada a 105°C por 24 horas, pesadas e calculadas as proporções de cada fração na MS total e a MS total.

A composição bromatológica da forragem foi determinada a partir de amostragens do estrato pastejado (pastejo simulado) colhidos em 20 pontos distintos dentro de cada piquete, 1vez por semana. As amostras foram secas a 55°C por 72 horas, moídas em moinho do tipo Willey em peneira de 1 mm, compostas por mês e mantidas em recipientes plásticos vedados em temperatura ambiente até a realização das determinações químicas.

3.3. Produção e composição do leite

As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia, às 06h00 e às 17h00, e a produção foi mensurada diariamente durante a última semana de cada período. Amostras de leite para determinação da composição química foram colhidas no dia 19 de cada período em tubos coletores plástico de 100 ml, contendo 2-bromo 2-nitropropano-1-3-diol, homogeneizadas e armazenadas em geladeira a 8°C no período entre as ordenhas da manhã e da tarde e enviadas ao Laboratório da Clínica do Leite no dia seguinte de ser coletadas para a realização das análises dos seguintes componentes: gordura; proteína; caseína; lactose e nitrogênio ureico, pelo processo de infravermelho, e contagem de células somáticas pelo processo de citometria de fluxo.

A produção de leite corrigido para 3,5% de gordura (PLCG 3,5%) foi calculada por meio da fórmula descrita por Bremmer et al. (1997):

$$PLCG = ((0,4324 \times PL \text{ (kg)}) + (16,216 \times \text{produção de gordura (kg)}))$$

3.4. Consumo e digestibilidade dos nutrientes

3.4.1. Produção fecal e consumo

A produção fecal foi estimada através do marcador externo dióxido de titânio. O dióxido de titânio (TiO₂) foi incluído nos premix (500g de concentrado, TiO₂ aditivo ou sem aditivo), fornecido duas vezes ao dia, durante o consumo de concentrado (10 g por fornecimento), durante 15 dias, sendo 10 dias para a adaptação e cinco para a colheita de dados (Penning e Rutter, 2004). O fornecimento do marcador teve início no dia 4 e as coletas de fezes no dia 15 de cada período experimental.

As fezes foram coletadas diretamente do reto duas vezes ao dia, ao término de cada consumo de concentrado. Após coletadas, as fezes foram imediatamente armazenadas em freezer a -18°C. Ao final do período de coleta, as amostras foram homogeneizadas e compostas por vaca e período. As amostras foram secas em estufa de ventilação forçada a 55° C durante 72h, moídas a 1 mm e armazenadas em frascos plásticos a temperatura ambiente para análises posteriores. Cada amostra foi subdividida em duas subamostras, a primeira para as determinações químicas e cálculo das digestibilidades e a segunda subamostra foi utilizada para a determinação de TiO₂ e cálculo do consumo.

Para a determinação da concentração de TiO_2 foi empregada a metodologia descrita por Myers et al. (2004) no Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal e Bromatologia (USP, Pirassununga, SP), na qual as amostras de fezes são digeridas em ácido sulfúrico e a leitura são realizadas em espectrofotômetro UV a 410 nm, sendo usada uma curva de calibração com concentração conhecida de titânio para interpolação dos dados.

Para a determinação da digestibilidade e consumo de nutrientes foi utilizado o marcador interno FDNi (Bender et al., 2016). As amostras de fezes, de concentrado e de forragem foram moídas a 1 mm, acondicionadas em bolsas filtro F-57 (Ankom®) e incubados em duplicatas no rúmen de uma vaca com cânula ruminal por 288 horas (Bender et al., 2016). Após finalizar o período de incubação, as bolsas filtro com resíduo foram lavadas com água corrente até o total clareamento do resíduo. Posteriormente a bolsas foram colocadas no sistema Ankom® para realizar as determinações de FDN presente no resíduo. O processo envolveu a lavagem com detergente neutro (100°C por 1 hora) seguido de lavagens com água quente (seis lavagens) e acetona (uma lavagem) e secas em estufa por 12 horas. O resíduo foi considerado o FDNi. O conteúdo de FDNi do concentrado e da forragem foi dividido pelo FDNi das fezes de cada animal para o cálculo da indigestibilidade.

A produção fecal (PF) foi calculada conforme fórmula abaixo. A recuperação do titânio (RFTi) foi considerada de 90% conforme determinação de Souza (2014).

$$PF(kg\ dia^{-1}) = \left(\frac{\text{Quantidade do marcador administrado por dia}}{\text{Concentração do marcador nas fezes}} \right) * RFTi$$

A produção fecal proveniente do concentrado (PF concentrado) foi determinada como sendo a quantidade de concentrado oferecida, multiplicada por sua indigestibilidade. Do valor de PF total foi descontada a contribuição do concentrado e o valor obtido foi dividido pela indigestibilidade da forragem. Sendo assim, o consumo de forragem foi calculado com a equação:

$$\text{Consumo de forragem}(kg) = \left(\frac{PF - PF\ concentrado}{\text{Indigestibilidade da forragem}} \right)$$

3.5. Análises químicas

As análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP.

Amostras do concentrado, forragem e fezes foram secas em estufa de ventilação forçada à 105°C durante 24h para determinação da MS. O conteúdo de cinzas foi determinado após combustão à 550 °C durante 4h. O teor de extrato etéreo (EE) foi determinado de acordo com a metodologia proposta pela AOAC (1990). O conteúdo de N foi determinado pelo método de combustão de Dumas (Leco FP-2000 N analyzer) de acordo com Sweeney (1989) para logo calcular a proteína bruta (PB) multiplicando por 6,25 assumindo 16% de nitrogênio na composição da proteína. Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram determinados sequencialmente de acordo com método proposto por Van-Soest et al. (1991), adaptado para o uso do sistema Ankom Fiber Analyser® (Ankom Technology Corporation, Fairport, NY). Na determinação da fração FDN foi utilizado α -amilase termoestável e sulfito de sódio para todas as amostras.

As digestibilidades aparentes da MS, MO e FDN foram estimadas utilizando os valores individuais de consumo, excreção fecal calculada a partir da utilização do indicador TiO₂ e da concentração dos nutrientes nos alimentos e fezes, conforme a equação apresentada a seguir, onde DAN (%) é a digestibilidade aparente do nutriente e CN é a concentração do nutriente no alimento ou fezes:

$$DAN(\%) = \left(\frac{(Consumo * CN) - (Excreção fecal * CN)}{(Consumo * CN)} \right) * 100$$

3.6. Coleta de sangue

No experimento I foram coletadas amostras de sangue a cada 21 dias (1 vez por período) após 4 horas do fornecimento matinal do concentrado, por meio de punção na veia coccígea para a determinação dos teores plasmáticos de ácidos graxos não-esterificados (NEFA) e glicose. As amostras foram coletadas em tubos com vácuo contendo 5 mg fluoreto de sódio como antiglicolítico e 5 mg EDTA K₃ como anticoagulante. Imediatamente após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 3.000 g por 20 minutos a uma temperatura de 4°C para obtenção de plasma, acondicionadas em tubos de 2 ml do tipo “ependorff” e congeladas a -20° C.

A determinação de glicose plasmática foi analisada diretamente através do analisador bioquímico automático YSI 2700 Select (Biochemistry analyser, Yellow Spring, OH, EUA). Os ácidos graxos não esterificados (AGNE) foram determinados com o kit enzimático NEFA (Ref. FA115 – Randox Laboratories), com leitura em espectrofotômetro utilizando filtro de absorbância de 540nm. O padrão interno (1mmol/L) foi diluído em água destilada para obtenção da curva de calibração de 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 mmol/L. Dez µL de amostras de plasma foram pipetados em tubos de ensaio seguidas de 200 µL de reagente enzimático A e foram incubadas em estufa a 37°C por minutos. Após este período, 400 µL de reagente enzimático B foram adicionados da mesma maneira e incubados por mais 5 minutos, sendo a leitura das amostras realizada 3 minutos após a retirada da estufa.

3.7. Pesagem dos animais, escore de condição corporal e eficiência de produção

As vacas foram pesadas e tiveram sua condição corporal avaliada por 2 dias consecutivos, durante o final de cada período experimental. A segunda pesagem de cada período coincidiu com a extração de sangue. Foi adotada a escala de 1 (vacas extremamente magras) a 5 (vacas extremamente obesas), conforme proposto por Wildman et al., (1982). As avaliações de escore e as pesagens foram realizadas conjuntamente por três pessoas, sempre após o consumo de concentrado da manhã.

Os valores de energia nos alimentos foram calculados como descrito por Harvatine e Allen (2006) com a seguinte equação:

$$Energia\ digestivel\ (ED)consumida = Energia\ bruta\ (EB)\ consumida * Digestibilidade\ da\ EB$$

onde EB foi medida em bomba calorimétrica e digestibilidade da EB foi estimada mediante marcadores de TiO₂ e FDNi como mencionado anteriormente. Posteriormente o consumo de EL (CEL) foi calculado a partir da ED segundo o NRC (2001).

Para estimativa da energia líquida (EL) foram utilizadas as seguintes equações segundo o NRC (2001):

$$EL (total) = [EL(mant.) + EL(produção de leite) + EL(ganho de peso)]$$

em que EL(mant.) = energia líquida para manutenção (Mcal/kg/dia); EL(prod. leite) = energia líquida para produção de leite (Mcal/dia); e EL(ganho de peso) = energia líquida para ganho de peso (Mcal/dia).

Todas essas variáveis foram calculadas da seguinte maneira:

$$EL(mant.) = 0,08 * PV^{0,75}$$

$$EL(prod. de leite) = (0,093 * gordura \%) + (0,056 * proteína \%) + (0,04 * lactose \%)$$

Onde PV (kg) dos animais foi estimado como a média das duas pesagens consecutivos no final de cada período. As exigências de EL (ganho de peso) foram assumidas como nulas por considerar o PV na energia de manutenção e a potencial influência do período prévio durante a fase de adaptação de cada nova dieta.

A eficiência energética (EE) foi calculada pela produção de leite corrigida (PLC) em relação ao CEL, ou seja, PLC/ CEL (Pantoja et al., 1995) e pela produção de leite corrigida em relação ao consumo de MS (PLC/CMS) (Grant & Weidner, 1992).

3.8. Variáveis ruminais (Experimento 2)

No 3º e último dia do Experimento 2 (24º dia do último período experimental do Experimento 1), amostras de líquido ruminal (± 100 ml) foram coletadas mediante sonda esofágica.

A amostragem ocorreu duas horas após o fornecimento do concentrado matinal. O líquido ruminal foi homogeneizado e o pH mensurado por meio da leitura em potenciômetro digital. Simultaneamente, outras duas alíquotas de 50 ml deste líquido ruminal foram acidificadas com 1 ml de ácido sulfúrico 50% (Broderick e Reynal, 2009) e congeladas em freezer (-20°C), em dois recipientes separados, para posteriores análises de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e ácidos graxos voláteis (AGV).

As concentrações dos AGV foram determinadas por cromatografia líquida-gasosa segundo Erwin et al. (1961), e a concentração de N-NH₃ no fluido ruminal foi avaliado conforme método de Chaney e Marback (1962).

3.9. Análises estatísticas

Os dados foram analisados pelo procedimento MIXED do SAS (SAS, 2002). Para análise das variáveis de desempenho no Experimento 1 o modelo incluiu os efeitos fixos de quadrado Latino repetido, período e tratamento, e o efeito aleatório de quadrado Latino e de vaca dentro de quadrado Latino. O nível de significância utilizado foi de 0,05.

Para análise dos parâmetros ruminais no Experimento 2 o modelo incluiu o efeito fixo tratamento e o efeito aleatório de vaca dentro de bloco. O nível de significância utilizado foi de 0,1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ambiente

Tabela 2. Parâmetros ambientais durante o período experimental.

Variável	Media	EPM
Temperatura min (C°)	19,2	1,9
Temperatura média (C°)	23,8	1,86
Temperatura máx. (C°)	30,7	2,7
Umidade Relativa (%)	78,1	8,33
Radiação global (MJ/m2.d)	21,1	6,26
Vento (m/s)	1,5	0,61
Chuva (mm)	7,5	10,7
ITU ¹	72,8	2,8

¹Índice Temperatura Umidade estimado segundo NRC (1972)

Na Tabela 2 e na Figura 2 são apresentados os dados das condições ambientais durante o período experimental. O ITU atingiu valores superiores a 72 em 87 dias do período experimental. Segundo Bohmanova et al. (2007), 72 pontos no valor de ITU (calculado com a formula do NRC (1972)) pode ser considerado o limite a partir do qual as vacas começam a diminuir sua produção leiteira. Durante o período experimental 3 o ITU médio foi de 75. Durante situações de estresse térmico existe um incremento na perda de CO₂ mediante a respiração ofegante quando o animal tenta diminuir o calor corporal, podendo resultar no desenvolvimento de acidose metabólica, o que justificaria a inclusão na dieta de agentes tamponantes e ou alcalinizantes ou de modificadores da fermentação ruminal com capacidade de regular a fermentação microbiana (Benchaar et al., 2009; West, 2003; West et al, 1991).

Figura 2. Evolução diária das variáveis ambientais durante o período experimental.

No entanto, as vacas produto de cruzamento *Bos taurus* x *Bos indicus* utilizadas no experimento poderiam estar melhor adaptadas às condições tropicais e a maiores valores de ITU (Hansen, 2004; Gaughan et al., 2010). Gaughan et al. (1999) reportaram que as adaptações genéticas permitem ao gado *Bos indicus* ter menores taxas de respiração e de temperatura retal que *Bos taurus* quando expostos a situações com estresse térmico similar.

4.1.1. Pastagem

Na Tabela 1 e nas Figuras 3 e 4 são apresentados os dados da composição bromatológica e morfológica da pastagem utilizada. O manejo com base na IL de 95% como ponto ótimo de entrada nos pastos, permitiu manter proporção satisfatória de folhas no dossel e controlar a elongação de hastes e a presença de material senescente ao longo do período experimental. A oferta média de MS pastagem foi de 53,46 kg de MS por vaca dia⁻¹ (4.277kg de MS ha⁻¹ * 0,2 ha * 2 piquetes / 32 vacas). A alta oferta de MS de forragem por vaca dia⁻¹ garantiu oferta de folhas (22,52 kg de MS de folhas por vaca dia⁻¹) superior ao consumo de MS de pasto (Tabela 3), indicando que o CMS de forragem não foi restringido pela oferta de forragem (Bargo et al 2003). O manejo adotado também garantiu que a forragem oferecida aos animais fosse de boa qualidade, com 21% de PB e 64% de FDN (Tabela 1).

Figura 3. Massa de forragem dos pastos ao longo do período experimental.

Figura 4. Variação da estrutura do dossel forrageiro durante o período experimental.

O teor de PB observado na forragem é maior que os relatados por Tedeschi et al. (2002) e pelo CQBAL (2018) para gramíneas tropicais, em virtude provavelmente da dose de fertilizante nitrogenado utilizada, do critério para a entrada do gado no piquete baseado na IL=95% e da metodologia de amostragem da forragem (estrato pastejável). Teores elevados de PB em gramíneas tropicais têm sido relatados de forma consistente, quando os pastos são adubados com N manejados com base no critério da IL=95% e com amostragem do estrato pastejável ou de pastejo simulado (Santos et al., 2014; Souza et al, 2017; Batistel et al, 2017; Congio et al, 2018). Quando a amostragem é realizada simulando o pastejo realizado pelos animais, os resultados são mais próximos da composição

da forragem efetivamente consumida devido à capacidade dos animais de selecionar as melhores partes com teores menores de FDN e maiores de PB.

4.2. Desempenho produtivo

4.2.1. Consumo

O consumo de forragem de animais em pastejo é determinado por fatores intrínsecos do animal, como sua capacidade de ingestão e fatores intrínsecos do pasto como a composição morfológica e estrutura do pasto pré e pós-pastejo, a concentração de nutrientes e a taxa de degradação e de passagem ruminal (Sollengberger e Burns, 2001; Carvalho et al., 2007). Tanto a composição morfológica e estrutura do pasto quanto a oferta de forragem (descritas previamente) foram suficientes para maximizar o consumo de forragem, porém os valores observados de FDN e FDA (Tabela 1) poderiam limitar o consumo de vacas leiteiras mediante enchimento físico.

O consumo de matéria seca foi em média 12,22 kg dos quais 6,79 kg de MS foram de capim (Tabela 3). O primeiro período experimental apresentou o consumo máximo de MS (13,78 kg de MS total e 8,38 kg MS de capim) e o mínimo foi registrado no último período (10,54kg de MS). Essa redução no CMS pode ser atribuída ao avanço do período de lactação das vacas associados ao estresse calórico ao longo do período experimental. Como o fornecimento de concentrado foi fixo (6 kg de matéria natural por vaca/dia) ao longo do período experimental, a redução no CMS ocorreu em virtude da redução do consumo de forragem. Na compilação realizada por Santos et al. (2003) foi constatado que o CMS de vacas mantidas exclusivamente em pastagens tropicais variou de 6,3 a 14,8 kg de MS dia^{-1} , ou média de 2,37% do PC (Peso Corporal). Consumos baixos de forragem e de MS total são observados em situações de demanda energética baixa ou de exigência nutricional reduzida devido à saciedade metabólica. O CMS médio dos 4 tratamentos (12,22 kg de MS) foi inferior ao consumo (14,23kg de MS) predito pelo NRC (2001), porém o valor predito pelo modelo para a produção de leite com o CMS observado (12,22 kg de MS) foi apenas 0,33 kg menor que a produção observada.

Tabela 3. Consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes em vacas suplementadas com aditivos de algas marinhas e/ou óleos essenciais mantidas em pastagem tropical.

Variáveis	Tratamentos				EPM	p<	
	CONT	OE	AMC	OE+AMC		Trat	Período
<i>Consumo (Kg de MS)</i>							
Capim	6,86ab	6,50b	7,24a	6,55b	0,22	0,02	<0,01
CMS	12,26ab	11,9b	12,7a	12,01b	0,22	0,01	<0,01
CMO	11,13ab	10,81b	11,47a	10,86b	0,2	0,02	<0,01
<i>Digestibilidade %</i>							
DFDN	63,35	64,17	63,48	63,72	0,58	0,77	0,06
DMS	67,27ab	68,23 ^a	66,99b	68,3a	0,53	0,05	<0,01
DMO	70,21ab	71,11 ^a	69,81b	71,03a	0,49	0,04	<0,01

CMS: Consumo de matéria seca; CMO: Consumo de matéria orgânica; DFDN: Digestibilidade da FDN; DMS: Digestibilidade da matéria seca; Digestibilidade da matéria orgânica. CONT = sem aditivo; OE = 4g dia⁻¹ de óleos essenciais; AMC = 60g dia⁻¹ de algas marinhas calcárias Lithonutri®; OE+AMC = 4g dia⁻¹ de óleos essenciais Biophytus® e 60g dia⁻¹ de algas marinhas calcárias Lithonutri®.

Em comparação ao tratamento controle (Tabela 3) os aditivos ou a combinação de aditivos testados não afetaram o CMS ($P>0,05$) de forragem, o CMS total e o CMO total. Entretanto, a inclusão de OE como único aditivo ou combinado com AMC (OE+AMC) reduziu em média 6% o CMS ($P<0,01$ e $P<0,01$, respectivamente) e em 5% o CMO ($P<0,01$ e $P<0,01$, respectivamente) em comparação ao tratamento AMC.

Bernard et al. (2014) não observaram diferenças para o consumo de MS entre o controle negativo e a suplementação com AMC do gênero *Lithothamnium spp.* (Acid Buf®) (22,1 vs 22,3 kg de MS, $P=0,68$) quando a inclusão do aditivo foi de 0,39% da MS ou 87g por vaca.dia⁻¹. No presente estudo, o CMS médio das vacas dos tratamentos com adição de AMC foi 12,39 kg, portanto o nível de inclusão foi próximo de 0,48% ou 60 g de MS vaca*dia⁻¹, sendo esses níveis de inclusão similares a aqueles utilizados por Bernard et al. (2014) ambos sem apresentar diferenças entre controle e o tratamento com AMC. Resultados similares foram observados por Cruywagen et al. (2015) quando forneceram 4g de AMC (Acid Buf®) por kg de MS, que seria equivalente a ter oferecido 50g por vaca*dia⁻¹ neste experimento.

No entanto Lopes (2012) observou queda no consumo quando as AMC (Superal®) foram acrescidas em 1% da MS, concordando com Clark et al. (1989) que também detectaram queda no consumo em resposta à inclusão de 1,4% ou 2,1% de carbonato de cálcio (principal componente da farinha de algas marinhas) às dietas de vacas leiteiras. Lopes (2012) indicou que a elevada concentração de AMC na dieta pode ter sido a causa dessa depressão de consumo. Esse efeito também foi observado por Cruywagen et al. (2004), estabelecendo um teor ótimo de AMC próximo de 0,3% da MS ou cerca de 80 g por vaca*dia⁻¹. No presente estudo, a totalidade da AMC foi misturada ao concentrado na proporção de 1% da MS, porém sem produzir efeito de diminuição do consumo de concentrado, sugerindo que a inclusão de AMC não afeta a palatabilidade da dieta.

O efeito de blends de OE no CMS de vacas em lactação tem se mostrado inconsistente. Tassoul et al. (2009) e Benchaar et al. (2006), avaliaram o efeito de blends compostos por timol, eugenol, vanilina e limoneno (Crina®), e relataram que OE reduziram o CMS de vacas em lactação em confinamento. Por outro lado, Silva et al. (2018), Vendramini et al. (2016) e Benchaar et al. (2007) utilizaram o mesmo blend (Crina®), Santos et al. (2010) um

blend de eugenol, acetato de geranil e óleo de coentro (Agonil®) e Yang et al. (2007) utilizaram óleo essencial de alho ou junipero, sem observar qualquer efeito de OE sobre o CMS, enquanto Kung et al. (2008) observaram que o CMS aumentou 7,2% quando foi adicionado 1,2g de óleo essencial (Crina®) por vaca*dia⁻¹ na dieta.

A dificuldade em se comparar dados sobre o uso de óleos essenciais é que há grande variação entre os óleos essenciais testados assim como na proporção desses óleos nos blends ou misturas testadas.

Calsamiglia et al., (2007) sugeriram que os óleos essenciais poderiam apresentar um comportamento similar aos ionóforos no meio ruminal. Tedeschi et al. (2003) propuseram que a fase da lactação na qual aconteceria o experimento poderia alterar a resposta animal a esses aditivos. Então quando as vacas estiverem em balanço energético positivo (lactação avançada, ou vaca seca), a suplementação com monensina poderia incrementar a energia disponível por unidade de alimento consumido (Mcal/dia), resultando, portanto, em menor CMS. Por outro lado, quando as vacas estiverem em balanço energético negativo (início de lactação), a energia excedente produzida pela inclusão de monensina seria utilizada para melhorar o desempenho produtivo, reduzir a perda de reservas corporais, ou ambas (Tedeschi et al., 2003), sem reduzir o consumo.

O problema com a aplicação desta teoria, também utilizada por Benchaar et al, (2006), é que existiu uma redução do consumo em experimentos de início de lactação (Tassoul et al., 2009) e houve aumento de consumo em experimentos em lactação avançada (Kung et al., 2008). Tassoul et al., (2009) atribuíram a problemas de palatabilidade a redução no consumo. Por outro lado, Kung et al., (2008) sugeriram que a causa poderia estar na relação acético/propiónico dos AGV produzidos no rúmen. Adicionalmente Mendel et al. (2017) sugerem que os OE poderiam ter efeitos sobre a motilidade visceral tanto em ruminantes como em não ruminantes. Óleos essenciais extraídos da planta *Mentha longifolia* composto por mentol (19,4-32,5%), mentona (20,7-28,8%), pulegona (7,8-17,8%), 1.8-cineol (5.6-10.8%), terpinol-4 (3,1-4,9%) e piperitona (2,2-3,3%), apresentaram efeito miorelaxante ou bloqueio absoluto da contractabilidade espontânea em fibras de músculo liso de rumen e abomaso (Jalilzadeh-Amin et al., 2012). É possível que os efeitos mencionados por Mendel et al. (2017) possam modificar o CMS porém seriam necessários mais estudos e com os OE utilizados neste trabalho para poder afirmar uma relação.

A combinação de AMC com OE reduziu o CMS das vacas em comparação com a suplementação exclusiva com AMC (Tabela 4, P<0,01). Cardozo et al., (2005), quando avaliaram óleos essenciais de alho, canela, iúca, anis, orégano, pimento, cinamaldeído, anetol ou eugenol, sugeriram que a diferença na resposta dos óleos essenciais pode estar relacionada ao estado dissociado ou não-dissociado da molécula ativa. Somente as moléculas não dissociadas poderiam ter a capacidade de interagir com a membrana celular. Quando o pH diminui, os ácidos tendem a estar não-dissociados, portanto, conseguem interagir facilmente com as membranas celulares e exercer seu efeito antimicrobiano. Também, as bactérias parecem ser mais susceptíveis aos efeitos dos óleos essenciais em baixos pH (Skandamis e Nychas, 2000). Porém, no presente estudo, mesmo com o efeito positivo das AMC sobre o pH ruminal (Tabela 8, P<0,063), foram observados efeitos similares nos tratamentos de OE e OE+AMC sobre o CMS. Os valores de pH avaliados por Cardozo et al. (2005) in vitro, foram 7,0 e 5,5, possivelmente o efeito tamponante sobre o pH gerado pelas AMC não foi suficiente para inibir o efeito dos óleos essenciais, como aquele que poderia ser gerado em uma situação de neutralidade ácido-base.

4.2.2. Digestibilidade

Os tratamentos com óleos essenciais apresentaram os maiores valores de digestibilidade da MS e da MO ($P<0,05$ e $P<0,04$) e o tratamento somente com AMC teve a menor digestibilidade em ambas variáveis no entanto nenhum dos tratamentos se diferenciou do tratamento controle ($P>0,05$). A digestibilidade de FDN não diferiu entre tratamentos ($P>0,05$), sugerindo que a diferença na digestibilidade da MO e da MS entre os tratamentos com óleos essenciais e o tratamento somente com AMC esteja relacionada à fração solúvel em detergente neutro. As forrageiras utilizadas no experimento são compostas principalmente por FDN (Tabela 1), como o tratamento que apresentou o maior consumo de capim foi, também, o que apresentou a menor digestibilidade da MS e da MO, o animal pode ter incrementado o consumo de capim com o intuito de compensar a perda energética causada pela diminuição da digestibilidade dos outros componentes nutricionais. Apesar da digestibilidade do tratamento de AMC ser inferior aos tratamentos com óleos essenciais, os animais compensaram com maior CMS na dieta com AMC.

São poucos os trabalhos que avaliaram os efeitos das AMC sobre a digestibilidade dos diferentes nutrientes, no entanto, devido à grande proporção de calcário na composição desta, é possível tentar relacionar os resultados obtidos com a suplementação do calcário sobre esta variável. Fernandez et al. (1982), Nocek et al. (1983) e Rogers et al. (1985) demonstraram que a suplementação de carbonato de cálcio na dieta de vacas leiteiras não melhorou a digestibilidade do amido. Clark et al. (1989) tampouco observaram diferenças significativas sobre a digestibilidade aparente da MS, MO, PB e EE quando suplementou vacas leiteiras com calcário. Estes resultados também foram obtidos por Rogers et al. (1985) para vacas suplementadas com 1,4% da MS de calcário. Segundo Keyser et al. (1985), o efeito do calcário na digestibilidade do amido depende do tamanho de partícula do aditivo e de sua taxa de reação, porém Amrutkar (2006) não achou diferenças na digestibilidade da MO quando adicionou 0, 5 e 10% de calcário em pó a uma mistura de concentrado fornecida a bezerros.

Segundo Argyle et al. (1988), as cinzas solúveis no alimento e a rápida fermentação dos açúcares solúveis da dieta aumentam a osmolaridade ruminal. O aumento rápido de osmolaridade altera o fluxo osmótico da água, de tal forma que a água é puxada para dentro do rúmen no lugar de ser puxada para dentro do sistema animal. Portanto, é possível que o fornecimento de AMC junto com o concentrado tenha incrementado a concentração de cinzas solúveis, aumentando a taxa de passagem da fração líquida e reduzindo a digestibilidade da fração solúvel sem alterar a digestibilidade da FDN.

Com relação aos OE, na maioria dos trabalhos revisados não foi observado efeito desses aditivos na digestibilidade da MS, MO e FDN (Silva et al., 2018; Vendramini et al., 2016; Hristov et al., 2013; Santos et al., 2010; Benchaar et al., 2007; Benchaar et al., 2006; Castillejos et al., 2005; Benchaar et al., 2003). Benchaar et al. (2006) relataram aumento pequeno (97 vs 96,4%), porém significativo ($P<0,05$), na digestibilidade do amido em vacas suplementadas com óleos essenciais (Crina®). Castillejos et al. (2006) observaram que a adição de 5, 50 e 500mg/L de OE a base de eugenol em um fermentador de cultivo-contínuo não alterou a digestibilidade da MS, FDN nem a FDA, porém, no mesmo estudo, 500 mg/L de OE a base de timol reduziu a digestão da MS, FDN e FDA sem observar esses efeitos em doses menores. Portanto, a influência dos óleos essenciais sobre a atividade microbiana depende da dose e do tipo de óleo essencial que compõe o aditivo. A dose de óleo essencial utilizada neste experimento foi 4g por vaca*dia⁻¹, assim, foi uma dose muito inferior àquela na qual Castillejos et al. (2006) acharam diferenças significativas.

4.2.3. Peso vivo, Condição corporal e Metabólitos sanguíneos

Tabela 4. Metabólitos sanguíneos, peso e escore corporal de vacas suplementadas com aditivos de algas marinhas e/ou óleos essenciais mantidas em pastagem tropical.

Variáveis	Tratamentos				EPM	p<	
	CONT	OE	AMC	OE+AMC		Trat	Período
Escore corporal	3,36a	3,47b	3,33a	3,29a	0,06	0,01	0,01
Peso Corporal	470,2	470,7	471,9	472,5	8,3	0,72	0,01
AGNE (mmol L ⁻¹)	0,227	0,219	0,224	0,228	0,008	0,68	0,01
Glicose (mg/dl)	56,08	55,48	56,33	55,53	0,62	0,5	0,01

AGNE= Ácidos graxos não esterificados. CONT = sem aditivo; OE = 4g dia⁻¹ de óleos essenciais; AMC = 60g dia⁻¹ de algas marinhas calcárias Lithonutri®; OE+AMC = 4g dia⁻¹ de óleos essenciais Biophytus® e 60g dia⁻¹ de algas marinhas calcárias Lithonutri®

Na Tabela 4 são apresentados os dados de peso corporal, de escore de condição corporal e de metabólitos sanguíneos. As vacas do tratamento OE apresentaram ECC médio mais alto ($P<0,01$) que as vacas dos demais tratamentos. Entretanto, os dados de consumo de energia líquida e de energia secretada no leite (Tabela 6) não indicam maior partição da energia ingerida para depósito nos tecidos adiposos. O peso vivo médio das vacas não foi alterado ($P>0,05$) pelos tratamentos testados e também não foram observadas ($P>0,05$) alteração nas concentrações sanguíneas de AGNE e de glicose. Apesar do consumo de energia não ter sido alterado pelos tratamentos testados, a suplementação de OE aumentou ($P<0,05$) as concentrações ruminais de AGV e de acetato, principal precursor de carbono para a síntese de gordura nos tecidos adiposos (Tabela 7).

De acordo com os poucos dados disponíveis na literatura, o efeito dos OE no ECC e PV de vacas em lactação parece ser inconsistente. Benchaar et al. (2006) observaram aumento no ganho de peso vivo em vacas suplementadas com óleos essenciais (Crina®). Os ganhos foram 0,22 vs 0,38 kg/d, sem e com adição de óleos essenciais respectivamente, porém não foram observadas diferenças significativas no peso vivo inicial nem no final. Kung et al. (2008) não evidenciaram variação no ganho de peso vivo nem melhora no escore corporal das vacas suplementadas com óleos essenciais (Crina®), no entanto, os autores registraram incremento na produção de leite, sugerindo que a energia extra absorvida pode ter sido canalizada à produção em lugar de ser acumulada como reserva corporal. Tassoul et al. (2009) não observaram efeitos de OE (Crina®) no ganho de peso vivo nem melhoras no escore corporal, porém, relataram tendência ($P<0,08$) de incremento da eficiência de conversão kg de leite/ kg de CMS. Por outro lado, a suplementação com OE (Agolin Ruminant®) teve efeito negativo sobre a condição corporal de vacas em lactação (Santos et al. 2010), em virtude principalmente da tendência de redução do consumo de matéria seca das vacas no início da lactação. Em acordo com o presente trabalho, Drong et al. (2015) também não observou efeito na concentração de glicose em sangue quando suplementou vacas no início de lactação com OE (Crina®).

Com relação às AMC Bernard et al. (2014) não observaram efeitos da suplementação com AMC (Acid Buf®) no PV de vacas leiteiras, assim como Wu et al. (2015) e Lopes (2012), também não observaram efeitos da suplementação com AMC (Calmin® e Superal®, respectivamente) no escore corporal das vacas.

Houve efeito significativo ($P<0,01$) de período nas variáveis ECC, PV, AGNE e glicose sanguínea (Tabela 4). A condição corporal aumentou e a concentração de AGNE no sangue diminuiu a medida que a produção das

vacas caiu com o avanço na lactação, indicando que cada vez menos energia foi sendo destinada à produção de leite e mais energia foi sendo destinada à restituição de reservas corporais.

Figura 5. Variação de escore corporal e concentração de ácidos graxos não esterificados em plasma sanguíneo durante período experimental.

4.2.4. Produção e composição do Leite

Na Tabela 5 são apresentados os dados de produção e composição de leite do presente estudo. Os aditivos testados não afetaram ($P>0,05$) a produção e a composição do leite.

Wu et al. (2015) também não observaram efeito da suplementação com AMC (Calmin®) no desempenho de vacas leiteiras. Resultados similares foram observados por Bernard et al. (2014) ao compararem tratamento controle negativo sem tamponante, tratamento controle positivo com bicarbonato de sódio e um terceiro tratamento com AMC (Acid Buf®). Porém, nesse último experimento, a suplementação de 0,38% da MS de AMC reduziu a concentração de proteína do leite.

Contrariamente ao presente estudo e aos de Wu et al. (2015) e Bernard et al. (2014), Cruywagen et al. (2015) observaram efeitos positivos da suplementação com AMC (Calmin®, Acid Buf® e Acid Buf®, respectivamente) na produção de leite, na concentração de gordura no leite e por consequência, na produção de gordura do leite. Segundo os autores, as vacas do tratamento controle apresentaram sinais de acidose ruminal subaguda, e que os aditivos tamponantes evitaram esse distúrbio metabólico permitindo melhor desempenho produtivo.

Tabela 5. Produção e composição do leite de vacas suplementadas com aditivos de algas marinhas calcárias e/ou óleos essenciais mantidas em pastagem tropical.

Variável	Tratamentos				EPM	P<	
	CONT	OE	AMC	OE+AMC		Trat	Período
Produção de leite (kg dia ⁻¹)	14,32	14,5	13,85	14,23	0,6	0,152	<0,001
PLC 3,5% (kg dia ⁻¹)*	14,81	14,87	14,34	14,69	0,63	0,287	<0,001
Gordura (%)	3,75	3,7	3,71	3,78	0,09	0,548	0,028
Proteína (%)	3,37	3,39	3,4	3,38	0,05	0,524	<0,001
Lactose (%)	4,56	4,56	4,59	4,58	0,04	0,482	<0,001
Caseína (%)	2,62	2,64	2,64	2,63	0,04	0,916	<0,001
Sólidos totais (%)	12,66	12,63	12,69	12,7	0,13	0,767	0,002
Prod. de gordura (g dia ⁻¹)	0,531	0,532	0,515	0,526	0,02	0,52	<0,001
Prod. de proteína (g dia ⁻¹)	0,48	0,489	0,472	0,485	0,017	0,255	<0,001
Prod. de lactose (g dia ⁻¹)	0,655	0,662	0,636	0,655	0,027	0,276	<0,001
Prod. de caseína (g dia ⁻¹)	0,372	0,379	0,366	0,375	0,014	0,277	<0,001
CCS (log)	1,97	2,05	2,07	2,09	0,11	0,347	0,038
N ureico (mg/dl)	14,78	15,42	14,78	14,77	0,34	0,216	<0,001

*Produção de leite corrigida a 3,5% de gordura. CONT = sem aditivo; OE = 4g dia⁻¹ de óleos essenciais; AMC = 60g dia⁻¹ de algas marinhas calcárias Lithonutri®; OE+AMC = 4g dia⁻¹ de óleos essenciais Biophytus® e 60g dia⁻¹ de algas marinhas calcárias Lithonutri®

Os óleos essenciais também não modificaram a produção nem a composição do leite ($P < 0,05$). Esses resultados concordam com a maioria dos resultados obtidos por Silva et al. (2018), Vendramini et al. (2016), Benchaar et al. (2007), Yiang et al. (2007), Benchaar et al. (2006) e por Tassoul et al. (2009). No trabalho de Tassoul et al. (2009), entretanto, a suplementação com OE (Crina®) reduziu a concentração de proteína do leite (3,10 vs 2,95%) em comparação com o tratamento controle.

Tassoul et al. (2009) levantaram a hipótese de que o efeito dos OE sobre a produção de leite varia de acordo com a fase de lactação das vacas. Nesse trabalho, as vacas consumindo OE produziram numericamente menos leite que as vacas Controle até a sétima semana de lactação. A partir dessa fase as vacas suplementadas com OE passaram a produzir numericamente mais leite que as vacas do tratamento Controle, atingindo a diferença de + 4 kg de leite ($P < 0,10$) na semana 15 do período experimental. Giannenas et al. (2011) observaram efeitos positivos da suplementação de ovelhas com doses crescentes de OE (Crina®) somente após a quinta semana de lactação. Kung et al (2008) observaram efeito positivo da suplementação com OE (Crina®) na produção de leite de vacas com 118 dias de lactação no início do período experimental. Essa teoria poderia explicar a falta de efeito dos OE na produção de leite nos trabalhos de Benchaar et al. (2007, 2006) com vacas com DEL = 61 e 98 e de Santos et al. (2010) com vacas com DEL = 20.

Entretanto, Yang et al. (2007) iniciou a suplementação com OE com vacas com 113 dias em lactação e no atual experimento foram utilizadas vacas com 253 dias em lactação e em ambos os estudos não se observou efeito positivo dos OE (óleo essencial de alho ou junípero e Biophytus®, respectivamente) na produção de leite.

4.2.5. Balanço Energético

Tabela 6. Consumo de energia líquida de lactação (ELL), ELL secretada por kg de leite, ELL secretada no leite por dia e eficiência de vacas suplementadas com aditivos de algas marinhas calcárias e/ou óleos essenciais mantidas em pastagem tropical.

Variáveis	Tratamentos				EPM	p-valor	
	CONT	OE	AMC	OE+AMC		Trat	Período
ELL por kg de MS consumida (Mcal kg ⁻¹)	1,57	1,59	1,56	1,60	0,016	0,061	0,01
Consumo de ELL (Mcal dia ⁻¹)	18,63	18,52	19,10	18,48	0,31	0,328	0,01
ELL secretada no leite (Mcal kg ⁻¹)	0,72	0,71	0,72	0,72	0,01	0,89	0,28
ELL secretada no leite (Mcal dia ⁻¹)	10,31	10,30	10,00	10,20	0,40	0,40	0,01
ELL leite/ELL consumida	0,553	0,553	0,521	0,547	0,021	0,11	0,01
CONT = sem aditivo; OE = 4g dia ⁻¹ de óleos essenciais; AMC = 60g dia ⁻¹ de algas marinhas calcárias Lithonutri®; OE+AMC = 4g dia ⁻¹ de óleos essenciais Biophytus® e 60g dia ⁻¹ de algas marinhas calcárias Lithonutri®							

Não houve efeito ($P>0,05$) da suplementação com OE, AMC ou da combinação entre os aditivos no consumo de ELL, na ELL secretada no leite e na eficiência de uso da ELL para a produção de leite (Tabela 6). Entretanto, a dieta com OE apresentou maior ($P<0,1$) ELL por kg de MS que a tratamento com AMC, mas em virtude do menor CMS com OE (Tabela 3), o consumo de ELL e a quantidade de EEL secretada no leite não diferiram ($P>0,05$) entre os dois tratamentos, assim como entre os demais (Tabela 6).

Os resultados sobre o efeito das AMC sobre a eficiência alimentar de vacas em lactação são variados. Lopes (2012) não observou diferenças na eficiência de conversão quando suplementou vacas DEL = 248, porém Cruywagen et al. (2015) evidenciaram melhor conversão da MS da dieta em leite em vacas com DEL = 129. O atual trabalho foi realizado com DEL similar ao das vacas do trabalho de Lopes (2012), o que permitiria explicar os mesmos resultados na transferência de energia da MS para o leite mediante um estágio fisiológico similar dos animais. Cruywagen et al. (2015) sugeriram que a melhora na eficiência de conversão estaria associada ao efeito tamponante das algas marinhas (Acid Buf®), que evitaram as doenças metabólicas (como acidose subaguda) do tratamento controle. A diferença de DEL entre os trabalhos indicaria que as vacas no trabalho de Cruywagen et al. (2015) teriam maior risco de sofrer acidose que vacas no final da lactação, porque esse trabalho foi realizado próximo do pico de consumo dos animais. No presente estudo houve efeito positivo no incremento de pH ($P<0,1$) pela adição de AMC (Lithonutri®) na dieta em comparação com OE (Tabela 7), porém, essa melhora não melhorou a eficiência de conversão da energia da dieta em energia do leite.

No presente estudo a suplementação com OE tendeu a aumentar ($P<0,1$) a concentração de ELL da dieta, sem no entanto alterar ($P>0,1$) o consumo de ELL, a secreção de ELL no leite e a eficiência de conversão da energia consumida em energia secretada no leite. Yang et al. (2007) não relataram efeito positivo de OE (alho ou junipero) na eficiência alimentar (kg de leite/CMS) de vacas leiteiras. Entretanto, Kung et al. (2008) reportaram efeito positivo de OE (Crina®) na eficiência alimentar de vacas leiteiras, assim como Tassoul et al. (2009) e Santos et al. (2010) (Crina® e Agolin Ruminant®, respectivamente).

Tabela 7. Concentração de ácidos graxos voláteis, amônia e pH no líquido ruminal de vacas suplementadas com aditivos de algas marinhas calcárias e/ou óleos essenciais mantidas em pastagem tropical.

	CONT	OE	AMC	OE+AMC	SEM	p-valor
AGV Totais (mM)	81,2a	99,35b	83,7a	92,78ab	5,66	0,025
Acetato (mM)	56,62a	69,95b	58,14a	64,71a	3,77	0,01
Propionato (mM)	14,74	17,55	15,27	17,06	1,24	0,174
Butirato (mM)	7,59	9,21	7,95	8,47	0,63	0,2
Valerato (mM)	0,62	0,75	0,65	0,67	0,06	0,427
Iso-valerato (mM)	1,03	1,19	1,07	1,17	0,12	0,59
Iso-burirato (mM)	0,61	0,71	0,63	0,7	0,06	0,353
Acetato:propionato	4,4	4,5	4,44	3,86	0,5	0,705
N-NH ₃ (mg dL ⁻¹)	7,42	9,03	9	8,98	1,45	0,733
pH	6,37ab	6,29a	6,66b	6,56ab	0,1267	0,063

CONT = sem aditivo; OE = 4g dia⁻¹ de óleos essenciais; AMC = 60g dia⁻¹ de algas marinhas calcárias Lithonutri®; OE+AMC = 4g dia⁻¹ de óleos essenciais Biophytus® e 60g dia⁻¹ de algas marinhas calcárias Lithonutri®

4.3. Parâmetros ruminiais

4.3.1. Ácidos graxos voláteis no rúmen

A suplementação com OE aumentou ($P<0,05$) a concentração de AGV em comparação com o tratamento Controle e o tratamento AMC (Tabela 7). A combinação OE + AMC apresentou concentração intermediária de AGV. Essa maior concentração de AGV totais é atribuível ao aumento ($P<0,05$) na concentração de acetato no fluido ruminal de animais suplementados com OE. Não houve efeito de tratamento ($P>0,05$) sobre as concentrações de propionato, butirato, valerato, iso-valerato, iso-burirato e sobre a relação acetato:propionato e a concentração de N-amoniaco ruminal. Apesar da concentração ruminal de acetato ter sido aumentada pelos OE, a relação acetato propionato não foi alterada em função do maior valor numérico da concentração de propionato ruminal.

Contrariamente aos resultados deste experimento, na maioria dos trabalhos avaliando óleos essenciais, não foram observados efeitos deste aditivo nas concentrações totais nem no perfil de AGV no rúmen de vacas leiteiras (Silva et al, 2018; Ferreira de Jesus et al, 2016; Vendramini et al, 2016; Yang et al, 2007; Benchaar et al 2007, 2006; Newbold et al 2004). No entanto, Giannenas et al (2011) relataram aumento na concentração de propionato no meio ruminal com doses crescentes de óleos essenciais (Crina®). Possivelmente a diferença em resultados seja devido aos diferentes princípios ativos das preparações de óleos essenciais e as diferentes doses utilizadas. São

poucos os experimentos que testam óleos essenciais individuais de uma única origem, normalmente a maioria são misturas difíceis de avaliar experimentalmente devido as interações entre eles e o ambiente ruminal.

Segundo Cardozo et al. (2005), os efeitos produzidos pelos extratos de plantas na fermentação bacteriana são dependentes do pH. Em situações de pH elevado, todos os extratos testados (anetol, eugenol, anis, orégano, canela, alho, pimento, cinamaldeído e iúca) no trabalho de Cardozo et al. (2005), exceto o de canela, mantiveram ou diminuíram a concentração de AGV totais e mantiveram ou aumentaram a relação acetato:propionato. Portanto é possível que os extratos de caju, mamona e copaíba incluídos na mistura de OE deste experimento possuam um comportamento diferente dos demais OE testados por Cardozo et al. (2005).

São poucos os trabalhos que avaliaram o efeito das AMC nas concentrações de AGV em vacas leiteiras. Cruywagen et al (2015) observaram aumento nas concentrações de AGV e de Acetato quando vaca leiteiras foram suplementadas com AMC (Acid Buf®). Os autores sugeriram que a falta de substâncias tamponantes no tratamento controle pode ter prejudicado o desenvolvimento das bactérias fibrolíticas devido ao menor pH do meio ruminal. No presente estudo, a suplementação com AMC não afetou ($P>0,05$) a digestibilidade da FDN (Tabela 4) nem os parâmetros de fermentação ruminal ($P>0,05$) em comparação com o tratamento Controle (Tabela 8). Provavelmente, o pH ruminal médio do tratamento controle (6,37) não foi suficientemente ácido para ter prejudicado o desenvolvimento das bactérias fibrolíticas.

4.3.2. pH ruminal

Houve diferença ($P<0,1$) em pH ruminal entre os tratamentos OE e AMC, mas não entre AMC e Controle (Tabela 8). Segundo Allen (1997) ainda que os principais AGV tenham constantes de dissociação similares, eles têm efeitos diferentes no pH ruminal por apresentarem diferentes taxas de absorção. O ácido acético tem maior efeito na redução do pH ruminal em comparação ao ácido propiônico que também tem maior efeito que o ácido butírico; a magnitude das diferenças aumenta a medida que diminui o pH ruminal (Allen, 1997). No presente trabalho, a diferença em pH ruminal entre os tratamentos OE e AMC parece se dever mais ao efeito positivo das AMC sobre o pH do que a um efeito negativo dos OE sobre este parâmetro.

Efeitos produzidos pelas algas marinhas sobre as mudanças no pH ruminal foram descritas por Cruywagen et al. (2015, 2007). Os autores reportaram aumentos de pH médio e redução do tempo que o pH permaneceu abaixo de 5,5 (4 vs. 13h, nos tratamentos com algas marinhas [Acid Buf®] e controle respectivamente) (Cruywagen et al. (2015). No experimento atual foi realizada uma medição de pH entre 2 a 4 horas após o fornecimento matinal de concentrado variando este tempo entre blocos. Devido a que no experimento de Cruywagen et al. (2015) as diferenças são mais marcantes entre 6-8h após o primeiro consumo do dia, é provável que o aumento no pH ruminal no presente experimento possa ser ainda maior com o avanço das horas.

Calitz (2009) mediu a capacidade tamponante das algas marinhas (Acid Buf®) em líquido ruminal *in vitro* e observou maior pH na presença do aditivo em comparação ao controle, porém a diferença foi estatisticamente significativa após o controle atingir níveis inferiores a 5,5 de pH. Os diferentes autores concordam que as algas marinhas são tamponantes de liberação lenta portanto não seria esperável grandes aumentos do pH mas sim aumento de tempo no qual o pH permanece acima do pH do tratamento sem aditivo (Cruywagen et al. 2015; Calitz, 2009; Beya, 2007).

Ferreira de Jesus et al. (2016), Giannenas et al. (2011), Newbold et al. (2004), Castillejos et al. (2006) e Meyer et al. (2009) não detectaram diferenças de pH ruminal quando adicionaram óleos essenciais em dietas de vacas

leiteiras. No entanto Benchaar et al. (2006, 2007, 2003) reportaram leves incrementos nos valores de pH. Benchaar et al. (2007) mencionou que a tendência no aumento de pH foi consistente com a redução na produção de AGV no tratamento de óleos essenciais com silagem de milho, porém essa relação foi contraditória no tratamento de óleos essenciais com silagem de alfafa (maior pH com maior produção de AGV). Gianennas et al. (2011) explicaram essa discrepância entre resultados em parte ao tipo de dietas e animais usados, com valores levemente maiores quando óleos essenciais foram fornecidos a animais consumindo dietas com maior proporção de forragem:concentrado. A dieta no trabalho de Benchaar et al. (2006) foi formulada com 52% de concentrado e no experimento atual o tratamento com óleos essenciais consumiu 54% da MS em capim, portanto é possível que os óleos essenciais tenham maior efeito em bactérias amilolíticas sem causar grandes diferenças em dietas que favoreçam a multiplicação principalmente das bactérias celulíticas. No entanto, resultados de experimentos *in vitro* (Cardozo et al., 2005; Busquet et al., 2005; Busquet et al., 2006) demonstraram que os óleos essenciais podem ser efetivos em altas doses (300 a 3,000 mg/L de meio de cultivo) porém têm pouco efeito sobre a fermentação microbiana em concentrações mais baixas (0,22 a 2,2mg/L de meio de cultivo). Segundo Benchaar et al (2006) 300 a 3000 mg de óleos essenciais por L de meio de cultivo corresponderia a consumir de 30 a 300g de óleos essenciais por dia, que seria de 7,5 a 75 vezes a dose utilizada neste experimento. Em experimentos *in vivo* não foram observados efeitos sobre as populações bacterianas totais, na população celulítica, nem na contagem de protozoários (Benchaar et al 2007; Wallace et al 2002).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os OE e as AMC, têm potencial para causarem alterações positivas nos parâmetros de fermentação ruminal. Os OE testados aumentam a concentração de ácidos graxos voláteis totais no rúmen, em particular o acetato, enquanto as AMC aumentam o pH do meio. Entretanto, no presente estudo, esses efeitos não foram suficientes para influenciar o desempenho de vacas leiteiras no terço final de lactação, mantidas em pastagens tropicais com suplementação concentrada.

REFERÊNCIAS

- ALLDEN, W.G.; WHITTAKER, I.A.M.D., 1970. The determinants of herbage intake by grazing sheep: the interrelationship of factors influencing herbage intake and availability. *Aust. J. Agric. Res.*, 21:755-66.
- ALLEN, M. S. 1997. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement of physically effective fiber. *J. Dairy Sci.* 80:1447–1462.
- ALVES, S; Cintia M.A.; Queiroga, R.C.; Madruga, M.S.; Parente, M.O.M.; Medeiros, A.N.; BessaJ, R.J.B.. *Dairy Sci.* 100:1–15.
- AMRUTKAR, S.A. 2006. Effect of high dietary level of limestone powder on nutrient utilization, mineral balances and plasma mineral profile in calves. M.V.Sc. Thesis, NDRI (Deemed University), Karnal (Haryana), India.
- ARGYLE, J.L.; BALDWIN, R. L. 1988. Modeling of Rumen Water Kinetics and Effects of Rumen pH Changes. *J Dairy Sci* 71:1178-1188.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington, 1990. 1094 p.
- BALANDRIN, M.F.; KLOCKE, J.A. 1985. Medicinal Plants. *Science* 229: 1036-1038.
- BARGO, F.; MULLER, L. D.; KOLVER, E.S.; DELAHOY, J.E. 2003. *Invited Review*: Production and Digestion of Supplemented Dairy Cows on Pasture. *J. Dairy Sci.* 86:1–42.
- BARKER, I.K.; VAN DREUMEL, A.A.; PALME, N. The alimentary system. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. *Pathology of domestic animals*. 4.ed. San Diego: Academic, 1995. 574p.
- BATISTEL, F.; de SOUZA J.; SANTOS, F.A.P. 2017. Corn grain-processing method interacts with calcium salts of palm fatty acids supplementation on milk production and energy balance of early-lactation cows grazing tropical pasture. *J. Dairy Sci.* 100:1–15.
- BENCHAAAR, C.; HRISTOV, A.N.; GREATHEAD, H. 2009. Essential oils as feed additives in ruminant nutrition, In: Steiner, T. (Ed.), *Phytogenics in Animal Nutrition. Natural Concepts to Optimize Serbester et al., J. Anim. Plant Sci.* 22(3):2012 562 Gut Health and Performance. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 111-146.
- BENCHAAAR, C.; PETTIT, H.V.; BERTHIAUME, R.; OUELLET, D.R.; CHIQUETTE, J. 2003a. Effects of essential oil supplement on ruminal fermentation, rumen microbial populations and in sacco degradation of dry matter and nitrogen in the rumen of lactating dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 83:637. (Abstr.)

- BENCHAAAR, C.; PETTIT, H.V.; BERTHIAUME, R.; WHYTE, T.D.; CHOUINARD, P.Y. 2006b. Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production and milk composition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89, 4352–4364.
- BENCHAAAR, C.; PETTIT, H.V.; BERTHIAUME, R.; OUELLET, D.R.; CHIQUETTE, J.; CHOUINARD, P.Y., 2007. 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. *J. Dairy Sci.* 90, 886–897.
- BENCHAAAR, C.; CALSAMIGLIA, S.; CHAVES, A.V.; FRASER, G.R.; COLOMBATTO, D.; MCALLISTER, T.A.; BEAUCHEMIN, K.A. 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production *Animal Feed Science and Technology*. 145: 209–228.
- BENCHAAAR, C.; HRISTOV, A.N.; GREATHEAD, H. 2009. Essential oils as feed additives in animal nutrition. In: Steiner, T. (ed.) *Phytogenes in Animal Nutrition*, Nottingham University Press. Nottingham, Uk.
- BENDER, R.W.; COOK, D.E.; COMBS, D. K. 2016. Comparison of in situ versus in vitro methods of fiber digestion at 120 and 288 hours to quantify the indigestible neutral detergent fiber fraction of corn silage samples. *J. Dairy Sci.* 99:1–7.
- BERCHIELLI, T.T.; RODRIGUEZ, N.M.; OSÓRIO NETO, E. et al. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. 583p.
- BERGMAN, E.N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.*, v.10, p.567-589, 1990
- BERNARD, J.K.; WEST, J.W.; MULLIS, N.; WU, Z.; TAYLOR, S.J. 2014. Evaluation of calcareous marine algae supplements on production and metabolic parameters of early lactation dairy cows. *Prof. Anim. Sci.* 30:649–656.
- BEYA, M.M. 2007. The effect of buffering dairy cows diets with limestone, Acid Buf or sodium bicarbonate on production response and rumen metabolism. MS Thesis. Stellenbosch Univ., Matieland, South Africa.
- BOHMANOVA, J.; MISZTAL, I.; COLE, J.B. 2007. Temperature-Humidity Indices as Indicators of Milk Production Losses due to Heat Stress. *J. Dairy Sci.* 90:1947–1956.
- BRANCO, A.F.; GIALLONGO, F.; FREDERICK, T.; WEEKS, H.; OH, J.; HRISTOV, A.N. 2015. Effect of technical cashew nut shell liquid on rumen methane emission and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98 :1–11.
- BREMMER, D.R.; OVERTON, T.R.; CLARK, J.H. Production and composition of milk from Jersey cows administered bovine somatotropin and fed ruminally protected amino acids. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 80, n. 7, p. 1374-1380, 1997.

- BRODERICK, G.A.; RENAL, S.M. 2009. Effect of source of rumen-degraded protein on production and ruminal metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.92, p.2822-2834.
- BURT, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 94, n.3, p.223-253.
- BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. 2005. Screening for the effects of natural plant extracts and secondary plant metabolites on rumen microbial fermentation in continuous culture. *Anim Feed Sci Technol* 123(124):597–613.
- BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. 2006. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 89:761-771.
- CABRAL, L.S.; VALADARES FILHO, S.C.; MALAFAIA, P.A.M.; DE LANA, R.P.; COELHO DA SILVA, J.F.; VIEIRA, R.A.M.; PEREIRA, E.S. 2000. Forage carbohydrate fractions and its degradation rates estimated by gas production techniques. *Braz. J. Anim. Sci.* 29:2087–2098.
- CALITZ, T. 2009. The effect of Acid Buf and combinations of Acid Buf and sodium bicarbonate in dairy cow diets on production response and rumen parameters. MS Thesis. Stellenbosch Univ., Matieland, South Africa. https://scholar.sun.ac.za/bitstream/handle/10019.1/3024/calitz_effect_2009.pdf?sequence=1 ultimo aceso 24/06/2016
- CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P.W.; CASTILLEJOS, L.; FERRET, A. 2007. Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 90:2580–2595.
- CARVALHO, P.C.F.; KOZLOSKI, G.V.; RIBEIRO FILHO, H.M.N.; REFFATTI, M.V.; GENRO, T.C.M.; EUCLIDES, V.P.B. 2007. Avanços metodológicos na determinação do consumo de ruminantes em pastejo. *R. Bras. Zootec.* vol.36 suppl.0 Viçosa.
- CASTILLEJOS, L.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. 2006. Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in in vitro systems. *J. Dairy Sci.* 89:2649–2658.
- CASTILLEJOS, L.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; LOSA, R. 2005. 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. *Anim. Feed Sci. Technol.* 119:29–41.
- Celtic Sea Minerals. 2014. Natural, bio-available minerals from the seabed. Accessed Dec. 11, 2014. <http://www.celticseaminerals.com/downloads/Corporate%20Brochure.pdf>.
- CHALUPA, W.; GALLIGAN, D.T.; FERGUSON, J.D. 1996. Animal nutrition and management in the 21st century: Dairy cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 58:1–18.

- CHANEY, A.L.; MARBACH, E.P. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry*, Washington, v. 8, p. 130-132.
- CLARK, J.H.; PLEGGE, A.W.; DAVIS, C.L.; MCCOY, G.C. 1989. Effects of calcium carbonate on ruminal fermentation nutrient digestibility and low performance. *J. Dairy Sci.*, 72: 493-500.
- CONGIO, G.F.S.; BATALHA, C.D.A.; CHIAVEGATO, M.B.; BERNDT, A.; OLIVEIRA, P.P.A.; FRIGHETTO, R.T.S.; MAXWELL, T.M.R.; GREGORINI, P.; DA SILVA, S.C. 2018. Strategic grazing management towards sustainable intensification at tropical pasture-based dairy systems. *Science of the Total Environment* 636 (2018) 872–880.
- CRUYWAGEN, C.W.; TAYLOR, S.J.; BEYA, M.M. 2007. The effect of buffering dairy cow diets with limestone, Acid Buf or sodium bicarbonate + limestone on production response and rumen parameters. *J. Dairy Sci.* 90 (Suppl.1): 561.
- CRUYWAGEN, C. W.; SWIEGERS, J.P.; TAYLOR, S.J.; COETZEE, E. 2004. The effect of Acid Buf in dairy cows diets on production response and rumen parameters. *J. Dairy Sci.* 87(Suppl. 1):46. (Abstr.)
- CRUYWAGEN, C.W.; TAYLOR, S.; BEYA, M.M.; CALITZ, T. 2015. The effect of buffering dairy cow diets with limestone, calcareous marine algae, or sodium bicarbonate on ruminal pH profiles, production responses, and rumen fermentation. *J. Dairy Sci.* 98:1–9.
- CQBAL. 2018. Tabelas Brasileiras de Composição de Alimentos para Ruminantes, disponível para consulta on-line. Maio. 9, 2018. <http://www.ufv.br/cqbal>.
- DANES, M.A.C.; CHAGAS, L.J.; PEDROSO, A.M.; SANTOS, F.A.P. 2013. Effect of protein supplementation on milk production and metabolism of dairy cows grazing tropical grass. *J. Dairy Sci.* 96 :407–419.
- DANIELLI, J.F.; HITCHCOCK, M.W.S.; MARSHALL, R.A.; PHILLIPSON, A.T. 1945. The mechanism of absorption from the rumen as exemplified by the behaviour of acetic, propionic and butyric acids. *J. Exp. Biol.* 22:75.
- DIJKSTRA, J.; BOER, H. ;VAN BRUCHEM, J.; BRUINING, M.; TAMMINGA, S. 1993. Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH, and rumen liquid volume. *Br. J. Nutr.* 69:385.
- DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88:308–316.
- DRONG, C.; MEYER, U.; VON SOOSTEN, D.; FRAHM, J.; REHAGE, J.; BREVES, G.; DANICKE, S. 2015. Effect of monensin and essential oils on performance and energy metabolism of transition dairy cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 100:537–551.

- EUROPEAN UNION. 2003. Regulation (EC) no. 1831/2003 of the European Parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. Off. J. Eur. Union 10/18/2003:L268/29–L268/43.
- ERDMAN, R.A. 1988. Dietary buffering requirements of the lactating dairy cow: a review. *J. Dairy Sci.* 71, 3246–3266.
- ERWIN, E.S.; MARCO, J.; EMERY, E.M. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.44, n. 9, p. 1768-1771.
- FERNANDEZ, J.A.; COPPOCK, C.E.; SCHAKE, L.M. 1982. Effect of calcium buffers and whole plant processing on starch digestibility of sorghum based diets in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 65: 242.
- FERREIRA DE JESUS, E.; DEL VALLE, T.A.; CALOMENI, G.D.; SILVA, T.H.; TAKIYA, C.S.; VENDRAMINI, T.H.A.; PAIVA, P.G.; SILVA, G.G.; NETTO, A.S.; RENNO, F.P. 2016. Influence of a blend of functional oils or monensin on nutrient intake and digestibility, ruminal fermentation and milk production of dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 219:59–67.
- GAUGHAN, J.B.; MADER, T.L.; HOLT, S.M.; JOSEY, M.J.; ROWAN, K.J. 1999. Heat tolerance of Boran and Tuli crossbred steers. *Journal of Animal Science* 77, 2398-2405.
- GAUGHAN, J. B.; MADER, S.M.; HOLT, S.M.; SULLIVAN, M.L.; HAHN, G.L. Assessing the heat tolerance of 17 beef cattle genotypes. *International Journal Biometeorology*, Heidelberg, v.54, p. 617-627, 2010.
- GERACI, J.I., GARCIARENA, A.D., GAGLIOSTRO, G.A., BEAUCHEMIN, K.A., COLOMBATTO, D. 2012. Plant extracts containing cinnamaldehyde, eugenol and capsicum oleoresin added to feedlot cattle diets: ruminal environment, short term intake pattern and animal performance. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 176:123- 130.
- GERSHENZON, J.; CROTEAU, R. 1991. Terpenoids. Pages 165–219 In *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. Vol. 1. G. A. Rosenthal, and M. R. Berenbaum, ed. Academic. Press, San Diego, CA.
- GRANT, R.J.; WEIDNER, S.J. 1992. Effect of Fat from Whole Soybeans on Performance of Dairy Cows Fed Rations Differing in Fiber Level and Particle Size. Vol 75, Issue 10, pg 2742-2751.
- GRIFFIN, S.G.; WYLLIE, S.G.; MARKHAM, J.L.; LEACH, D. N. 1999. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Fragr. J.* 14:322–332.
- GIANNENAS, I.; SKOUFOS, J.; GIANNKOPOULOS, C.; WIEMANN, M.; GORTZI, O.; LALAS, S.; KYRIAZAKIS, I. 2011. Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in Chios dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 94:5569–5577.
- GUSTAFSON, R. H.; BOWEN, R.E. 1997. Antibiotic use in animal agriculture. *J. Appl. Microbiol.* 83:531–541.

- HANSEN, P.J. 2004. Physiological and cellular adaptation of zebu cattle to thermal stress. *Animal Reproduction Science* 82-83, 349-360.
- HARVATINE, K. J.; ALLEN, M.S. 2006. Effects of fatty acid supplements on milk yield and energy balance of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:1081–1091.
- HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E.J.; GORRIS, L.G.M.; WRIGHT, A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46:3590–3595.
- HILLS, J.L.; WALES, W. J.; DUNSHEA, F. R.; GARCIA, S. C., ROCHE, J. R. 2015. *Invited review*: An evaluation of the likely effects of individualized feeding of concentrate supplements to pasture-based dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98 :1363–1401
- HRISTOV, A.N.; ROPP, J.K.; ZAMAN, S.; MELGAR, A. 2008. Effects of essential oils on in vitro ruminal fermentation and ammonia release. *Anim. Feed Sci. Tech.* 144:55-64.
- HRISTOV, A. N.; LEE, C. ; CASSIDY, T. ;HEYLER, K.; TEKIPPE, J.A.; VARGA, G.A.; CORL, B.; BRAMDT, R.C. 2013. Effect of *Origanum vulgare* L. leaves on rumen fermentation, production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:1189–1202
- HUMMELBRUNNER, L.A.; ISMAN, M.B. 2001. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *J. Agric. Food Chem.* 49(2):715-20.
- HUTJENS, M.F. 1991. Feed additives. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, Volume 7, Issue 2, Pages 525-540.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo agropecuário. Disponível em: <http://www.ibge.org.br>. Acesso em: 28 jan 2005.
- INGVARSTSEN, K.L.; ANDERSEN, J.B. 2000. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *J. Dairy Sci.* v.83, n.7, p.1573-1597.
- JALILZADEH-AMIN, G.; MAHAM, M.; DALIR-NAGHADEH, B.; KHEIRI, F., 2012. Effects of *Mentha longifolia* essential oil on ruminal and abomasal longitudinal smooth muscle in sheep. *J. Essent. Oil Res* 24, 61-69.
- JENKINS, T.C. 1993. Lipid Metabolism in the Rumen. *J. Dairy Sci.* 76:3851-3863,
- JOHNSON, C.R.; REILING, B.A.; MISLEVY, P.; HALL, M.B. 2001. Effects of nitrogen fertilization and harvest date on yield, digestibility, fiber, and protein fractions of tropical grasses. *J. Anim. Sci.* 79:2439–2448.

- KENNEDY, E.; O'DONOVAN, M.; DELABY, L.; O'MARA, F.P. 2008. Effect of herbage allowance and concentrate supplementation on dry matter intake, milk production and energy balance of early lactating dairy cows. *Livest. Sci.* 117:275–286.
- KENNELLY, J.J.; ROBINSON, B.; KHORASANI, G.R., 1999. Influence of carbohydrate source and buffer on rumen fermentation characteristics, milk yield, and milk composition in early-lactation Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 82, 2486–2496.
- KEYSER, R.B.; NOLLER, C.H.; WHEELER, L.J.; SCHAEFER, D.M. 1985. Characterization of limestones and their effects in vitro and in vivo in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 68: 1376.
- KHIAOSA-ARD, R.; ZEBELI, Q. 2013. Meta-analysis of the effects of essential oils and their bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in ruminants. *2014. J. Anim. Sci.* 91:1819–1830
- KOHLERT, C.; VAN RENSEN, I.; MARZ, R.; SCHINDLER, G.; GRAEFE, E.; VEIT, M. 2000. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animal and humans. *Planta Medica* 66:495–505.
- KRAUSE, K.M.; OETZEL, G.R. 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126:215–236.
- KUBO, I.; H. MUROI, AND M. HIMEJIMA. 1993. Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids. *J. Agric. Food Chem.* 41:1016–1019.
- KUNG JR, L.; WILLIAMS, P.; SCHMIDT, R.J.; HU, W. 2008. A Blend of Essential Plant Oils Used as an Additive to Alter Silage Fermentation or Used as a Feed Additive for Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 91:4793–4800.
- LANG, G.; BUCHBAUER, G. 2011. “A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review,”. *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 27,no. 1, pp. 13–39.
- LEE, R.E. *Phycology*. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University, 1999. 614 p.
- LOPES, N.M. Suplementação de vacas leiteiras com farinha de algas (*Lithothamnium calcareum*). 2012, Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- LUBI, M.C.; THACHIL, E. T. 2000. Cashew nut shell liquid (CNSL) - a versatile monomer for polymer synthesis, *Designed Monomers and Polymers*, 3:2, 123-153.
- MACKIE, R.I.; WHITE, B.A. 1990. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: Potential impact on nutrient output. *J. Dairy Sci.* 73:2971–2995.
- MALLONEE, P.G.; BEEDE, D.K.; COLLIER, R.J.; WILCOX, C.J. 1985. Production and physiological responses of dairy cows to varying dietary potassium during heat stress. *J. Dairy Sci.* 68:1479– 1487.
- MARTINS, M. F.; SARAN NETTO, A; LEME, P. R.; PINHEIRO, M. G.; TORRENT, J.; WELTER, K. C.; ARRUDA, I. 2015. Effects of functional oils and monensin supplementation on ruminal fermentation and milk

production and composition in Holstein cows under heat stress. *Journal of Animal Science*, v. 98, Suppl.2, (Abstr.).

MENDEL, M.; CHLOPECKA, M.; DZIEKAN, N.; KARLIK, W. 2017. Phytogenic feed additives as potential gut contractility modifiers—a review. *Animal Feed Science and Technology*, v. 230, p30-46.

MCGILLOWAY, D.A.; MAYNE, C.S. 1996. The importance of grass availability for the high genetic merit dairy cow. In: P.C. Garnsworthy, J. Wiseman, W. Haresign (eds) *Recent advances in animal nutrition*. University Press, Nottingham, 135-169.

MYERS, M.D.; LUDDEN, P.A.; NAYIGIHUGU, V.; HESS, B.W. Technical note: a procedure for preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *Journal of Animal Science*, Montana, v. 82, p. 179-193, 2004.

NAGARAJA, T.G.; TITGEMEYER, E.C. 2007. Ruminal acidosis in beefcattle: The current microbiological and nutritional outlook. *J. Dairy Sci.* 90(E. Suppl.):E17–E38.

NEWBOLD, C.J.; MCINTOSH, F.M.; WILLIAMS, P.; LOSA, R.; WALLACE, R.J. 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114:105–112.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th ed. Washington: National Academic Press, 2001. 381 p.

NOCEK, J.E. 1997. Bovine acidosis: Implications on laminitis. *J. Dairy Sci.* 80:1005–1028.

NOCEK, J.E.; BRAUND, D.G.; ENGLISH, J.E. 1983. Effect of limestone reactivity and percent on production by dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.*, 66: 2533.

OETZEL, G.R.; NORDLUND, K.V. 1998. Effect of dry matter intake and feeding frequency on ruminal pH in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81 (Suppl. 1), 297.

OUATTARA, B.; SIMARD, R.E.; HOLLEY, R.A.; PIETTE, G.J.P.; BÉGIN, A. 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int. J. Food Microbiol.* 37:155–162.

PALHANO, A. L.; CARVALHO, P.C.F.; DITTRICH, J. R.; MORAES, A.; DA SILVA, S. C.; MONTEIRO, A.L.G. 2007. Forage intake characteristics on mombacagrass pastures grazed by Holstein heifers. *Braz. J. Anim. Sci.* 34:1860–1870.

PANTOJA, J.; FIRKINS, J.L.; EASTRIDGE, M.L. 1995. Site of digestion and milk production by cows fed fats differing in saturation, esterification, and chain length. *J. Dairy Sci.* 78(10): 2247-58.

PEYRAUD, J.L.; COMERON, E.A.; WADE, M.H.; LEMAIRE, G. 1996. The effect of daily herbage allowance, herbage mass and animal factors upon herbage intake by grazing dairy cows. *Ann. Zootech.* 45, 201-217.

- PEYRAUD, J. L.; DELABY, L. 2001. Ideal concentrate feeds for grazing dairy cows responses to supplementation in interaction with grazing management and grass quality. Page 203 in Recent Advances in Animal Nutrition. P. C. Garnsworthy and J. Wiseman, eds. Nottingham University Press, UK.
- PLAIZIER, J.C.; KRAUSE, D.O.; GOZHO, G.N.; McBRIDE, B.W. 2008. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. Vet. J. 176:21–31.
- PATRA, A.; SAXENA, J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. Phytochemistry. 71: 1198–1222.
- PENNING, P.D.; RUTTER, S.M. 2004. Ingestive behaviour. In: PENNING, P.D. (Ed.). Herbage Intake Handbook. 2ed. Reading: The British Grassland Society.
- PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. 2004. Control de microorganismos por agentes físicos y químicos. Pages 145–162 in Microbiología. McGraw-Hill-Interamericana de España, Madrid, Spain.
- REIS, R.A.; Da SILVA, S.C. 2006. Consumo de forragens. In: BERCHIELLI, T. T. et al (Eds.) Nutrição de Ruminantes. Jaboticabal: FUNEP. p. 79-110.
- REUTER, H.D.; KOCH, J.P. ;LAWSON, L. 1996. Therapeutic effects and applications of garlic and its preparations. Pages 135–212 in Garlic: The Science and Therapeutic Application of *Allium sativum* L. and Related Species. H. P. Koch, and L. D. Lawson. ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- ROGERS, J.A.; DAVID, C.; CLARK, J.H. 1982. Alteration of rumen fermentation, milk fat synthesis, and nutrient utilisation with mineral salts in dairy cows. J. Dairy Sci. 65:577–586.
- ROGERS, J.A.; MULLER, L.D.; DAVIS, C.L.; CHALUPA, W.; KRONFELD, D.S.; KARCHER, L.F.; CUMMINGS, K.R. 1985. Response of dairy cows to sodium bicarbonate and limestone in early lactation. J. Dairy Sci., 68: 646.
- ROMERO, J. V. 2008. Carbohydrates and nitrogen compounds of Elephant grass (*Pennisetum purpureum*) cv. Cameron managed with fixed or variable interval of defoliation. Master's Thesis. University of Sao Paulo, Piracicaba, Brazil.
- RUSSELL, J.B.; CHOW, J. M. 1993. Another theory for the action of ruminal buffers salts: Decreased starch fermentation and propionate production. J. Dairy Sci. 76:826–830.
- SANCHEZ, W.K.; MCGUIRE, M.A.; BEEDE, D.K. 1994. Macromineral nutrition by heat stress interactions in dairy cattle: Review and original research. J. Dairy Sci. 77:2051–2079.
- SANTOS, F.A.P.; DÓREA, J.R.R.; SOUZA, J.; BATISTEL, F.; COSTA, D.F. 2014. Forage management and methods to improve nutrient intake in grazing cattle. In: 25th ANNUAL FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM, 2014, Gainesville. **Anais...** Gainesville: UF, 2014. P.142-164.

- SANTOS, F.A.P.; JUCHEM, S.O. 2000. Sistemas de produção de leite a base de forrageiras tropicais. In: FONTANELLI, R.R.; DURR, J.W. (Coord.). Sistemas de produção de leite. Passo Fundo: Editora da Universidade de Passo Fundo. 22-36p.
- SANTOS, F.A.P.; MARTINEZ, J.C.; VOLTOLINI, T.V.; NUSSIO, C.M.B. 2003. Utilização da suplementação com concentrado para vacas em lactação mantidas em pastagens tropicais. In: SIMPÓSIO GOIANO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE BOVINOS DE CORTE E LEITE, 5., Goiânia. Anais... Goiânia: CBNA, 2003. 289-346.
- SANTOS, M.B.; ROBINSON, P.H.; WILLIAM, P.; LOSA, R. 2010. Effects of addition of an essential oil complex to the diet of lactating dairy cows on whole tract digestion of nutrients and productive performance. *Animal Feed Science and Technology* 157, 64–71.
- SCHNEIDER, P.L.; BEEDE, D.K.; WILCOX, C.J. 1986. Responses of lactating cows to dietary sodium source and quantity and potassium quantity during heat stress. *J. Dairy Sci.* 69:99– 110.
- SHEAHAN, A. J., KOLVER, E. S., ROCHE, J. R. 2011. Genetic strain and diet effects on grazing behavior, pasture intake, and milk production. *J. Dairy Sci.* 94:3583–3591.
- SILVA, G.G.; TAKIYA, C.S.; DEL VALLE, T. A.; DE JESUS, E.F.; GRIGOLETTO, N.T.S.; NAKADONARI, B.; CORTINHAS, C.S.; ACEDO, T.S.; RENNÓ, F.P. 2018. Nutrient digestibility, ruminal fermentation, and milk yield in dairy cows fed a blend of essential oils and amylase. *J. Dairy Sci.* 101:1–12.
- SILVA, L.F.P. CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E DIGESTIBILIDADE "IN SITU" DA FRAÇÃO VOLUMOSA DE HÍBRIDOS DE MILHO PARA SILAGEM. *Sci. agric., Piracicaba*, v. 56, n. 1, p. 171-184, 1999.
- SKANDAMIS, P.N.; NYCHAS, G.E. 2000. Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs, and oregano essential oil concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1646–1653.
- SOULLENBERGER, L.E., BURNS, J.C. Canopy characteristics, ingestive behavior and herbage intake in cultivated tropical grasslands. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19, 2001, São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba: Fealq, 2001. p.321-327.
- SOLORZANO, L.C.; ARMENTANO, L.E.; GRUMMER, R.R.; DENTINE, M.R. 1989. Effects of sodium bicarbonate and sodium sesquicarbonate on lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 72:453–461.
- SOUZA, M.W.M. Intervalo de corte em cultivares de *Panicum maximum* Jacq. 2013. 27 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2013.

- SOUZA, J. 2014. Fontes de gordura alteram o desempenho e o metabolismo de vacas mantidas em pastagens tropicais. 164 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.
- SOUZA, J.; BATISTEL, F.; SANTOS, F.A.P. 2017. Effect of sources of calcium salts of fatty acids on production, nutrient digestibility, energy balance, and carryover effects of early lactation grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:1072–1085
- SOUZA, M.C.; OLIVEIRA, A.S.; ARAÚJO, C.V.; BRITO, A.F.; TEIXEIRA, R.M.A.; MOARES, E.H.B.K.; MOURA, D.C. 2014. *Short communication*: Prediction of intake in dairy cows under tropical conditions*. *J. Dairy Sci.* 97 :3845–3854.
- STAPLES, C.R., LOUGH, D.S., 1989. Efficacy of supplemental dietary neutralising agents for lactating dairy cows: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 23, 277–303.
- STASIUK, M.; KOZUBEK, A. 2010. Biological activity of phenolic lipids. *Cell. Mol. Life Sci.* 67:841-860.
- STOCKDALE, C. R. 2000. Levels of pasture substitution when concentrates are fed to grazing dairy cows in northern Victoria. *Aust.J. Exp. Agric.* 40:913–921.
- SWEENEY, R.A. 1989. Generic combustion method for determination of crude protein in feeds. *Journal of Official Analytical Chemists, San Diego*, v. 72, p. 770-774.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2010. *Fisiologia vegetal*. 4.ed. Porto Alegre:Artemed.
- TAMMINGA, S.; VAN VUUREN, M.1988. Formation and utilization of end products of lignocelluloses degradation in ruminants. *Anim. Feed Sci. Tech.*, v.21, p.141-159.
- TASSOUL, M.D.; SHAVER, R.D. 2009. Effect of a mixture of supplemental dietary plant essential oils on performance of periparturient and early lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92 :1734–1740.
- TEDESCHI, L.O.; FOX, D.G.; RUSSELL, J.B.; PELL, A.N.; Lanna, D.P.D.; BOIN, C. 2002. Development and evaluation of a tropical feed library for the Cornell Net Carbohydrate and Protein System model. *Sci. Agric.* 59:1–18.
- TEDESCHI, L.O.; FOX, D.G.; TYLUTKI, T.P. 2003. Potential environmental benefits of ionophores in ruminant diets. *J. Environ. Qual.* 32:1591–1602.
- TEIXEIRA, J.C.; TEIXEIRA, L.F.A.C. *Princípios de nutrição de bovinos leiteiros*. Lavras: UFLA/FAEP, 2001. 245p. (Textos acadêmicos).

- THOMAS, J. W.; EMERY, R.S.; BREAU, J.K.; LIESMAN, J.S. 1984. Response of milking cows fed high concentrate, low roughage diet plus sodium bicarbonate, magnesium oxide or magnesium hydroxide. *J. Dairy Sci.* 67:2532–2545.
- THORLACIUS, S. O.; LODGE, G. A. 1973. Absorption of steamvolatile fatty acids from the rumen of the cow as influenced by diet, buffers, and pH. *Can. J. Anim. Sci.* 53:279.
- ULTEE, A.; BENNIK, M.H.J.; MOEZELAAR, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1561–1568.
- VALADARES FILHO, S. C.; PINA, D.S. Fermentação ruminal. In: BERCHIELLI, T.T., PIRES, A.V., OLIVEIRA, S.G. (Ed.). *Nutrição de ruminantes*. Jaboticabal: FUNEP, 2011. p. 164
- VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. 1988. Manipulation of ruminal fermentation. In: Hobson, P.N. (Ed). *The ruminal microbial ecosystem*. Essex, England: Elsevier Science. p.87-443.
- VAN NEVEL, C.J.; DEMEYER, D.I.; HENDERICKX, H.K. 1971. Effect of fatty acid derivatives on rumen methane and propionate in vitro. *Appl. Microbiol.* 21:365–366.
- 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, n. 10, p. 3583-3597, 1991.
- VAN SOEST, P. J. 1994. Fiber. Pages 140–155 in *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2nd ed. Comstock Publishing Associates, London, UK. Wales, W.
- VENDRAMINI, T.H.A.; TAKIYA, C.S.; SILVA, T.H.; ZANFERARI, F.; RENTAS, M.F.; BERTONI, J.C.; CONSENTINI, C.E.C.; GARDINAL, R.; ACEDO, T.S.; RENNÓ, F.P. 2016. Effects of a blend of essential oils, chitosan or monensin on nutrient intake and digestibility of lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 214:12–21.
- WALLACE, R.J.; MCEWAN N.R.; MCINTOSH, F.M.; TEFEREDEGNE, B.; NEWBOLD, C.J. 2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation. *Asian Aust. J. Anim. Sci.* Vol. (15): 1458-1468.
- WALLACE, R.J.; McKAIN, N.; SHINGFIELD, K.J.; DEVILLARD, E. 2007. Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. *Journal of Lipid Research*. 48: 2247-2254
- WATANABE, Y.;SUZUKI, R.; KOIKE, S.;NAGASHIMA, K.; MOCHIZUKI, M.; FORSTER, R.J.; KOBAYASHI, Y. 2010. In vitro evaluation of cashew nut shell liquid as a methane-inhibiting and propionate-enhancing agent for ruminants. *J. Dairy Sci.* 93 :5258–5267.

- WEIGAND, E.; YOUNG, J. W.; MCGILLIARD, A. D. 1972. Extent of butyrate metabolism by bovine ruminoreticulum epithelium and the relationship to absorption rate. *J. Dairy Sci.* 55:589.
- WHEELER, W.E.; NOLLER, C.H. 1977. Gastrointestinal tract pH and starch in faeces of ruminants. *J. Anim. Sci.*, 44: 131.
- WHEELER, W.E.; NOLLER, C.H.; COPPA, C.E. 1976. Effect of forage to concentrate ratio compete feeds and feed intake on digestive starch by dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 58: 10.
- WEST, J.W.; MULLINIX, B.G.; SANDIFER, T.G. 1991. Changing dietary electrolyte balance for dair cows in cool and hot environments. *J. Dairy Sci.* 74:1662-1674.
- West, J. W. 2003. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 86:2131–2144.
- WILDMAN, E.E.; JONES, J.E.; WAGNER, P.E.; BOMAN, R.L.; TROUTT, H.F.; LESCH, T.N. 1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *Journal of Dairy Science*, Lancaster, v. 65, p. 495-501.
- WU, Z.; BERNARD, J. K.; TAYLOR S. J. 2015. Effect of feeding calcareous marine algae to Holstein cows prepartum or postpartum on serum metabolites and performance. *J. Dairy Sci.* 98:4629–4639.
- YANG, W.Z.; BENCHAAAR, C.; AMETAJ, B.N.; CHAVES, A.V.; HE, M.L.; MCALLISTER, T.A. 2007. Effects of Garlic and Juniper Berry Essential Oils on Ruminal Fermentation and on the Site and Extent of Digestion in Lactating Cows *J. Dairy Sci.* Vol 90 , Issue 12 , 5671 – 5681