



**AMILASE EXÓGENA E ÓLEOS ESSENCIAIS COMO
ALTERNATIVA À MONENSINA EM DIETAS DE VACAS
EM LACTAÇÃO**

LEILE DAIANE RIBEIRO FREIRE

2018



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**AMILASE EXÓGENA E ÓLEOS ESSENCIAIS COMO
ALTERNATIVA À MONENSINA EM DIETAS DE VACAS
EM LACTAÇÃO**

**Autora: Leile Daiane Ribeiro Freire
Orientador: Prof. DSc. Márcio dos Santos Pedreira**

**ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Março de 2018**

LEILE DAIANE RIBEIRO FREIRE

**AMILASE EXÓGENA E ÓLEOS ESSENCIAIS COMO
ALTERNATIVA À MONENSINA EM DIETAS DE VACAS EM
LACTAÇÃO**

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTORA EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientador: Prof. DSc. Márcio dos Santos Pedreira

Coorientadores: Prof. DSc. Luiz Gustavo Ribeiro Pereira
Prof. DSc. Herimá Giovane de Oliveira Silva

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Março de 2018

636.085 Freire, Leile Daiane Ribeiro Freire.
F933a Amilase exógena e óleos essenciais como alternativa à monensina em dietas de vacas em lactação. / Leile Daiane Ribeiro Freire. – Itapetinga-BA: UESB, 2018.

51f.

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTORA EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação do Prof. D.Sc. Márcio dos Santos Pedreira e coorientação do Prof. D.Sc. Luiz Gustavo Ribeiro Pereira e Prof. D.Sc. Herimá Giovane de Oliveira Silva.

1. Vacas leiteiras – Amilase e óleos essenciais. 2. Vacas leiteiras – Desempenho e composição do leite. 3. Dietas de vacas – Bioenergética - Respirometria. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Zootecnia, *Campus* de Itapetinga. II. Pedreira, Márcio dos Santos. III. Pereira, Luiz Gustavo Ribeiro. IV. Silva, Herimá Giovane de Oliveira. V. Título.

CDD(21): 636.085

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Vacas leiteiras – Amilase e óleos essenciais
2. Vacas leiteiras – Desempenho e composição do leite
3. Dietas de vacas – Bioenergética – Respirometria
4. Amido - Enzimas

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
Área de Concentração: Produção de Ruminantes

Campus Itapetinga-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “Amilase exógena e óleos essenciais como alternativa a monensina em dietas de vacas em lactação.”

Autor (a): Leile Daiane Ribeiro Freire

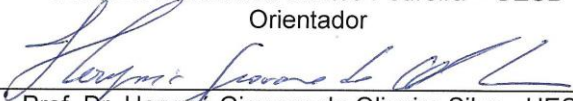
Orientador (a): Prof. Dr. Márcio dos Santos Pedreira

Co-orientador (a): Prof. Dr. Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PRODUÇÃO DE RUMINANTES, pela Banca Examinadora:




Prof. Dr. Márcio dos Santos Pedreira – UESB
Orientador



Prof. Dr. Heryná Giovane de Oliveira Silva - UESB



Prof. Dr. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes – UESB



Drª. Ana Paula Gomes da Silva – PNP/UESB



Prof. Dr. Dimas Oliveira Santos – UESB

Data de realização: 08 de março de 2018

Dedico a realização desse sonho e desta obra a meus pais, Rosilda e Jason (in memorian), por terem me dado a Vida;

De forma especial, aos meus padrinhos, Lia e Gil, pela dedicação ao meu sonho, pela força em meus momentos de fragilidade;

Ao meu esposo, Fabrício, pelo estímulo, confiança e todo Amor;

Aos meus mestres, por todos os ensinamentos compartilhados.

*A estes, dedico a obra, todo trabalho e a realização desse sonho,
como forma de gratidão por tudo o que fizeram,
por toda felicidade e todo amor,
e por toda minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me abençoar em cada ciclo de minha vida, fortalecendo-me para realizar este trabalho com muito amor;

A José Gabriel da Costa, por ser a Luz que guia minha vida;

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, por ter me possibilitado desenvolver este trabalho;

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, sem a qual este trabalho não seria possível;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos;

À Empresa DSM, pelo financiamento à pesquisa;

Ao professor Márcio Pedreira, pela Orientação, amizade e confiança;

Aos meus Coorientadores: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira, grata pela oportunidade de trabalhar com você, eu aprendi muito, principalmente a valorizar as boas atitudes e o trabalho do próximo; e Herimá Giovane de Oliveira Silva, pela disponibilidade de sempre;

Aos pesquisadores da EMBRAPA Gado de Leite: Thierry Ribeiro Tomich, Fernanda Samarini Machado e Mariana Magalhães Campos, agradeço pela oportunidade de trabalhar com vocês;

Aos Pós-doutorandos: Alexandre Lima, Daniela Oss, Juliana Melo, Fernando Pimont e Frederico Velasco, pela paciência e pela disposição em me auxiliar;

Aos funcionários e técnicos da EMBRAPA: Zé, Mengo, Luizinho, Betinho, Tetesco, Gilmar, Verônica, Mariano, Geovane, Zé Moreira, Meirinha, Binha, Cláudio, Chico, Armando, pelo apoio, por terem me amparado sempre que precisei e pelos momentos de descontração;

Ao meu Amigo Jhon Furlong, que não sabe o quão me fazia bem o “Bom dia, amiguinha!” e o sorriso de todo dia;

Ao meu querido amigo de todas as horas, João Paulo Sacramento, eu não tenho palavras pra agradecer tudo que fez e faz por mim, eu espero poder retribuir esse ato de amizade e carinho;

A Carlos Alberto (Jão), pelo auxílio nas coletas, foi muito importante pra mim tudo que você fez;

Ao meu amigo Abias, pela parceria; você é uma pessoa bem querida a mim, amigo de verdade;

Aos amigos que fiz na Embrapa: Brenna, Milane, Rebeca, Danieli e Polinarte. Sabemos a importância de um amigo na “Caverna do Dragão”, e vocês me auxiliaram a encontrar a saída, grata por tudo;

Aos estagiários: Matheus Verassani, Jean Carlos, Gustavo Moura, João Oliveira, Luana Cortes, Ana Luisa, Verônica, Samuel, Mateus Ribeiro e Isabela, vocês foram um pilar muito importante na condução do meu experimento, serei grata eternamente;

Ao meu grande amigo Abdias, por todo apoio, disposição e carinho nesses 11 anos de amizade e companheirismo. Superamos todas as dificuldades porque sempre tivemos um ao outro, amo-te meu amigo;

Sou grata ao meu amor Fabrício, por todas as alegrias compartilhadas comigo, por entender minha ausência e não me deixar desistir, pelo amor e carinho que sempre demonstrou por mim. Amo-te!

À Irmandade Vitória, por ser pra mim uma fonte de alegria e por me ensinar a viver em/na UNIÃO;

À minha linda família, por ser meu suporte, meu exemplo, e por nunca me abandonar. Eu amo vocês!!!

Sou grata a todos!!!

BIOGRAFIA

LEILE DAIANE RIBEIRO FREIRE, filha de Jason da Costa Freire e Rosilda Ribeiro Dias, nasceu em 17 de março de 1986, na cidade de Itabuna-BA. Concluiu o Ensino Médio no Centro Federal de Educação Tecnológica da Bahia – CEFET/Eunápolis/BA, em 2004. Em fevereiro de 2007, iniciou o curso de Zootecnia pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), finalizando-o em 2012. Durante a graduação, desenvolveu pesquisas como discente de iniciação científica da UESB e FAPESB, na área de Avaliação de Alimentos para Ruminantes. Ingressou no Programa de Pós-graduação em Zootecnia (Área de concentração: Produção de ruminantes) em abril de 2012, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, em Itapetinga/BA, como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), sob orientação do Prof. DSc. Márcio dos Santos Pedreira e obteve o título de Mestre em março de 2014, com a Dissertação intitulada: “Parâmetros metabólicos de ovinos confinados alimentados com ureia de liberação lenta na dieta.” Em março do mesmo ano, iniciou as atividades como doutoranda do referido programa de Pós-graduação, como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), sob a orientação do mesmo pesquisador, qualificando-se em agosto de 2017.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	Viii
ABSTRACT.....	ix
I – REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
1. Introdução Geral.....	2
1.1 Utilização dos aditivos.....	3
1.2 Moduladores de fermentação ruminal- Ionóforos.....	4
1.3 Monensina.....	5
1.4 Aditivos naturais como alternativa ao uso de ionóforos.....	7
1.5 Óleos essenciais.....	8
1.6 Amilase.....	10
1.7 Partição energética.....	12
1.8 Parâmetros sanguíneos.....	14
1.9 Referências.....	17
II – INTRODUÇÃO.....	25
III – OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos específicos	27
IV – MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Animais, Delineamento Experimental e Tratamentos.....	28
4.2 Avaliação do consumo.....	29
4.3 Análises dos parâmetros de desempenho e composição do leite.....	30
4.4 Ensaio de digestibilidade, balanço de nitrogênio e coleta de leite.....	31
4.5 Ensaio de respirometria e cálculos de partição energética.....	32
4.6 Processamento de amostras e análises laboratoriais.....	33
4.7 Parâmetros Sanguíneos.....	34
4.8 Procedimentos Estatísticos.....	35
V – RESULTADOS.....	37
VI – DISCUSSÃO.....	41
VII – CONCLUSÕES.....	48
VIII – REFERÊNCIAS.....	49

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Ingredientes e composição química das dietas experimentais.....	29
Tabela 2	Efeito da adição de amilase e substituição da monensina por OE no consumo de matéria seca, na produção de leite, constituintes e nitrogênio ureico no leite.....	37
Tabela 3	Efeito da adição de amilase e substituição da monensina por OE no consumo e digestibilidade dos nutrientes.....	38
Tabela 4	Efeito da adição de amilase e substituição da monensina por OE na emissão de CH ₄ entérico.....	38
Tabela 5	Efeito da adição de amilase e substituição da monensina por OE na partição e índices de eficiência energética.....	39
Tabela 6	Efeito da adição de amilase e substituição da monensina por OE na partição do nitrogênio.....	40
Tabela 7	Efeito da adição de amilase e substituição da monensina por OE nas concentrações plasmáticas de glicose, ureia, triglicérides, AGNE e D-3hidroxibutirato.....	40

RESUMO

FREIRE, Leile Daiane Ribeiro. **Amilase exógena e óleos essenciais como alternativa à monensina em dietas de vacas em lactação.** Itapetinga, BA: UESB, 2017. 51p. (Doutorado em Zootecnia, Área de Concentração em Produção de Ruminantes).*

Objetivou-se avaliar os efeitos da adição de amilase em dietas com monensina e a substituição da monensina por óleos essenciais (OE) no desempenho e composição do leite, no consumo e digestibilidade dos nutrientes, no metabolismo energético e do nitrogênio e trocas respiratórias de vacas leiteiras. Foram utilizadas 39 vacas recebendo dieta à base de silagem de milho e concentrado, e os tratamentos avaliados foram: Monensina, Monensin + Amilase e OE + Amilase, em delineamento inteiramente casualizado. A adição de amilase aumenta o consumo de matéria seca (CMS) e a produção de leite. O leite corrigido para gordura (LCG) e energia (LCE) foi maior para o grupo OE + amilase em comparação com Monensina + amilase (23,1 vs 22,3 e 21.3 vs 20.6 kg dia⁻¹, respectivamente), enquanto o FCM e ECM foi maior para monensina + amilase em comparação com monensina (22.3 vs 21.2 e 20.6 vs 19.5 kg dia⁻¹). O tratamento com OE + amilase apresentou maior teor de gordura, proteína e sólidos totais. O teor de gordura para OE + amilase foi 10,6% maior em comparação com os outros tratamentos. A substituição da monensin por OE não alterou a emissão de metano. A adição de amilase em dietas com monensina e a substituição da amilase por OE não influenciou a partição energética e o balanço de nitrogênio. A concentração plasmáticas de AGNE foi reduzida quando a monensina foi substituída por OE. Os óleos essenciais associados à amilase podem ser usados em dietas para vacas em lactação como substituto da monensina, pois melhora a eficiência e potencializa a produção de leite.

Palavras-chave: amido, bioenergética, enzima, respirometria.

* Orientador: Márcio dos Santos Pedreira, DSc. UESB e Coorientadores: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira, DSc. Embrapa Gado de Leite e Herimá Giovane de Oliveira Silva – Prof. DSc. UESB

ABSTRACT

FREIRE, Leile Daiane Ribeiro. **Exogenous amylase and essential oils as an alternative to monensin in diets of lactating cows.** Itapetinga, BA: UESB, 2016. 51p. (Thesis – Doctorate degree in Animal Science, Area of concentration in Production of Ruminants).*

The goal of this research was to evaluate the effects of amylase addition on diets with monensin. We also evaluated how the substitution of the monensin for OE affected the performance, the milk composition, in the consume and the digestibility of the nutrients, the nitrogen and energetic metabolism and respiratory changes. Thirty-nine lactating crossbred Gyr x Holstein cows (75 ± 34 DIM, $20,74 \pm 4,2$ kg milk/d, 502 ± 57 BW), receiving diet based on corn silage and concentrate (533: 467 g / kg), the evaluated treatments were: Monensin, Monensin + Amylase and OE + Amylase, in a completely randomized design. The addition of amylase increases dry matter intake (CMS) and milk production. Fat (FCM) and energy corrected milk (ECM) were higher for OE + amylase compared to monensin + amylase (23.1 vs 22.3 and 21.3 vs 20.6 kg day⁻¹ respectively), Whereas the FCM and ECM was higher for monensin + Amylase compared to Monensin (22.3 vs 21.2 and 20.6 vs. 19.5 kg day⁻¹). The treatment with OE + amylase presented higher content of fats, proteins and total solids. The fat content for OE + amylase was 10.6% higher compared to the other treatments. The replacement of monensin for OE did not change the methane emission. The addition of amylase in monensin diets and the substitution of amylase for OE did not influence the energetic partition or the balance of nitrogen. The plasma concentration of NEFA was reduced when the monensin was replaced for OE. The essential oils associated with amylase can be used in diets for lactating cows as a substitute for monensin, improve efficiency and potentiate milk production.

Keywords: bioenergetics, enzyme, respirometry, starch.

* Adviser: Márcio dos Santos Pedreira, DSc. UESB and Co-adviser: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira, DSc. Embrapa Gado de Leite e Herimá Giovane de Oliveira Silva – Prof. DSc. UESB.

I – REFERENCIAL TEÓRICO

1. Introdução Geral

A profissionalização da pecuária leiteira no Brasil é incentivada pelo aumento da demanda mundial por alimentos em razão do crescimento da população global, bem como pela abertura de mercados internacionais e, conseqüentemente, pela valorização dos produtos lácteos brasileiros. Por outro lado, à medida que se conquista novos mercados consumidores, a demanda por produtos seguros e de qualidade, aliada às novas políticas conservacionistas, geram um grande desafio para os pecuaristas brasileiros.

Nesse contexto, além do cumprimento das exigências ambientais, é necessária a implantação de tecnologias que garantam a qualidade dos produtos lácteos sem, no entanto, inviabilizar a atividade leiteira.

Os ionóforos são antimicrobianos tipicamente utilizados como aditivos em rebanhos comerciais de bovinos leiteiros, visando modular o consumo de matéria seca e aumentar a eficiência de produção de leite (Machado et al., 2011). A utilização dessas substâncias, além de aumentar a produtividade e melhorar o desempenho animal, tem o potencial de tornar os atuais sistemas de produção mais sustentáveis, especialmente devido a sua ação moduladora sobre a fermentação ruminal. A ação dos ionóforos no rúmen ocorre por mudanças na população microbiana, inibindo principalmente as bactérias Gram-positivas (RUSSEL, 1987).

A digestão de amido no trato gastrointestinal total geralmente não tem sido afetada pelos ionóforos. Entretanto, lasalocida e monensina reduzem a porcentagem de amido digerido no rúmen e aumenta a quantidade de amido digerido no intestino. Essa mudança no local de digestão deve resultar em mais energia, que é absorvida como glicose no intestino do que como AGV no rúmen, podendo, assim, permitir o uso mais eficiente desta. A monensina também pode aumentar a capacidade enzimática para a digestão do amido no intestino delgado, pois nota-se que uma maior atividade da amilase é encontrada nas fezes e pâncreas de bovinos que recebem monensina.

A principal crítica ao uso desses promotores de crescimento é que sua utilização poderia resultar na presença de resíduos dessas substâncias nos produtos de origem animal, uma vez que a maioria dos antibióticos não são totalmente metabolizados (Regitano e Leal, 2010). Por isso, a União Europeia proibiu, em 2006, a utilização dessas substâncias como

promotoras de desempenho, liberando o seu uso apenas para fins medicinais. Apesar de não utilizá-las em suas propriedades leiteiras, a comunidade europeia estabeleceu níveis considerados seguros e monitora os resíduos desses compostos nos produtos lácteos adquiridos de outros países.

A administração de óleos essenciais como alternativa aos ionóforos antibióticos na dieta de bovinos leiteiros permite um aporte energético para animais de elevado potencial produtivo, normalmente limitados pelo consumo de energia, para expressar seu máximo desempenho. De acordo com Palmquist e Mattos (2006), o fornecimento de lipídios para vacas leiteiras aumenta a capacidade de absorção de vitaminas lipossolúveis, o aporte de ácidos graxos essenciais e a eficiência de secreção de gordura no leite.

Além disso, dietas com inclusão de lipídios apresentam redução da metanogênese (Dohme et al., 2000) e da população de protozoários ciliados, o que, segundo Jouany (1996), favorece a colonização de bactérias celulolíticas, diminui a reciclagem de N microbiano e a concentração de amônia no rúmen.

1.1 Utilização dos aditivos

Segundo Instrução Normativa 44/2015, do Ministério da Agricultura, aditivo para produtos destinados à alimentação animal é: substância, microrganismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizada normalmente como ingrediente; tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais; melhore o desempenho dos animais sadios; ou atenda às necessidades nutricionais.

Sendo a nutrição uma das principais ferramentas para a produção leiteira atual, o estudo das substâncias capazes de modular a fermentação ruminal, com o intuito de melhorar o aproveitamento dos nutrientes pelos microrganismos ruminais, destaca-se como o tópico mais importante na nutrição de ruminantes.

Os nutrientes ingeridos são oportunamente utilizados pelos microrganismos para produzir ácidos graxos de cadeia curta e sintetizar proteína microbiana. Porém, este processo fermentativo não é tão eficiente na conservação de energia (perda de metano) e de proteína (perda por meio de nitrogênio amoniacal), podendo limitar a atividade produtiva e contribuir para a perda de nutrientes no ambiente.

De acordo com Segabinazzi (2008), é necessária a otimização do desempenho dos ruminantes através da manipulação dos padrões da fermentação ruminal, de modo que as alterações na composição da microbiota do rúmen potencializem a síntese de produtos provenientes da digestão dos alimentos, tornando-a mais eficaz e menos dispendiosa em termos de energia. Logo, o animal pode utilizar essa energia extra para crescimento, melhoria na conversão alimentar, ganho de peso ou produção de leite (Mertens, 1994).

1.2 Moduladores de fermentação ruminal – Ionóforos

Os ionóforos são assim chamados em função da sua propriedade transportadora de íons, possuindo capacidade de formar complexos lipossolúveis com cátions e mediar seu transporte através das membranas lipídicas (Pressman, 1968).

O uso das substâncias antimicrobianas com finalidade de aditivo zootécnico, melhorador de desempenho na alimentação animal, iniciou-se na década de 50. Estas podem ser divididas em dois grupos, ionóforos e não ionóforos, de acordo com o seu modo de ação.

A adição de moduladores de fermentação ruminal é estratégia amplamente empregada nas dietas de vacas leiteiras por melhorar a conversão alimentar (MORRIS et al., 1990; OWENS et al., 1991) e ainda, por sua praticidade no fornecimento da ração diária.

Algumas substâncias podem ser utilizadas para essa funcionalidade, sendo elas:

- Antimicrobianos ionóforos, que podem ser usados em dietas de ruminantes, sendo que, no Brasil, apenas três são registrados no Ministério da Agricultura e Abastecimento, a saber: Lasalocida, Monensina Sódica e a Salinomomicina Sódica;
- Antimicrobianos não ionóforos, sendo a Virginiamicina o principal exemplo dessa classe;
- Óleos essenciais;
- Probióticos.

Antibióticos ionóforos atuam na redução de perdas de energia e proteína no rúmen e no aumento do desempenho dos animais. O motivo desses ionóforos aumentarem o

desempenho de animais é atribuído principalmente à melhora da eficiência energética, devido ao aumento da digestibilidade dos alimentos, ao aumento da produção do ácido propiônico, com conseqüente redução da relação acetato/propionato, da diminuição da produção de metano e ácido láctico, e por reduzir as perdas de proteína e aminoácidos que seriam potencialmente fermentados em nível de rúmen (Russell; Strobel, 1989).

Embora a legislação classifique os ionóforos como antibióticos, fazendo seu uso ser cada vez mais criticado pela sociedade consumidora, sua utilização é prova de que a manipulação da fermentação ruminal contribui para o aumento do desempenho animal.

A utilização da monensina reduziu em 2% o consumo de matéria seca, aumentou a produção de leite em 2% e melhorou a eficiência na produção de leite em 77 trabalhos observados. O uso do aditivo também melhorou o escore da condição corporal e proporcionou mudanças sobre o ganho de peso (mais ganho ou menos perda) (Duffield et al., 2008).

1.3 Monensina

A monensina sódica é um ionóforo aprovado para uso em vacas leiteiras em lactação em vários países, incluindo Austrália, Argentina, Canadá, Brasil, Nova Zelândia, África do Sul e Estados Unidos. A monensina é um polieter carboxílico, produzido a partir do fungo *Streptomyces cinnamonensis* (Haney; Hoehn, 1967), que altera o fluxo dos íons monovalentes pela membrana das bactérias gram-negativas, alterando sua função normal e causando o rompimento desses microrganismos (Duffield; Bagg, 2000). A monensina é amplamente utilizada e a maioria das pesquisas envolvendo a utilização de ionóforos se baseia na utilização da mesma.

Em um estudo tradicional realizado por Schelling (1984), foi proposto sete modos de ação, através dos quais a monensina melhora o desempenho de ruminantes que, segundo o autor, são: 1) modificação na produção de ácidos graxos voláteis, pois todos os efeitos dos ionóforos são secundários ao fenômeno causado pela alteração da fisiologia normal da membrana celular dos microrganismos, então, de maneira geral, bactérias que produzem os ácidos láctico, acético, butírico e fórmico, e também o H₂ são susceptíveis aos ionóforos, enquanto bactérias produtoras dos ácidos succínico e propiônico, e aquelas fermentadoras de lactato são resistentes; 2) alteração na produção de gases, pois concomitantemente ao aumento do propionato, ocorre a redução na produção de metano; 3) alteração no consumo

de alimentos; 4) modificação na digestibilidade dos alimentos; 5) alteração no enchimento do rúmen e taxa de passagem; e 6) alteração na utilização de proteína.

A utilização de ionóforos para animais em lactação influencia a fermentação em nível ruminal, e isso tem afetado o desempenho produtivo de vacas em lactação. Os aumentos na produção de propionato e os decréscimos na produção de acetato, butirato e metano aumentam o aporte de glicose para a síntese de leite, influenciando diretamente a produção, devido ao maior número de precursores para a síntese de lactose.

Também, com efeitos adicionais da produção aumentada de glicose está o maior aporte de aminoácidos disponíveis para a gliconeogênese e a alteração do perfil hormonal, que podem modificar a partição dos nutrientes e a composição do leite (NRC, 2001).

O volumoso utilizado, o período de lactação, o nível de produção e a dose utilizada de monensina sódica são fatores que interagem e geram resultados, muitas vezes, contraditórios aos estudos que envolvem monensina sódica para vacas em lactação, sugerindo haver interações entre fatores dietéticos e fisiológicos envolvidos.

Em relação ao volumoso utilizado com a suplementação de monensina sódica, Eifert et al. (2005), utilizando silagem de milho como volumoso para vacas no início da lactação, com dose de 16 mg/kg MS de monensina, não encontraram diferença no consumo de matéria seca (17,8 vs 17,8 kg/dia) e na produção de leite (26,6 vs 25,9 kg/dia) em relação à ração controle, respectivamente. Gallardo et al. (2005) utilizaram pastagem de alfafa associada à suplementação de 16 mg/kg MS de monensina, para animais no mesmo período de lactação, e observaram diferença na produção de leite (27,7 vs 26,6 kg/dia) em relação à ração controle.

Gandra et al. (2010) avaliaram concentrações crescentes de monensina sódica nas dietas de vacas leiteiras no terço médio de lactação e seus efeitos sobre consumo, digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes, produção e composição do leite, fermentação ruminal, síntese de proteína microbiana, parâmetros sanguíneos e resíduos de monensina no leite. Os autores observaram redução linear do consumo e resposta quadrática sobre a produção de leite, resultando na maior eficiência produtiva, quando a dose utilizada foi de 24 mg/kg de matéria seca da dieta, similar ao observado em estudos anteriores.

Oelker et al. (2009) avaliaram dois tipos de volumosos, feno de alfafa e silagem de milho para vacas no terço médio de lactação, e com suplementação de 17 mg/kg MS de monensina e observaram diferença ($P < 0,05$) para produção de leite (38,4 vs 34,5 kg/dia) e digestibilidade da matéria seca (70,0 vs 64,6%), quando comparadas ao controle. No

entanto, não observaram diferença no consumo de matéria seca (21,7 vs 20,6 kg/dia), respectivamente, para silagem de milho e feno de alfafa.

A monensina proporciona ainda mudança nos parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras, principalmente no metabolismo energético, através da glicose, ácidos graxos não esterificados e β -hidroxibutirato. Da Silva et al. (2007) avaliaram a suplementação de monensina em dose de 20 mg/kg MS em vacas no início de lactação, e não encontraram nenhum efeito sobre o colesterol total, colesterol-HDL e triglicérides, no entanto, observou efeito da monensina sobre a concentração plasmática de colesterol- LDL em relação à ração controle.

1.4 Aditivos naturais como alternativa ao uso de ionóforos

Com a restrição da União Europeia quanto à utilização dos antimicrobianos como moduladores da fermentação ruminal, alternativas naturais vem sendo pesquisadas para substituição dos ionóforos.

Assim, surge alternativas com a necessidade de adequar o modelo de suplementação com as restrições do cenário internacional, e a possibilidade de mudanças também na produção nacional.

Ainda são pouco explorados estudos a cerca do uso de aditivos na nutrição animal, com isso, o conhecimento da eficiência dos mesmos são escassos, porém, a linha de pesquisa relacionada ao uso destes vem crescendo e as substâncias utilizadas são variadas.

A monensina destaca-se como alternativa, com possíveis características a serem aproveitadas para a alimentação animal, promovendo melhor desempenho destes.

A seleção cuidadosa e a combinação de diferentes aditivos podem permitir a manipulação da degradação de proteínas no rúmen (Cardozo et al. 2004). Segundo Calsamiglia et al. (2006), com a finalidade de encontrar alternativas para modulação ruminal, pesquisas vêm sendo conduzidas substituindo os ionóforos por produtos alternativos de melhor impacto para o mercado consumidor, dentre as alternativas, destacam-se os óleos essenciais.

1.5 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos secundários, obtidos por destilação a vapor ou extração por solvente de várias partes de plantas (por exemplo, folhas, flores, caules e sementes). Estes óleos são os componentes voláteis responsáveis, na maioria das vezes, pelo aroma característico de especiarias.

Óleos extraídos de determinadas plantas podem interagir com a membrana celular microbiana e inibir o desenvolvimento de algumas bactérias ruminais gram-positivas e gram-negativas.

Os óleos essenciais também parecem ser alternativa natural como aditivo para o uso de promotores de crescimento em rações destinadas à alimentação animal. Nos últimos anos, resgatou-se o interesse que começou acerca de 50 anos na utilização de tais compostos, o qual foi desestimulado com o uso dos ionóforos (Crane, 1957).

Segundo a Comissão Europeia para o Desenvolvimento, as pesquisas com óleos essenciais se intensificaram por duas razões principais: em primeiro lugar, para encontrar uma alternativa natural após a proibição do uso de antibióticos como aditivos para alimentação animal em vários países; e segundo, pelo aumento de preocupações sobre os efeitos ambientais da produção de ruminantes.

Desde a declaração da proibição de antimicrobianos como aditivos de alimentos na União Europeia, tem havido interesse crescente pelo estudo dos efeitos e mecanismos de ação de óleos essenciais na fermentação microbiana ruminal.

Os trabalhos envolvendo os óleos essenciais são, na maioria, realizados *in vitro*, sendo úteis para uma avaliação inicial da atividade dos óleos essenciais, suas atividades antimicrobianas, dosagens e adequadas concentrações, para posteriormente serem avaliados *in vivo*.

Crane et al. (1957) foram provavelmente os primeiros a demonstrar os efeitos dos óleos essenciais sobre a fermentação ruminal, verificando que limoneno e pineno eram capazes de inibir a formação de CH₄. Atividades antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, inseticida, antiprotozoários e antioxidante já foram observadas em muitos óleos essenciais (Burt, 2004).

Os óleos essenciais apresentam uma atividade antibacteriana seletiva, com o espectro de atividade antibacteriana variando com os compostos testados (Janssen et al., 1986; Lis-Balchin; Deans, 1997; Demetzos et al., 1997).

Benchaar et al. (2006b) não encontraram mudança na produção e composição do leite de vacas alimentadas com 2 g/vaca/dia de Crina Ruminants. Quanto à composição do leite, os autores encontraram diferença na concentração de lactose do leite, que foi maior para as vacas suplementadas com o aditivo.

Estudos anteriores ainda sugeriram que os óleos essenciais poderiam alterar a fermentação ruminal (OH et al., 1967), aumentando a eficiência energética, melhorando o metabolismo proteico e diminuindo o risco de acidose ruminal. A atividade microbiana, medida pela produção de gás durante incubações *in vitro*, foi inibida ou aumentada dependendo da natureza do óleo essencial adicionado (OH et al., 1967, 1968).

Para o efeito do tratamento com óleos essenciais sobre a produção de leite, Tassoul e Shaver (2009) relataram nenhum efeito na produção de leite trabalhando com vacas no início de lactação, diferentemente de Kung et al. (2008) que observaram aumento de produção em vacas no meio de lactação.

Já Giannenas et al. (2011), trabalhando com 80 ovelhas em lactação suplementadas com óxido de etileno aos níveis de 50, 100 e 150 mg / kg, observaram o efeito do tratamento sobre a produção diária de leite, sendo significativa a inclusão de óleos essenciais, em dose-dependente, de maneira que a produção média de leite foi 1,565 L / d para controle versus 1,681, 1,876 e 2,119 L / d.

O suplemento Crina® Ruminantes é uma mistura de componentes de óleo essenciais contendo de 100 a 300 g / kg de compostos fenólicos, incluindo cresol, resorcinol, timol, eugenol, guaiacol (Rossi, 1994).

No que se refere ao consumo dos animais suplementados, Benchaar et al. (2007b) não observaram alteração no consumo de matéria seca, quando as vacas em lactação foram alimentadas com uma mistura de óleos essenciais (0,75 g / d; Crina Ruminantes). Trabalhando em uma dosagem maior de uma mistura de compostos de óxido de etileno (2 e 4 g / cabeça por dia), esses autores, em outro trabalho, observaram um aumento na ingestão de matéria seca de bovinos de corte alimentados com silagem (Benchaar et al., 2006b).

Calsamiglia et al. (2007), compilando trabalhos *in vitro* e *in situ*, concluíram sobre os efeitos ruminais dos óleos essenciais, ao observar que os mesmos inibem a desaminação e metanogênese, resultando em menor NH₃-N, metano e acetato, e propicia concentrações mais elevadas de propionato e butirato. Todavia, as respostas são variáveis aos óleos essenciais, a combinação dos mesmos e sua suplementação. Os autores ainda averiguaram que os efeitos de alguns destes óleos essenciais são dependentes do pH e da dieta.

Com relação à ingestão de matéria seca e produção de leite, Tassoul e Shaver (2009) constataram que 1 g/d de mistura de óleos essenciais (Crina® Ruminants) reduziu em 7% a ingestão de matéria seca, com ausência de efeito sobre a produção de leite. A mistura de óleos essenciais Crina Ruminants consiste de uma mistura incluindo óleo de timol, eugenol, vanilina, guaiacol e limoneno (Mcintosh et al., 2003; Castillejos et al., 2005).

Estudos demonstraram que óleos essenciais reduziram a produção de CH₄ entre 74% e 69%, efeito inclusive mais pronunciado do que o observado para a monensina (Busquet et al., 2005a). Os mesmos pesquisadores verificaram que estas substâncias aumentaram a proporção de propionato e reduziram a de acetato (Busquet et al., 2005b). Óleos essenciais podem ainda inibir a proteólise ou estimular a quebra de peptídeos, já que foi comprovada a diminuição de 18% na concentração de peptídeos de cadeia longa devido à adição de 5 mg/L de uma mistura de óleos essenciais (Castillejos et al., 2006).

Fernandez et al. (1997) mostraram que um produto comercial de compostos de óleos essenciais misturados inibiu a degradação da proteína no rúmen, aumentando, assim, o aporte de proteína dietética para o trato digestório posterior ao rúmen.

Trabalhos encontrados na literatura são altamente variáveis com a utilização de óleos essenciais. Por exemplo, conforme trabalho já mencionado, Tassoul e Shaver (2009) relataram nenhum efeito na produção de leite e depressão na ingestão de matéria seca, o mesmo produto que resultou no aumento da produção de leite no estudo de Kung et al. (2008).

Essa variabilidade na resposta animal não é surpreendente e é resultado de uma série de fatores, incluindo a fonte do óleo essencial, a composição da dieta utilizada, dosagens, condições experimentais e diversas outras (Benchaar et al. 2009).

1.6 Amilase

Amilase é uma enzima catalisadora da hidrólise da amilopectina, da amilose e do glicogênio em maltose e dextrinas. Os ruminantes apresentam a amilase pancreática, sendo uma enzima da classe das hidrolases que atua extracelular para clivar o amido e o glicogênio que são ingeridos na dieta.

Quando o amido representa o principal componente em dietas de animais de alta produção, como em confinamento, o uso de enzimas que manipulem sua digestão no rúmen poderá promover aumento da produtividade (Tricarico et al., 2008). Segundo

Huntington (1997), a digestão ruminal do amido é um dos fatores mais importantes na determinação do desempenho de ruminantes alimentados com dietas de alto concentrado.

Portanto, a suplementação exógena de amilase poderia ser empregada para diminuir as variações inexplicáveis da degradação ruminal de amido em fontes ricas deste componente na dieta. Teoricamente, a suplementação com α -amilase aumenta a disponibilidade dos produtos da hidrólise do amido no rúmen, alterando, conseqüentemente, os processos de fermentação ruminal.

Além dos requisitos para manutenção e crescimento, as vacas leiteiras enfrentam maiores demandas de nutrientes durante a lactação. Os carboidratos são usados como a principal fonte de energia, normalmente fornecendo mais da metade da energia nas dietas de gado (Nafikov e Beitz, 2007). A maioria das dietas para gado leiteiro em lactação nos Estados Unidos contém 25 a 30% de amido (Ellis et al., 2011; DeVries e Gill, 2012; Golder et al., 2012).

A alta degradação ruminal do amido fornece substrato para suportar a produção de AGV e o crescimento microbiano e, por conseguinte, a produção de enzimas microbianas e a produção de proteína microbiana. Essa degradação enzimática é crucial para o metabolismo do corpo inteiro porque precursores de glicose e outros “combustíveis” são gerados através dele para o metabolismo hospedeiro-animal (Lemosquet et al., 2009).

A inclusão de amilase em dietas para vacas de alta produtividade é projetada para aumentar a utilização de carboidratos em rações. Em muitos animais não-ruminantes, as glândulas salivares secretam amilase para começar a quebrar o amido, assim que o alimento entra na boca. Os ruminantes não têm amilase salivar (McDougall, 1948); A população microbiana no rúmen é, em grande parte, responsável pela degradação do amido.

O uso da enzima alfa amilase proporciona uma melhor ambiência ruminal e reduz a excreção de amido nas fezes, proporcionando melhor eficiência alimentar e redução do custo de produção da arroba produzida no confinamento. Amilase faz a hidrólise do amido no ambiente ruminal, transformando o amido em oligossacarídeos, que é estável no rúmen (pH e temperatura) e não causa redução no pH ruminal, o que beneficia o controle da acidose e melhora todo o metabolismo energético do bovino confinado. Produtos formulados com essa tecnologia são indicados para confinadores que trabalham com mais de 25% de amido na dieta.

A adição de amilase foi avaliada principalmente como um método para aumentar a degradabilidade do amido ruminal, mas a literatura sugere que a amilase pode melhorar a

produtividade de vacas em lactação, independentemente dos efeitos na digestão do amido do trato total (DeFrain et al., 2005; Cabrita et al., 2007, Ferraretto et al., 2011). De fato, uma das respostas mais consistentes à amilase exógena é um aumento na digestibilidade da FDN (Bowman et al., 2002, Gencoglu et al., 2010).

Embora o mecanismo exato não seja conhecido, a adição de amilase a rações para vacas em lactação mostrou aumento na digestibilidade da FDN (Gencoglu et al., 2010; Weiss et al., 2011). Segundo Klingerman et al (2009), o RumiStar melhora significativamente a digestibilidade da MS, MO e FDN em dietas baseadas em silagem de milho como volumoso. Isso resultou em aumento do leite corrigido para gordura em 3,6 kg e melhor eficiência na produção de leite. No entanto, os resultados não são constantes, Hristov et al. (2008), utilizando baixas concentrações dos complexos enzimáticos contendo amilases, não observaram nenhum efeito sobre a fermentação ruminal, síntese de proteína microbiana e digestão de nutrientes em vacas leiteiras. Por outro lado, Klingerman et al. (2009) observaram aumento na produção leiteira com a adição do complexo enzimático, apesar de seu mecanismo não ser totalmente conhecido.

Tricarico et al. (2005), avaliando os efeitos da α -amilase, nos níveis 0; 240; 480 e 720 DU/kg de MS, para vacas de leite, encontraram aumento linear da concentração de glicose plasmática e não verificaram incremento no desaparecimento ruminal do amido, porém, verificaram aumento na produção de leite e na proporção de gordura no leite, com a adição de 240 unidades dextrinizantes/kg de matéria seca da dieta.

1.7 Partição da energia

A partição da energia consiste em avaliar a quantidade de energia contida em um alimento ou dieta e quantificar as perdas dessa mesma energia nos processos fisiológicos.

A energia química presente nos alimentos, obtida através da sua combustão completa até CO_2 e H_2O , é chamada de Energia Bruta (EB) (White 1928; Sturtevant, 1945; Kleiber, 1950a, citados por Kleiber 1972). A quantidade de energia bruta de um alimento depende da sua composição química, mas guarda pouca relação com o que está disponível para o animal, apesar de, em grande parte, o animal utilizar a oxidação como forma de gerar energia. Isso porque existem perdas no processo de digestão e metabolização que são extremamente variáveis.

Descontando a primeira ineficiência que é a energia perdida nas fezes, sobra a porção da energia química que é absorvida pelo organismo, chamada Energia Digestível (ED). Essa perda varia de acordo com a digestibilidade dos alimentos. A proporção de energia digestível disponível para o animal em relação à energia bruta do alimento pode variar de 0,30, para forragens muito maduras, a 0,90, para grãos processados e de alta qualidade. O valor da energia digestível possui importância na avaliação do alimento ou dieta por refletir sua digestibilidade. Entretanto, falha ao considerar as perdas ocorridas em função de processos digestivos, podendo superestimar o valor de energia digestível para dietas de baixa digestibilidade (ricas em forragem) em relação a dietas ricas em grão, de alta digestibilidade (NRC, 2000).

A segunda perda de energia, ou seja, a próxima ineficiência do processo ocorre no metabolismo da energia absorvida (digestível). Essa ineficiência decorre da perda de energia através da urina e dos gases. A perda através dos gases é particularmente importante para ruminantes, por causa da fermentação ruminal. Descontadas as perdas da energia da urina mais as dos gases (principalmente metano) ARC (1980), ficamos com a Energia Metabolizável, ou energia disponível às células do animal.

A produção de metano em ruminantes corresponde, em média, a uma perda energética equivalente a 6% da energia bruta ingerida (Johnson e Johnson, 1995). A eficiência em converter a energia digestível em energia metabolizável é cerca de 0,80, podendo essa relação variar consideravelmente em função do nível de ingestão de matéria seca, idade do animal e tipo da dieta (ARC, 1980; NRC 2000).

A terceira perda de energia seria o Incremento Calórico, que é a perda energética na forma de calor inerente à metabolização dos alimentos. Subtraindo-se o incremento calórico da Energia Metabolizável, tem-se a Energia Líquida, que é efetivamente a energia disponível para o animal sobreviver e produzir.

Parte da Energia Líquida vai para o metabolismo basal do animal que, basicamente, seria responsável pela manutenção da temperatura corporal, potencial de membranas e “turnover” de macromoléculas, conhecida como Energia Líquida de Manutenção. A outra parte da energia seria a responsável pela produção animal, isto é, seria a Energia Líquida de Produção, usada para crescimento ou secreção dos produtos animais (carne, leite, gestação).

As vantagens do sistema de energia líquida seriam que: 1) a energia expressa como energia líquida é independente do tipo de dieta; e 2) os valores de energia do alimento são

determinados separadamente para diferentes funções fisiológicas, isto é, manutenção, ganho, lactação e gestação.

A partição energética pode ser visualizada no esquema da figura 1

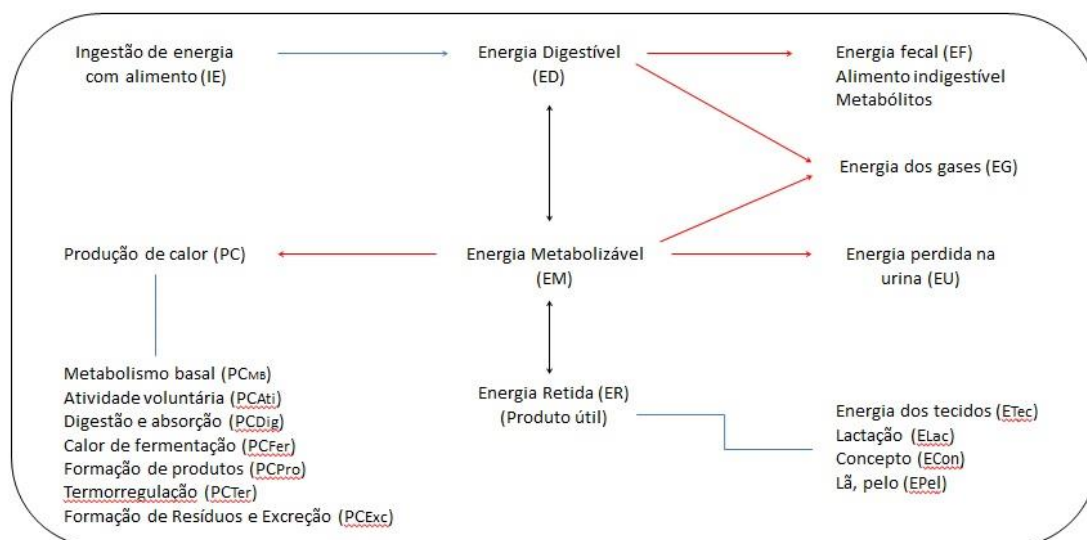


Figura 1 - Partição da energia do alimento no animal. Fonte: Adaptado do NRC (1981).

1.8 Parâmetros sanguíneos

Os parâmetros sanguíneos apresentam relação com o metabolismo proteico, energético e enzimático (no músculo e no fígado) dos animais.

Variações dos metabólitos sanguíneos em vacas leiteiras permitem estimar o processo de adaptação metabólica a novas situações fisiológicas ou de alimentação. Estudos citados na literatura apontam resultados inconsistentes com relação aos efeitos da suplementação de gordura nas rações sobre o metabolismo de ruminantes. De acordo com Christensen et al. (1994), o metabolismo ruminal, absorção intestinal, transporte sistêmico, metabolismo sistêmico, secreção e deposição de gordura no organismo são aspectos diretamente ligados ao metabolismo de lipídios e podem influenciar os parâmetros sanguíneos em animais recebendo gordura nas rações.

O principal regulador do metabolismo de energia nos mamíferos é a glicose sanguínea (Lehninger et al., 1995). Os ruminantes apresentam uma peculiaridade, pois apenas 5% da glicose ingerida é absorvida diretamente (Herdt, 1988). A maior parte da glicose oriunda da dieta sofre fermentação ruminal, sendo convertida a ácidos graxos

voláteis e, com isto, faz-se necessário um constante estado de gliconeogênese para suprir a demanda de glicose (Herdt, 1988).

Quando há redução de CMS, pouco propionato é produzido no rúmen, sendo este o principal precursor de glicose em ruminantes (Fernandes et al., 2012), reduzindo, assim, a glicose circulante. Com a condição de hipoglicemia, o organismo reduz a produção de insulina e, dessa forma, o organismo passa a entender que falta energia e que há necessidade de mobilizar reservas corporais.

De acordo com Bell et al. (2011), a cada kg de leite produzido são necessários 72g de glicose que, em sua maioria, é convertida em lactose. Entretanto, no início da lactação, a fermentação dos AGVs só podem atender cerca de 85% das necessidades de glicose, causando um déficit diário de 500g de glicose.

A avaliação dos valores de ureia no sangue indica o estado da nutrição proteica, avaliando o seu balanço no metabolismo animal. Durante a fermentação ruminal, sempre que a concentração de amônia exceder o nível de utilização pelos microrganismos, a mesma é absorvida e, através da circulação entero-hepática, chega ao fígado, onde é transformada em ureia que, juntamente com a ureia produzida no fígado a partir do metabolismo de aminoácidos, constituem a maior parte da ureia plasmática. Parte dessa ureia é reciclada, via saliva e parede ruminal, e volta para o rúmen, e a outra é excretada através da urina (Butler, 1998, Butler et al., 1996).

A concentração de ureia plasmática em ruminantes está diretamente relacionada com o consumo de proteína e tem sido usada para verificar o estado nutricional proteico dos animais (Ruas et al., 2000). A ureia difunde-se facilmente nos tecidos do organismo dos bovinos. Quando a taxa de produção de amônia é maior que a sua utilização pelos microrganismos ruminais, observa-se alteração da concentração de NH_3 no rúmen, com consequente excreção de ureia e aumento do custo energético da produção de ureia, resultando, assim, em perda de proteína (Morrison & Mackie, 1996).

Níveis acima dos valores basais aumentam a excreção urinária de ureia, sugerindo desperdício da proteína dietética, sendo que, em vacas leiteiras, as concentrações de ureia no leite são altamente correlacionadas com as concentrações plasmáticas de ureia (Butler et al., 1996).

Os AGNE são produtos da mobilização da reserva lipídica e são considerados indicadores para avaliação do déficit energético (Brickner et al., 2007; Ospina et al., 2010a). Uma das primeiras respostas do organismo ao balanço energético negativo (BEN)

é a mobilização do tecido adiposo e a capacidade do tecido muscular esquelético de utilizar AGNE para gerar energia para manutenção (Overton & Waldron, 2004).

Os AGNE são usados como fonte de energia pelo fígado e por outros tecidos e sua oxidação celular faz parte dos sinais fisiológicos de saciedade (Van Saun, 2000).

Segundo Drackley et al. (1992), as concentrações plasmáticas de AGNE e BHBA aumentam durante a cetonemia. Isso ocorre quando a demanda energética do animal é maior do que a ingestão de nutrientes, havendo maior taxa de lipólise comparada a de lipogênese, resultando em maior hidrólise de triglicerídeos e liberação de AGNE e glicerol. Os AGNE são utilizados como fonte energética nos tecidos, podendo ainda serem redirecionados para o fígado, onde serão completa ou parcialmente oxidados, produzindo CO₂ e acetil-CoA, respectivamente. Quando estes são parcialmente oxidados, o acetilCoA originado pode ser convertido a corpos cetônicos, BHBA, acetoacetato e acetona (Lehninger et al., 1995).

O β-hidroxibutirato é um importante indicador de cetose subclínica, patologia derivada da mobilização de gordura como resposta ao BEN (Enjalbert et al., 2001). O BHBA é um corpo cetônico fisiologicamente produzido no rúmen. No entanto, sob condições de balanço energético positivo, seus valores no soro são baixos. O BHBA predomina na circulação e apresenta correlação com as concentrações plasmáticas de acetoacetato, mas este é instável, enquanto o BHBA é relativamente estável (Duffield et al., 2009).

Os corpos cetônicos são principalmente excretados no leite e na urina (Baird, 1982; Kaneko et al., 1997; Andrews et al., 2004; Smith, 2008). As taxas de cetose subclínica são influenciadas pelos valores de BHBA, sendo seus valores na urina e no leite inferiores aos do sangue. (Radostits et al., 2000; Enjalbert et al., 2001; Nielsen et al., 2005).

Na circulação sistêmica, os corpos cetônicos servem como uma fonte adicional de energia para o músculo, poupando a glicose para promover maiores concentrações de glicose sanguínea. Além disso, servem também como um *feedback* regulador da liberação de AGNE pelo tecido adiposo (Kaneko et al., 1997; Herdt, 2000; Hutjens, 2011; Kessel et al., 2008).

1.9 REFERÊNCIAS

AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL. **The nutrient requirements of ruminant livestock**, London: The Gresham Press, 1980. 351p.

ANDREWS, A.H.; BLOWEY, R.W.; BOYD, H.; EDDY, R.G. Bovine Medicine: **Diseases and Husbandry of Cattle**, v.2, 2004.

BAIRD, G.D., Primary Ketosis in the High-Producing Dairy Cow: Clinical and Subclinical Disorders, Treatment, Prevention, and Outlook. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p.1-10, 1982.

BELL, M.J.; WALL, E.; RUSSEL, G. The effect of improving cow productivity, fertility, and longevity on the global warming potential of dairy systems. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.3662-3678, 2011b.

BENCHAAR, C.; HRISTOV, A. N.; GREATHEAD, H. Essential oils as feed additives in ruminant nutrition. In: STEINER, T. (Ed.). **Phytogenics in animal nutrition. Natural concepts to optimize gut health and performance**. Nottingham, UK : Nottingham University Press, 2009. p. 111–146.

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

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

BOWMAN, G. R., K. A. BEAUCHEMIN, AND J. A. SHELFORD. 2002. The proportion of the diet to which fibrolytic enzymes are added affects nutrient digestion by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**. 85:3420–3429.

BRICKNER, D.G.; CAJIGAS, I; FONDUFE-MITTENDORF, Y.; AHMED, S; LEE P.C.; WIDOM, J.; BRICKNER, J.H. Mediated localization of genes at the nuclear 70 periphery confers epigenetic memory of previous transcriptional state. **Plos Biology**, v.5, p.81, 2007.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; CARDOZO, P. W.; KAMEL, C. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 7, p. 2508- 2516, 2005b.

BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. Screening for effects of plant extracts and active compounds on dairy cattle rumen microbial fermentation in a

continuous culture system. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123/124, n. 2, p. 597-613, 2005a.

BUTLER, W.R. Symposium: optimizing protein nutrition for reproduction and lactation. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.2533-2539, 1998.

BUTLER, W.R.; CALAMAN, J.J.; BEAM, S.W. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v.74, p.858- 865, 1996.

CABRITA, A. R. J., R. J. B. BESSA, S. P. ALVES, R. J. DEWHURST, AND A. J. M. FONSECA. 2007. Effects of dietary protein and starch on intake, milk production, and milk fatty acid profiles of dairy cows fed corn silage-based diets. **Journal of Dairy Science**. 90:1429–1439.

CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P. W.; CASTILLEJOS, L.; FERRET, A. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 6, p. 2580-2595, 2007.

CALSAMIGLIA, S., L. CASTILLEJOS, AND M. BUSQUET. 2006. Alternatives to antimicrobial growth promoters in cattle. Pages 129-167 in **Recent Advances in Animal Nutrition**. P.C. Garnsworthy, and J. Wiseman, ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK.

CARDOZO PW, CALSAMIGLIA S, FERRET A, KAMEL C. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. **Journal of animal science**. 2004;82(11):3230-6.

CASTILLEJOS, L.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. Effect of essential oil active Compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 7, p. 2649-2658, 2006.

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

CHRISTENSEN, R. A.; CAMERON, M. R.; CLARK, J. H.; DRACKLEY, J. K.; LYNCH, J. M.; BARBANO, D. M. Effects of amount of protein and ruminally protected amino acids in the diet of dairy cows fed supplemental fat. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 1618-1629, 1994.

CRANE, A.; NELSON, W.O.; BROWN, R. E. Effects of d-limonene and α -d-pinene on *in vitro* carbohydrate dissimilation and methane formation by rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 40, n. 10, p. 1317-1323, 1957.

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

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

DEVRIES, T. J., AND R. M. GILL. 2012. Adding liquid feed to a total mixed ration reduces feed sorting behavior and improves productivity of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**. 95:2648–2655.

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

DOHME, F.; et al. Comparative efficiency of various fats rich in medium chain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with RUSITEC. **Canadian Journal of Animal Science**, 80:473, 2000.

DRACKLEY, J.K.; RICHARD, M.J.; BEITZ, D.C.; YOUNG, J.M. Metabolic changes in dairy cows with ketonemia in response to feed restriction and dietary 1,3-Butanediol. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.1622- 1634, 1992.

DUFFIELD, T. F.; BAGG. R. N. Use of ionophores in lactating dairy cattle: a review. **Canadian Veterinary Journal**, v. 41, p. 388–394, 2000.

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

DUFFIELD, T.F.; LISSEMORE, K.D.; MCBRIDE, B.W.; LESLIE, K.E. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.571- 580, 2009.

EIFERT, E. C.; LANA, R. P.; LANNA, D. P. D. Efeito do fornecimento de dietas com monensina e óleo de soja no desempenho de vacas leiteiras na fase inicial de lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2123-2132, 2005.

ELLIS, J. L., J. DIJKSTRA, A. BANNINK, A. J. PARSONS, S. RASMUSSEN, G. R. EDWARDS, E. KEBREAB, AND J. FRANCE. 2011. The effect of high-sugar grass on predicted nitrogen excretion and milk yield simulated using a dynamic model. **Journal of Dairy Science**. 94:3105–3118.

ENJALBERT, F.; NICOT, M.C.; BAYOURTHE, C.; MONCOULON, R. Ketone Bodies in Milk and Blood of Dairy Cows: Relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.583-589, 2001.

FERRARETTO, L. F., R. D. SHAVER, M. ESPINEIRA, H. GENCOGLU, AND S. J. BERTICS. 2011. Influence of a reduced-starch diet with or without exogenous amylase on lactation performance by dairy cows. **Journal of Dairy Science**. 94:1490–1499.

FERNANDES, S.R.; FREITAS, J.A.; SOUZA, D.F.; KOWALSKI, L.H.; DITTRICH, R.L.; JUNIOR, P.R.; SILVA, C.J.A. Lipidograma como ferramenta na avaliação do

metabolismo energético em ruminantes. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.8, n.1, p.21-32, 2012.

FERNANDEZ, M.; SERRANO, E.; FRUTOS, P., GIRALDEZ, F. J., MANTECON, A. R., LLACH, J. R. Efecto del aditivo crina hc sobre la actividad degradativa ruminal em la especie ovina [effect of crina hc supplement upon the rumen degradative activity in sheep]. **ITEA**, v. 18, p.160–162, 1997.

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

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

GENCOGLU, H., R. D. SHAVER, W. STEINBERG, J. ENSINK, L. F. FERRARETTO, S. J. BERTICS, J. C. LOPES, AND M. S. AKINS. 2010. Effect of feeding a reduced-starch diet with or without amylase addition on lactation performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. 93:723–732.

GOLDER, H. M., P. CELI, A. R. RABIEE, C. HEUER, E. BRAMLEY, D. W. MILLER, R. KING, AND I. J. LEAN. 2012. Effects of grain, fructose, and histidine on ruminal pH and fermentation products during an induced subacute acidosis protocol. **Journal of Dairy Science**. 95:1971–1982.

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

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

HERDT, T.H. Ruminant adaption to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v.16, p.215-230, 2000.

HERDT, T.H. Fuel homeostasis in the ruminant. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v.4, p.213-232, 1988.

HRISTOV, A. N., C. E. BASEL, A. MELGAR, A. E. FOLEY, J. K. ROPP, C. W. HUNT, AND J. M. TRICARICO. 2008. Effect of exogenous polysaccharide- degrading enzyme preparations on ruminal fermentation and digestibility of nutrients in dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**. 145:182–193.

HUNTINGTON, G. B. 1997. Starch utilization by ruminants: From basics to the bunk. **Journal of Animal Science**. 75:852–867.

HUTJENS, M.F. Changes in feeding dairy cows during the last 20 years and what's ahead. In: **Tri-State Dairy Nutrition Conference, Indiana**, EUA, 2011.

JANSSEN, A. M.; CHIN, N. L.; SCHEFFER, J. J. M.; BAERHEIM-SVENDSEN, A. Screening for antimicrobial activity of some essential oils by the agar overlay technique. **Pharm Weekblad Scientific**, v. 8, p. 289–292, 1986.

JOHNSON, K.A.; JOHNSON, D.E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 8, p.2483 – 2492, 1995.

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

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M. Clinical biochemistry of domestic animals, **Gulf Professional Publishing**, 1997.

KESSEL, L.; ANDRESEN, J.; ERNGAARD, D.; FLESNER, P.; TENDEL, B.; HJORTDAL, J. Individual variability in physiological adaptation to metabolic stress during early lactation in dairy cows kept under equal conditions. **Journal of Animal Science**, v.86, p.2903-2912, 2008.

KLEIBER, M. **Bioenergetica Animal: El fuego de la vida**. 1 ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1972. 428p.

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

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

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, v. 2, 1995.

LEMONSQUET, S., G. RAGGIO, G. E. LOBLEY, H. RULQUIN, J. GUINARD-FLAMENT, AND H. LAPIERRE. 2009. Whole-body glucose metabolism and mammary energetic nutrient metabolism in lactating dairy cows receiving digestive infusions of casein and propionic acid. **Journal of Dairy Science**. 92:6068–6082.

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

MACHADO, F. S.; PEREIRA, L. G. R.; GUIMARAES JR., R.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C.; CHAVES, A.V.; CAMPOS, M. M.; MORENZ, M. J. F.; Emissões de metano na pecuária: conceitos, métodos de avaliação e estratégias de mitigação. **Embrapa Gado de Leite Documentos**, 147. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2011. 92p.

MCDUGALL, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. **Biochemical Journal**. 43:99–109.

MCINTOSH, F. M.; WILLIAMS, P.; LOSA R.; WALLACE, R. J.; BEEVER, D. A.; NEWBOLD, C. J. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5011–5014, 2003.

MERTENS, D. R. Regulation of forage intake. In: Forage quality evaluation and utilization. Nebraska: **American Society of Agronomy**. 1994. 988 p

MORRIS, F. E.; BRANINE, M. E.; GALYEAN, M. L.; HUBBERT, M. E.; FREEMAN, A. S.; LOFGREEN, G. P. Effect of rotating monensin plus tylosin and lasalocid on performance, ruminal fermentation, and site and extent of digestion in feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 3069–3078, 1990.

MORRISON, M.; MACKIE, R.I. Nitrogen metabolism by ruminal microorganism: current understanding and future perspectives. **Journal Agriculture Research**, v.47, p.227-246, 1996.

NAFIKOV, R. A., AND D. C. BEITZ. 2007. Carbohydrate and lipid metabolism in farm animals. **Journal of Nutrition**. 137:702–705.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **The effect of environment on nutrient requirements of domestic animals**. Washington, D.C.: National Academic Press, 1981. 151p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7.ed. Washington, D.C.: National Academic Press, 2000. 242p.

National Research Council - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. ed. Washinton, D.C.: National Academic Press, 2001. 381 p.

NIELSEN, N.I.; FRIGGENS, N.C.; CHAGUNDA, M.G.G.; INGVARTSEN, K.L. Predicting risk of ketosis in dairy cows using in-line measurements of β -hydroxybutyrate: A biological model. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.2441–2453, 2005.

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

OH, H. K.; JONES, M. B.; LONGHURST, W. M. Comparison of rumen microbial inhibition resulting from various essential oils isolated from relatively unpalatable plant species. **Journal of Applied Microbiology**, v. 16, p. 39–44, 1968.

OH, H. K.; SAKAI, T.; JONES, M. B.; LONGHURST, W. M. Effect of various essential oils isolated from douglas fir needles upon sheep, deer rumen microbial activity **Journal of Applied Microbiology**, v. 15, p. 777–784, 1967.

OSPINA, P.A.; NYDAM, D.V.; STOKOL, T.; OVERTON, T.R. Associations of elevated nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.1596–1603, 2010.

OVERTON, T.R.; WALDRON, M.R. Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health, **Journal of Dairy Science**, v.87, p.E105–E119, 2004.

OWENS, F. N.; ZORRILLA-RIOS, J.; DUBESKI, P. Effects of ionophores on metabolism, growth, body composition and meat quality. In: PEARSON, A. M.;

DUTSON, T. R. **Growth regulation in farm animals**: advances in meat research. London. Elsevier, 1991. p. 321–342.

PALMQUIST, D. L.; MATTOS, W. R. S. Metabolismo de lipídios. In: **Nutrição de Ruminantes**. Funep, Jaboticabal, SP, 2006, 582p.

PRESSMAN, B. C. Ionophorus antibiotics as models for biological transport. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 27, p. 1283-1288, 1968.

RADOSTITS, O.M.; ARUNDEL, J.H.; GAY, C.C. Veterinary medicine, **Elsevier Health Sciences**, 2000.

REGITANO, J. B; LEAL, R. M. P.; Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 3, p. 601-616, 2010.

ROSSI, J. **Composition pour améliorer la digestibilité des aliments destinés aux animaux ruminants**. EP 0,630,577, A1, 1994.

RUAS, J.R.M.; TORRES, C.A.A.; BORGES, L.E. Efeito da suplementação protéica a pasto sobre eficiência reprodutiva e concentração sanguínea de colesterol, glicose e ureia em vacas Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.2043-2050, 2000.

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

RUSSELL, J. B. A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: effects on ion flux and protonmotive force. **Journal of Animal Science**. v.64, p.1519- 1525. 1987.

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

SEGABINAZZI, L. R. **Aditivo a base de extratos vegetais como alternativa à monensina sódica na dieta de vacas de corte terminadas em confinamento**. 2008. 84 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

SMITH, P.; MARTINO, D.; CAI, Z.; GWARY, D; JANZEN, H.; KUMAR, P.; MCCARL, B.; OGLE, S.; O'MARA, F.; RICE, C.; SCHOLE, B.; SIROTENKO, O.; HOWDEN, M., MCALLISTER, T.; PAN, G.; ROMANENKOV, V.; SCHNEIDER, U.; TOWPRAYOON, S.; WATTENBACH, M.; SMITH, Greenhouse gas mitigation in agriculture, **Journal of Biological Sciences** v. 363, p. 789–813, 2008.

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

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

TRICARICO, J. M., J. D. JOHNSTON, K. A. DAWSON, K. C. HANSON, K. R. MCLEOD, AND D. L. HARMON. 2005. The effect of an *Aspergillus oryzae* extract containing α -amylase activity on ruminal fermentation and milk production in lactating Holstein cows. **Journal Animal Science**. 81:365–374.

VAN SAUN, R. **Blood profiles as indicators of nutritional status**. Corvallis, Oregon: Department of Large Animal Clinical Sciences, 2000.

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

II - INTRODUÇÃO

Vários suplementos alimentares podem contribuir para o melhor desempenho dos ruminantes. Os aditivos podem melhorar a conversão alimentar e/ou produção (ganho de peso/leite) e/ou sanidade. Eles atuam por diferentes mecanismos, que incluem alteração da fermentação ruminal (pela maior formação de ácido propiônico, diminuição da formação de metano e redução da proteólise e desaminação da proteína dietética no rúmen), estabilização do ambiente ruminal e proteção do trato gastrointestinal dos agentes patogênicos.

A monensina sódica é um ionóforo aprovado para uso em vacas leiteiras em lactação em vários países com ação seletiva sobre as bactérias gram positivas, modificando o padrão de fermentação ruminal (Russel and Strobel, 1989) e melhorando a eficiência energética pelo aumento da relação propionato/acetato (Rogers and Davis, 1982), redução de protozoários que geram hidrogênio (Russell, 1987) e redução do CH₄ (Ranga Niroshan Appuhamy et al., 2013). No entanto, o uso de antibióticos na criação de animais tem pouca aceitação pública, pois podem vir a deixar efeito residual no produto final. (European Parliament and Council, 2003).

Os óleos essenciais (OE), por apresentarem propriedades antimicrobianas e alterarem o padrão de fermentação microbiana (Benchaar et al., 2007; Patra and Yu, 2015, Hausmann et al., 2017), podem ser uma alternativa aos aditivos antibióticos. A adição de OE na dieta de ruminantes causam: inibição da desaminação e da metanogênese, resultando em menor N-amoniacal, metano e acetato, e maiores concentrações de propionato e butirato; as respostas são dependentes do tipo de óleo essencial ou blend utilizado e a ação pode ser influenciada pelo tipo de dieta e pH ruminal (Calsamiglia et al. 2007).

Uma redução nos ácidos graxos voláteis pode ser justificada pela menor fermentação ruminal. É mais interessante, do ponto de vista energético, uma alteração na proporção dos AGV, com maior contribuição do propionato e menores perdas de energia via metano (CH₄). Um aumento na produção de AGV se dá pela degradação dos compostos dos óleos no rúmen.

O milho é a principal fonte de amido e, por ser um alimento usado na alimentação humana e de animais monogástricos, apresenta elevado custo. Assim, esforços de pesquisa têm focado o desenvolvimento de processos, produtos e tecnologias que permitam a otimização do aproveitamento do amido. Nesse contexto, a amilase exógena vem sendo

testada como aditivo, e aumentos na digestibilidade ruminal ou total tem sido reportados (Hristov et al., 2008; Gencoglu et al., 2010; Nozière et al., 2014).

Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito dos aditivos amilase exógena e óleos essenciais como alternativa à monensina em dietas de vacas em lactação confinadas.

III – OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito dos aditivos amilase exógena e óleos essenciais como alternativa à monensina em dietas de vacas em lactação confinadas.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o consumo de nutrientes de vacas leiteiras confinadas com dietas contendo adição de amilase e de um “blend” de óleos essenciais;
- Estimar a digestibilidade dos nutrientes fornecidos para vacas leiteiras confinadas consumindo dietas contendo adição de amilase e de um “blend” de óleos essenciais;
- Avaliar a produção e composição do leite de vacas leiteiras confinadas consumindo dietas contendo adição de amilase e de um “blend” de óleos essenciais;
- Avaliar o balanço de nitrogênio e energético, e as trocas respiratórias de vacas leiteiras confinadas consumindo dietas contendo adição de amilase e de um “blend” de óleos essenciais;
- Avaliar o perfil metabólico sanguíneo de vacas leiteiras confinadas consumindo dietas contendo adição de amilase e de um “blend” de óleos essenciais.

IV - MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Complexo Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), em Coronel Pacheco, Minas Gerais, entre os meses de maio a julho de 2016. Todos os procedimentos de tratamento e manuseio de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, Protocolo CEUA-EGL 29/2015).

4.1 Animais, Delineamento Experimental e Tratamentos

Foram utilizadas trinta e nove vacas cruzadas Gir x Holandesa em lactação (75 ± 34 DEL) com um rendimento inicial médio de leite de $20,74 \pm 4,2$ kg / d e média de PC de 502 ± 57 kg no início do experimento. Os animais foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em 3 grupos de tratamento ($n = 13$ por tratamento) por 70 dias. A produção de leite, dias em lactação e peso corporal ao início do experimento foram utilizados para alocar os animais aos lotes, buscando reduzir a variabilidade dentro de cada grupo.

Os primeiros 21 dias consistiram em um período de adaptação dietética, seguido de um período de coleta de dados de 49 dias. Todas as vacas foram expostas ao ensaio de digestibilidade total dos nutrientes durante cinco dias e à câmara respirométrica (períodos de 2 x 20 a 22 h) ao final do período de coleta.

CRINA® Ruminants é uma mistura de óleos essenciais, contendo timol, limoneno, guaiacol, eugenol e vanilina. Os aditivos para alimentação são pós-secos e foram adicionados à ração durante a preparação do concentrado dentro da mistura mineral (uma vez por semana). A dieta basal foi formulada de acordo com as recomendações do NRC (2001) para animais em lactação, produção média de 30 kg leite/dia, e foram fornecidas duas vezes por dia (8h00 e 15h00) como Ração Mista Total.

A dieta foi composta por silagem de milho e concentrado na proporção 53: 47, com base na matéria seca (MS). O concentrado foi à base de soja, milho moído, núcleo mineral, calcário calcítico, ureia e sulfato de amônio. Os ingredientes e a composição química das dietas encontram-se na Tabela 1. As dietas experimentais consistiram em:

- 1) Monensina (15,78 mg / kg MS, DSM Nutritional Products Brazil SA);
- 2) Monensina + Amilase (15,78 mg / kg de MS de monensina e 657,5 mg / kg de MS de Ronozyme RumiStar™);
- 3) Óleos essenciais + Amilase (52,6 mg / kg de MS de CRINA® Ruminants e 657,5 mg / kg de MS de Ronozyme RumiStar™®, DSM Nutritional Products Brazil SA).

Tabela 1. Ingredientes e composição química das dietas experimentais

Ingredientes	Ração Mista Total		
	g/kg		
Silagem de milho	480,0		
Feno de Tifton	52,6		
Milho	210,6		
Farelo de soja	210,2		
Calcário	9,7		
Ureia	5,3		
Sulfato de amônia	5,3		
Mistura mineral	26,3		
	Mon	Mon+Amilase	OE+Amilase
	mg/Kg		
Monensina	1578	15,78	0,000
Amilase	0,000	657,5	657,5
EO ²	0,000	0,000	52,6
<i>Composição química³ (g/kg)</i>			
Matéria orgânica	914,6 ± 9,4	924,4 ± 4,1	919,9 ± 3,0
Proteína Bruta	194,5 ± 3,7	192,8 ± 7,9	190,6 ± 6,5
Extrato etéreo	36,5 ± 2,2	37,0 ± 1,7	36,6 ± 5,8
FDN	308,3 ± 13,1	292,1 ± 9,5	301,7 ± 6,4
FDA	155,1 ± 6,3	148,7 ± 4,0	151,9 ± 3,0
Amido	249,3 ± 20,1	250,8 ± 19,6	247,7 ± 17,2

¹ Ca: 88,00 g/kg; P: 42,00 g/kg; S: 18,00 g/kg; Mg: 45,00 g/kg; K: 20,00 g/kg; Na: 123,00 g/kg; Co: 14,00 mg/kg; Cu: 500,00 mg/kg; Cr: 20,00 mg/kg; Fe: 1050,0 mg/kg; I: 28,00 mg/kg; Mn: 1400,00 mg/kg; Se: 18,00 mg/kg; Zn: 2800,00 mg/kg; F: 420,00 mg/kg; Biotina: 80 mg/kg; vitamina A: 200000 UI/kg; Vitamina D3: 70000 UI/kg; Vitamina E: 1200 UI/kg; Monensina: 600 mg/kg; Amilase: 15.000 KNU ou 25g; ²OE (óleos essenciais): CRINA® Ruminants - blend containing thymol, limonene, guaiacol, eugenol and vanillin - 2000 mg/Kg; ³FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido.

4.2 Avaliação do consumo

Os animais foram alocados em galpão tipo *freestall*, dotado de sistema eletrônico de monitoramento da ingestão individual de alimento (AF-1000 Master Gate, Intergado

Ltda., Contagem, MG, Brasil), divididos em lotes, de acordo com os tratamentos. Cada lote possuía 12 cochos eletrônicos com acesso limitado por porta (sendo um cocho para cada animal alocado no lote); dois bebedouros com capacidade de 45 litros de água e balança para pesagem corporal automática (WD-1000, Intergado Ltda., Contagem, MG); 12 camas de borracha (*WINGFLEX*, Kraiburg, Tittmoning, Alemanha), que recebiam cobertura de serragem semanalmente, e sistema de limpeza de pista por *flushing*. Cada vaca recebeu na orelha direita um *transponder* passivo (FDX - ISO 11784/11785, Allflex, Joinville, SC, Brasil), para identificação eletrônica e abertura do portão do respectivo cocho, atribuído aleatoriamente. Cada câmara de respiração também estava equipada com a tecnologia Intergado de alimentação e água.

As vacas foram alimentadas duas vezes ao dia às 08:00 e 15:00 horas em consumo *ad libitum* (permitindo até 10% de sobras). As dietas (Tabela 1) foram formuladas para atender às necessidades de proteína e energia de uma vaca de 550 kg, produzindo 30 kg / d de leite (3,6% de gordura) e consumindo 19,0 kg de MS / d, de acordo com o NRC (2001). A mesma dieta foi utilizada para todos os tratamentos, diferenciando apenas a pré-mistura utilizada em cada concentrado, que contém os respectivos aditivos alimentares.

O consumo foi determinado diariamente pela diferença de peso entre o alimento ofertado e sobras, coletadas após a saída dos animais para a ordenha da manhã. Foi realizada amostragem de 300 a 500g do alimento volumoso e sobras, três dias por semana, e do concentrado, um dia por semana, durante todo o período experimental. As amostras foram embaladas em sacos plásticos e congeladas em freezer à temperatura de -20°C, até a fase de processamento.

4.3 Análises dos parâmetros de desempenho e composição do leite

As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia (6:00 h e 15:30 h) em ordenhadeira mecanizada (DeLaval, Tumba, Suécia) tipo espinha de peixe (2x4) de circuito fechado com linha baixa equipada com contadores de leite eletrônicos MM27, controles MPC 580/680 e removedor automático de coletores (ACR). Os dados de produção de leite foram obtidos pelo software Alpro (DeLaval, Tumba, Suécia). A produção de leite foi corrigida para energia (LCE) considerando teores de 40,0 e 33,0 g/kg para gordura e proteína, respectivamente, conforme equação “*i*” (IFCN, 2015) e para 3,5% de gordura (LCG -3.5%) indicado para raças cruzadas por Parekh (1986), conforme equação “*ii*”:

$$(i) \text{ LCE} \left(\frac{\text{kg}}{\text{dia}} \right) = \text{PL} \times \frac{0,383 \times \% \text{ gordura} + 0,242 \times \% \text{ proteína} + 0,7832}{3,1138}$$

$$(ii) \text{ LCG (3.5\%)} = 0,35 \text{ Produção de leite (kg/d)} + 18,57 \text{ Produção de gordura (kg/d)}$$

Semanalmente, durante três dias, foram realizadas coletas individuais de leite nas ordenhas da manhã e da tarde (totalizando seis amostras por semana), para análise da composição (proteína, gordura, lactose, extrato seco, extrato seco desengordurado e ureia). As amostras foram acondicionadas em recipientes contendo o conservante bronopol®, refrigeradas a 5°C e enviadas ao Laboratório de Qualidade de Leite da Embrapa Gado de Leite em até 24 horas, para análise em equipamento Bentley Combi System 2300® (BENTLEY INSTRUMENTS INC., 2007), de acordo com as recomendações da International Dairy Federation (IDF, 2000).

4.4 Ensaio de digestibilidade, balanço de nitrogênio e coleta de leite

O ensaio de digestibilidade foi dividido em três períodos consecutivos, com 15 animais no primeiro ensaio e 12 animais no segundo e terceiro ensaios, compreendendo 5 e 4 animais por tratamento, nos respectivos ensaios. Nesse período, os animais foram transferidos para um sistema do tipo *tie stall* com cochos e bebedouros individuais, onde passaram por prévio período de adaptação de cinco dias.

Durante dois dias do ensaio de digestibilidade, foi mensurada a produção total de urina utilizando sonda do tipo *Folley* nº24 de duas vias, com balão de 30-50 ml, adaptadas na extremidade livre por mangueiras de polietileno, pela qual a urina era conduzida a recipientes plásticos vedados, imersos em caixas de polietileno expandido (EPS), contendo gelo. Alíquotas de 50 mL de urina (*in natura*) foram armazenadas em potes plásticos vedados para determinação dos teores de nitrogênio urinário e energia bruta.

A produção fecal dos animais foi avaliada por coleta total de fezes durante cinco dias. Um recipiente plástico (50 L), contendo identificação do animal, foi utilizada para recolher as fezes de forma individual. O material fecal produzido por cada animal foi pesado duas vezes ao dia (as 10:00 e as 16:00h) e, após a homogeneização do conteúdo em cada recipiente, foram amostradas cerca de 300-500g de fezes.

No período de coleta, os animais foram ordenhados em suas baias nos turnos da manhã e da tarde (as 07:30 e as 14:30), com auxílio de uma ordenha móvel. A produção do

leite individual foi determinada pela pesagem em balança, com capacidade de até 300 kg, e foi coletada uma amostra de cada animal a cada ordenha para análise da composição.

O manejo alimentar foi mantido durante o ensaio de digestibilidade, quando também foram coletadas amostras da dieta fornecida (concentrado, feno e silagem de milho) e sobras, durante os cinco dias do ensaio, para avaliação de consumo de MS e nutrientes.

Todas as amostras coletadas durante o ensaio de digestibilidade foram armazenadas em sacos plásticos resistentes, devidamente identificadas e congeladas em câmara fria para posterior análise laboratorial.

Para determinação do consumo da MS (CMS) e demais nutrientes, foi utilizada a equação: $CMS\% = (kgMS \text{ ingerida} \times \% \text{ nutrientes}) - (kgMS \text{ sobra} \times \% \text{ nutrientes}) * 100$. Os valores de digestibilidade (g/kg) foram determinados em função do desaparecimento, considerando a equação: $Digestibilidade \text{ nutriente} = ((kg \text{ MS ingerida} \times \% \text{ nutrientes}) - (kg \text{ MS fezes} \times \% \text{ nutrientes})) / (kg \text{ MS ingerida} \times \% \text{ nutriente}) * 100$.

Para o cálculo do balanço de nitrogênio, ou nitrogênio retido, foram utilizados os valores de nitrogênio (N) consumido, nitrogênio fecal, nitrogênio urinário e nitrogênio do leite, conforme a equação: $N \text{ retido} = N \text{ ingerido} - (N \text{ fecal} + N \text{ urinário} + N \text{ leite})$. O nitrogênio ingerido foi obtido pela diferença entre a quantidade de nitrogênio na dieta oferecida e a quantidade de nitrogênio nas sobras.

4.5 Ensaio de respirometria e cálculos de partição energética

Foram utilizadas quatro câmaras respirométricas de circuito aberto, conforme as especificações e procedimentos descritos por Machado et al. (2016). As vacas foram alojadas individualmente dentro das câmaras após a primeira ordenha do dia. Após 20 min do fechamento das portas, os cochos (Intergado) foram automaticamente liberados para que as vacas iniciassem o consumo e deu-se início às medições. A mensuração foi realizada por 2 períodos consecutivos de 20-22 h. Cada período avaliado foi corrigido para o fator de correção da câmara utilizada e extrapolou-se a produção no período em questão para 24 h. As câmaras foram mantidas em condições de termoneutralidade, correspondendo à temperatura em torno de $23 \pm 3^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de $65 \pm 5\%$.

Os animais foram pesados antes e após a entrada na câmara. A emissão de CH_4 entérico pelas vacas foi calculada pela diferença da concentração de CH_4 no ar de entrada (ar externo) e saída das câmaras, e pelo fluxo de ar utilizado (Machado et al., 2016).

Para determinação da partição energética, previamente foram determinados a energia bruta das amostras de alimentos, sobras, fezes e urina coletadas durante a digestibilidade em calorímetro adiabático IKA - C5000. A partir da quantificação do consumo de energia bruta (CEB), obtida pela diferença entre a fração de energia fornecida na dieta e a encontrada nas sobras, calculou-se as demais frações de energia.

A energia digestível (ED) foi obtida pela diferença entre a energia bruta (EB) consumida e a energia perdida nas fezes e, em sequência, determinou-se a energia metabolizável (EM), descontando as perdas energéticas através da urina e CH₄ (NRC, 2000). Para a quantificação da energia perdida na forma de CH₄, adotou-se a perda de 9,45 kcal/L de CH₄ produzido (Brouwer, 1965) durante os ensaios de respirometria. A metabolizabilidade (q) da dieta foi calculada pela relação entre a energia metabolizável e a energia bruta ingerida, conforme o AFRC (1993).

A energia líquida para lactação (ELI, Mcal/dia), definida como a energia contida no leite produzido, foi calculada com base na equação proposta pelo NRC (2001), que considera a ELI como o somatório das energias da combustão dos constituintes do leite (gordura, proteína e lactose), conforme:

$$EL_L = [((0,0929 \times \text{gordura manhã}) + (0,0547 \times \text{proteína manhã}) + (0,0395 \times \text{lactose manhã}) \times \text{produção de leite manhã}) + ((0,0929 \times \text{gordura tarde}) + (0,0547 \times \text{proteína tarde}) + (0,0395 \times \text{lactose tarde}) \times \text{produção de leite tarde})].$$

Os volumes (L/dia) de O₂ consumido, CO₂ e CH₄, produzidos durante o ensaio de respirometria e o nitrogênio urinário excretado (Nu, g/dia), foram utilizados para calcular a produção de calor diária (PCalor, Kcal/dia), conforme Brouwer (1965):

$$PCalor \text{ (Kcal/dia)} = (3,866 \times VO_2) + (1,200 \times VCO_2) - (0,518 \times VCH_4) - (1,431 \times Nu)$$

em que: VO₂ = volume de oxigênio; VCH₄ = volume de metano; VCO₂ = volume de gás carbônico (CO₂) (todos em L/dia) e Nu = nitrogênio urinário total.

O balanço energético (BE) total foi calculado pela diferença entre CEM, a ELL e a PCalor, em que: BE = CEM – ELL – PCalor. Foram ainda calculados as relações entre EM/ED; PCalor/EM, ELI/EM e BE/EM como indicadores de eficiência energética.

4.6 Processamento de amostras e análises laboratoriais

Todas as amostras coletadas durante o experimento (alimentos oferecidos, sobras e fezes dos ensaios de digestibilidade e das mensurações em câmaras respirométricas) foram descongeladas à temperatura ambiente e submetidas à pré-secagem, a 55°C, por 72 horas. Posteriormente, foram moídas em moinho estacionário “Tomaz-Willey”, utilizando-se peneiras com crivos de 1 mm.

Após a moagem, foi realizada amostra composta semanal representativa da dieta oferecida, silagem e concentrado; além de uma amostra composta semanal das sobras para cada animal.

Também foram feitas amostras compostas representativas dos ensaios de digestibilidade, totalizando uma amostra da dieta oferecida e uma amostra para cada animal referente às sobras e fezes. As proporções para constituição das amostras compostas de fezes e sobras foram calculadas com base na matéria pré-seca. Para o alimento oferecido (silagem e concentrado), foram amostradas diariamente quantidades iguais desses materiais.

As amostras coletadas da dieta oferecida e das sobras dos animais no período da mensuração em câmara respirométrica foram amostradas individualmente para cada dia de avaliação. Todo o material processado foi armazenado em frascos plásticos herméticos identificados, para posteriores análises químicas.

As análises foram realizadas no Laboratório de análise de alimentos da Embrapa Gado de leite e foram avaliados os teores de MS em estufa a 105°C (AOAC, 1990), cinzas (AOAC, 1990), PB pelo método Kjeldahl (AOAC, 1990), EB por combustão em bomba calorimétrica adiabática - marca IKA® WERKE /modelo C-5000 ADI, Control, (AOAC, 1995), FDN pelo método sequencial de Van Soest et al. (1991), adaptado para as condições do aparelho ANKOM220, FiberAnalyzer (Ankom Technology, Fairport, NY), com adição de 500 µL/g MS de amilase termoestável, sem uso sulfito de sódio e corrigido para cinzas residuais (Mertens, 2002), EE (AOAC, 1990) e determinação do amido por hidrólise ácida (Kit Analítico LABTEST - GLICOSE. Para os cálculos de carboidratos não fibrosos (CNF), foi utilizada a equação: $CNF = 100 - (FDN\% + PB\% + EE\% + CINZAS\%)$, sugerida por Mertens (1997). As amostras de urina foram analisadas para determinação dos valores de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995) e energia bruta, conforme descrito anteriormente.

4.7 Parâmetros Sanguíneos

A coleta de sangue foi realizada um dia antes da digestibilidade de cada grupo, quatro horas após o fornecimento das dietas, no período da manhã. Duas amostras por animal foram coletadas por punção da veia coccígea (é o local mais representativo porque seus componentes não são modificados pela passagem por órgãos secretários) em tubos Vacutainer® de 10 mL, após assepsia local, para dosagens séricas de ácidos graxos não esterificados, glicose, ureia, triglicérides, β -hidroxibutirato.

O sangue contendo EDTA como anticoagulante foi imediatamente centrifugado a 3200 rpm, durante 10 minutos, para a separação do plasma, que foi transferido para tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL e armazenados a -20°C até a análise.

As análises das concentrações dos parâmetros sanguíneos foram realizadas no Laboratório de Cromatografia Gasosa da Embrapa Gado de Leite. A concentração plasmática de ácidos graxos não esterificados (AGNE) foi obtida por método colorimétrico (Kit Randox NEFA, Randox Laboratories Ltd. USA). As concentrações plasmáticas de β -hidroxibutirato foram determinadas pelo método enzimático (Kit Randox Ranbut, Randox Laboratories Ltd, Crumlin, Reino Unido, Kit Glicose Liquiform, Babtest Diagnostica S.A., Minas Gerais, Brasil). A glicose plasmática foi avaliada em espectrofotômetro de microplaca EON (Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA), utilizando método enzimático (Kovalent do Brasil Ltda., Rio de Janeiro / RJ).

4.8 Procedimentos Estatísticos

As análises estatísticas foram realizadas no programa SAS versão 9.4 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC). A estatística descritiva foi obtida pelo procedimento MEANS. As variáveis de consumo e produção e composição do leite foram avaliadas como medidas repetidas no tempo, utilizando-se o procedimento MIXED.

O modelo estatístico incluiu os efeitos fixos de tratamento, tempo (semana de avaliação), interação tratamento \times tempo e as covariáveis produção de leite inicial (PLi) e dias em lactação (DEL). A semana de avaliação foi utilizada na declaração REPEATED e vaca aninhada ao tratamento como fator aleatório, conforme o modelo:

$$y_{ijk} = \mu + \text{cov1} + \text{cov2} + \tau_i + w_k + (\tau \times w)_{ik} + \delta_{ij} + \epsilon_{ijk},$$

em que:

μ = média geral das observações

τ_i = efeito do tratamento i

w_k = efeito da semana k

$(\tau \times w)_{ik}$ = efeito da interação entre tratamento i e semana k

δ_{ij} = covariância entre as medidas repetidas dentro de animais

cov1 = efeito da covariável 1

cov2 = efeito da covariável 2

ϵ_{ijk} = efeito do erro aleatório associado à observação yijk.

As variáveis de balanço energético e de nitrogênio, digestibilidade e parâmetros sanguíneos e dados de consumo de água foram submetidas à ANOVA simples. Quando houve efeito significativo, a comparação entre médias dos tratamentos foi realizada por meio do teste *Tukey*, usando o procedimento *Least Square Means* (LSMeans) do SAS, utilizando-se o nível de significância de 5% para todos os testes realizados.

V - RESULTADOS

A adição de amilase na dieta com monensina aumentou o consumo de matéria seca (CMS) e produção de leite, porém, reduziu os teores de gordura, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado (ESD (g/kg)), resultando em maiores produções de proteína, lactose, sólidos totais e ESD (kg/d) (Tabela 2).

A substituição da monensina por OE resultou em aumentos no consumo de matéria seca, na produção de leite corrigido pra gordura e energia (LCG and LCE (kg/dia)), nos teores de gordura, proteína e sólidos totais (g/kg) e na produção de proteína (kg/d), mas resultou em redução no teor de lactose (g/kg) do leite, em comparação ao tratamento utilizando apenas a monensina. Os aditivos utilizados não influenciaram no teor de ureia.

Tabela 2. Efeito da adição de amilase e substituição da monensina por óleos essenciais (OE) no consumo de matéria seca e água, na produção de leite, constituintes e ureia no leite

	Monensina	Monensina + Amilase	OE + Amilase	Valor P	EPM
CMS, kg	15,7 _B	17,3 _A	17,7 _A	< 0,001	0,176
C. água, L/d	66,4	69,2	66,5	0,861	2,306
C. água, L/kg DMI	3,40	3,64	3,43	0,482	0,106
Leite, kg	19,4 _B	21,0 _A	19,9 _{AB}	0,0007	0,178
LCG, kg	21,2 _C	22,3 _B	23,1 _A	<0,0001	0,195
LCE, kg	19,5 _C	20,6 _B	21,3 _A	<0,0001	0,208
Gordura, g/kg	40,6 _B	38,8 _C	45,1 _A	<0,0001	0,0389
Proteína, g/kg	33,1 _B	32,5 _B	34,8 _A	<0,0001	0,0242
Lactose, g/kg	47,7 _A	46,8 _B	46,6 _B	0,0001	0,0121
Sólidos totais, g/kg	13,1 _B	12,7 _C	13,6 _A	<0,0001	0,0591
ESD, g/kg	89,8 _A	88,1 _B	90,6 _A	0,0002	0,0261
Ureia, mg/dL,	23,32	23,78	22,71	0,1422	0,475
Gordura, kg/d	0,85	0,88	0,94	0,0665	0,0167
Proteína, kg/d	0,65 _B	0,70 _A	0,70 _A	0,0045	0,0096
Lactose, kg/d	1,03 _B	1,14 _A	0,97 _B	0,0007	0,0162
Sólidos totais, kg/d	2,60 _B	2,74 _A	2,69 _{AB}	0,0451	0,0272
ESD, kg/d	1,81 _B	1,96 _A	1,81 _B	0,0019	0,0217

EPM = Erro Padrão da Média.*Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de LSM a 5% de probabilidade. LCG = Leite corrigido pra gordura. LCE = Leite corrigido pra energia. ESD = Extrato seco desengordurado.

A inclusão de amilase em dieta com monensina não influenciou a digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes (MO, PB, FDN, FDA, CNF e Amido (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito da adição de amilase e substituição da monensina por óleos essenciais no consumo e digestibilidade dos nutrientes

Item ¹	Monensina	Monensina + Amilase	OE + Amilase	Valor P	EPM
<i>Consumo (kg/dia)</i>					
MS	16,78	16,78	17,95	0,446	0,428
MO	15,18	15,42	16,38	0,423	0,396
PB	3,45	3,66	3,79	0,298	0,091
Extrato etéreo	0,60 _{A,B}	0,54 _B	0,68 _A	0,019	0,022
FDN	4,30	4,08	4,03	> 0,50	0,112
FDA	2,45	2,31	2,45	> 0,50	0,070
CNF	7,34	6,99	7,64	0,342	0,176
Amido	4,17	4,32	4,50	0,422	0,100
<i>Digestibilidade (g/kg MS)</i>					
MS	724,84	704,55	709,11	0,093	6,43
MO	739,50	723,04	725,95	0,167	6,08
PB	781,05	776,17	769,24	0,409	4,37
Extrato etéreo	662,52	576,31	624,89	0,060	15,5
FDN	532,64	510,76	476,50	0,231	14,6
FDA	570,79	506,18	529,70	0,064	13,1
CNF	854,07	825,62	836,57	0,100	6,97
Amido	946,42	950,72	942,54	0,413	2,66

EPM = Erro Padrão da Média. Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de LSM a 5% de probabilidade. MS = Matéria seca. MO = Matéria orgânica. PB = Proteína bruta. FDN = Fibra em detergente neutro. FDA = Fibra em detergente ácido. CNF = Carboidrato não fibroso.

A emissão de metano por consumo e digestibilidade da fibra em detergente neutro (CH₄ g/kg CFDN e DFDN) aumentou devido à inclusão da amilase na dieta com monensina e reduziu com a substituição da monensina por OE (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito da adição de amilase e substituição da monensina por óleos essenciais na emissão de CH₄ entérico

Item	Monensina	Monensina + Amilase	OE + Amilase	Valor P	EPM
CH ₄ , g/dia	293	310	332	0,199	6,290
CH ₄ , g/kg CMS	18,1	18,5	17,3	0,462	0,301
CH ₄ , g/kg CMO	20,3	20,0	19,0	0,478	0,340
CH ₄ , g/Kg CFDN	65,1 _B	70,1 _A	59,9 _C	0,017	1,160
CH ₄ , g/ Kg DMS	25,2	26,7	25,3	> 0,50	0,495
CH ₄ , g/Kg DMO	27,6	27,9	26,1	0,435	0,474
CH ₄ , g/Kg DFDN	113 _B	132 _A	114 _B	0,028	2,580
CH ₄ , g/ Kg LCE	14,4	14,2	15,8	0,083	0,266

EPM = Erro Padrão da Média. CH₄= Metano. CH₄/CMS = Metano por consumo de matéria seca. CH₄/CMO= Metano por consumo de matéria orgânica. CH₄/CFDN=Metano por consumo de fibra detergente neutro. CH₄/DMS= Metano por digestibilidade de matéria seca. CH₄/DMO= Metano por digestibilidade de matéria orgânica. CH₄/DFDN= Metano por digestibilidade da fibra em detergente neutro. CH₄/LCE= Metano pelo leite corrigido para energia. *Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A partição e os índices de eficiência energética não foram alteradas pela adição de amilase ou substituição da monensina por OE (Tabela 5), exceto a produção de leite (kg/d) que, durante a avaliação na câmara respirométrica, foi influenciada pelas dietas de forma semelhante ao observado para o período experimental integral (Tabela 2) com a adição de amilase à monensina, aumentando a produção de leite.

Tabela 5. Efeito da adição de amilase e substituição da monensina por óleos essenciais na partição e índices de eficiência energética

	Monensina	Monensina + Amilase	OE + Amilase	Valor P	EPM
<i>Dados dos animais</i>					
PL total. kg/dia	19,5 _B	20,7 _A	19.7 _B	< 0,001	0,497
PC. Kg	530	531	532	0,995	9,57
CMS. Kg MS/dia	16,8	16,8	18.0	0,446	0,428
<i>Consumo e Partição de energia</i>					
CEB (Mcal/dia)	70,49	71,23	77.31	0,279	1,94
EF (Mcal/dia)	19,31	20,51	22.15	0,109	0,729
EF (%CEB)	27,40	28,70	28.67	0,267	0,578
ED_Mcal/dia	51,19	50,73	55.16	0,387	1,40
ED (Mcal/kg MS)	3,04	3,05	3.03	> 0,50	0,0184
ED (% CEB)	72,60	71,30	71.33	0,267	0,578
ECH ₄ (Mcal/dia)	4,22	4,17	4.38	> 0,50	0,141
ECH ₄ (% CEB)	5,99	5,81	5.71	> 0,50	0,141
EU (Mcal/dia)	3,50	3,57	3.75	> 0,50	0,112
EU (% CEB)	4,99	5,03	4.89	> 0,50	0,124
EM (Mcal/dia)	43,47	42,98	47.03	0,345	1,22
EM (Mcal/kg MS)	2,58	2,59	2.58	> 0,50	0,0167
EL _L (Mcal/kg)	14,16	14,86	14.43	> 0,50	0,377
EL _L (%CEB)	20,20	21,10	18.87	0,174	0,493
PCalor (Mcal/dia)	23,77	24,51	25.53	0,378	0,514
PCalor (Kcal/Kg ^{0.75})	215,67	221,26	225.96	0,380	3,19
PCalor (%CEB)	34,05	34,65	33.39	> 0,50	0,571
BE (Mcal/dia)	5,53	3,60	7.07	0,211	0,904
BE (%CEB)	7,38	4,71	8.46	0,280	1,15
<i>Eficiência de utilização da energia</i>					
¹ q. EM/EB	0,62	0,60	0.61	0,293	0,00533
EM/ED	0,85	0,85	0.85	> 0,50	0,00230
PC/CEM	0,56	0,57	0.55	> 0,50	0,0114
BE/CEM	0,11	0,08	0.13	0,320	0,0180
EL _L /EM	0,33	0,35	0.31	0,202	0,00897

EPM = Erro padrão da média. n = 36 CEB. consumo de energia bruta (EB); EF. energia nas fezes; ED. energia digestível; ECH₄. energia perdida na forma de metano; EU. energia bruta urinária; CEM. consumo de energia metabolizável; EM. energia metabolizável; PCalor. produção de calor diária; BE. balanço energético;

EL_L, energia líquida de lactação; ¹q, proporção de energia metabolizável contida na energia bruta do alimento (EM/EB, conforme AFRC,1993) ; *Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Assim como na avaliação da eficiência energética, a partição de N não foi afetada por nenhuma das dietas (Tabela 6).

Tabela 6. Efeito da adição de amilase e substituição da monensina por óleos essenciais na partição do nitrogênio

	Monensina	Monensina + Amilase	OE+ Amilase	Valor P	EPM
<i>Nitrogênio (g/dia)</i>					
Nitrogênio total	552	586	598	0,400	14,2
Fecal	121	131	138	0,159	4,22
Urinário	282	298	297	> 0,50	8,13
Leite	105	113	108	> 0,50	3,19
Total excretado	508	542	543	> 0,50	13,4
Retido	43.8	43.8	55.1	0,747	7,68
<i>Nitrogênio (% N ingerido)</i>					
Fecal	21,9	22,4	23,1	0,409	0,437
Urinário	51,4	51,5	49,5	> 0,50	1,11
Leite	19,0	19,4	18,1	0,239	0,337
Total excretado	92,3	93,3	90,7	> 0,50	1,26
Retido	7,70	6,70	9,30	> 0,50	1,26
Peso vivo, Kg	530	532	528	> 0,50	8,43

EPM = Erro padrão da média

*Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de SLM a 5% de probabilidade

Para os parâmetros sanguíneos, a inclusão de amilase em dietas com monensina não implicou em alterações significantes (Tabela 7), contudo, a substituição da monensina por OE reduziu a concentração de Ácidos graxos não esterificados (AGNE (0,40 mmol/L)).

Tabela 7. Efeito da adição de amilase e substituição da monensina por OE nas concentrações plasmáticas de glicose, ureia, triglicérides, AGNE e β-hidroxibutirato

	Monensina	Monensina + Amilase	OE + Amilases	Valor P	EPM
<i>mg/dL</i>					
Glicose	68.15	71.73	66.95	0.135	1.02
Ureia	62.61	64.21	60.74	0.447	1.09
Triglicérides	11.70	11.12	11.12	> 0.50	0.441
<i>mmol/L</i>					
AGNE	0.59 _A	0.51 _A	0.40 _B	< 0.001	0.0204
β-hidroxibutirato	0.86	0.88	0.97	0.157	0.0263

EPM = Erro padrão da média; AGNE = ácidos graxos não esterificados *Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de SLM a 5% de probabilidade

VI – DISCUSSÃO

Um benefício da monensina é a regulação do consumo de matéria seca (CMS). Esse mecanismo não é bem esclarecido na literatura, entretanto, ocorre provavelmente em razão do aumento do tempo de retenção da dieta ingerida no rúmen. Esse efeito é causado devido à ação do propionato, um ácido graxo de cadeia curta (precursor da glicose) responsável pela regulação da saciedade em ruminantes (Rogers; Davis, 1982). Outro mecanismo de regulação, menos utilizado que o anterior, é o de Baile *et al.* (1979), que atribuíram a redução no consumo ao sabor do ionóforo, que não é palatável aos animais. Em nosso estudo, a amilase pode ter reduzido este efeito, conferindo aumento do consumo das dietas com amilase.

No trabalho de McCarthy *et al.* (2013), o consumo não foi afetado e a produção de leite tendeu a ser maior ($P=0,06$) para as vacas que receberam amilase exógena em dietas ricas em subprodutos. Ferrareto *et al.* (2011) e Nozière *et al.* (2014) também não encontraram diferenças no consumo de matéria seca e na produção de leite, quando testaram o efeito da amilase em dietas com diferentes teores de amido e com vacas em diferentes níveis de produção.

A resposta positiva divergente para consumo de matéria seca e produção de leite do presente trabalho pode estar relacionada às diferenças na dureza do grão de milho disponíveis nos países de clima tropical, vítreo, em relação aos países de clima temperado, dentado. As enzimas exógenas podem ser maximizadas durante períodos de consumo limitado de energia, como o início da lactação (Beauchemin *et al.*, 2003). Em nosso estudo, a média de 75 ± 34 dias em lactação (DEL) pode contribuir para a resposta positiva na produção de leite com suplementação de amilase.

O uso de Monensina em bovinos leiteiros em lactação reduziu significativamente o CMS em 0,3 kg, conforme descrito por Duffield *et al.* (2008b) em um estudo de meta-análise. Assim, a adição de amilase em dietas de vacas leiteiras com monensina pode ser uma estratégia para aumentar o CMS.

Provavelmente, a glicose liberada da hidrólise de amido pela amilase exógena é predominantemente fermentada através das vias de AGV de cadeia ímpar, e as mudanças no perfil de AGV podem explicar as mudanças nos constituintes do leite. Nozière *et al.* (2014) descreveram que a suplementação com amilase exógena em dieta de alto teor de

amido para vacas de primeira lactação induziu uma mudança nas proporções molares de propionato e valerato, que aumentou à custa de acetato e butirato.

Propionato é o único ácido graxo volátil que pode ser convertido à glicose, podendo, então, ser utilizada como fonte de energia pelos ruminantes. A redução na relação acetato/propionato leva a um menor incremento calórico porque o ácido propiônico apresenta menor incremento de calor que o ácido acético. Redução na produção de metano também melhora a retenção de carbono e energia (Millen, 2008).

O efeito da amilase na composição do leite é variável, Nozière *et al.* (2014) não observaram efeito em dietas de baixo e alto amido em vacas primíparas. Ferrareto *et al.* (2011) não observaram diferenças na composição e produção de constituintes de vacas de alta produção recebendo ou não amilase exógena. Já McCarthy *et al.* (2013) observaram aumento nos teores de proteína e redução na produção de lactose. Essas diferenças podem ser explicadas pela variação dos níveis de inclusão de amido e da presença de subprodutos entre os trabalhos que avaliaram o efeito da presença de amilase.

A ausência de efeito da amilase sobre a digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes, durante o teste de metabolismo, está de acordo com o resultado relatado por Tricarico *et al.* (2005), DiLorenzo *et al.* (2011) e McCarthy *et al.* (2013). Nozière *et al.* (2014) não relataram diferença na digestibilidade de amido, considerando o trato total, mas a digestibilidade ruminal do amido aumentou de 75% na dieta controle para 81% com adição de amilase em vacas de primeira lactação alimentadas com dietas de altas e baixas concentrações de amido.

A modificação do local e a taxa de digestão de amido podem ter contribuído para o maior rendimento do leite observado nas vacas tratadas com amilase em nosso estudo, pois maior digestão ruminal do amido fornece mais energia para os microrganismos do rúmen, maximizando a produção de proteína microbiana (Poore *et al.*, 1993).

A α -amilase é a enzima responsável por quebrar as ligações entre os grânulos de amido. Esta hidrólise ocorre através da clivagem das ligações α -1,4 e α -1,6 dos grânulos de amido (Tricarico *et al.*, 2008). Todavia, a digestibilidade do amido de milho pode ser limitada pela matriz proteica, encontrada principalmente no endosperma vítreo. Portanto, a degradação da matriz proteica pode melhorar a taxa e a extensão da digestão do amido (McAllister *et al.*, 2001).

A parte mais importante na matriz proteica são as prolaminas, que são proteínas do endosperma que desenvolvem estruturas terciárias, sendo altamente hidrofóbicas, portanto, insolúveis em solventes normais para o ambiente ruminal (Momany *et al.*, 2006). Em

nosso estudo, mesmo usando grãos obtidos em clima tropical, que tendem a ter maior vítreosidade, a adição de amilase não melhorou a digestibilidade do amido.

Um dos resultados esperados com a suplementação de amilase exógena para ruminantes é o aumento da digestibilidade da FDN pelo maior suprimento de carboidratos solúveis no ambiente ruminal (Weiss *et al.*, 2011), resultado não observado no presente estudo.

Em ruminantes alimentados com dietas ricas em concentrados, a digestibilidade da fibra frequentemente tem sido aumentada pela monensina e esse aumento pode ser resultado do maior tempo de retenção da fibra no rúmen, o que favorece a digestão microbiana da mesma (EMBRAPA, 2006).

Em dietas contendo amido, a monensina reduz a porcentagem de amido digerido no rúmen e aumenta a quantidade de amido digerido no intestino e essa mudança no local de digestão deve resultar em mais energia, sendo absorvida como glicose no intestino do que como ácido graxo volátil no rúmen e, assim, pode permitir o uso mais eficiente da energia. A monensina também pode aumentar a capacidade enzimática para digestão do amido no intestino delgado, e maior atividade de amilase é encontrada nas fezes e pâncreas de bovinos que recebem monensina (EMBRAPA, 2006).

Gallo *et al.* (2016) observaram que a amilase diminuiu o tempo de latência e o aumento da taxa e produção de gás em ensaio de produção de gás *in vitro*. Esse efeito da amilase é provavelmente devido à maior hidrólise de amido, fornecendo substratos para a multiplicação de outras espécies microbianas, principalmente, microrganismos fibrolíticos (Tricarico *et al.*, 2008; Vargas-Rodriguez *et al.*, 2014) como processo de alimentação cruzada entre microrganismos do rúmen (Russell, 1985).

O aumento da produção de CH₄ por kg de FDN consumido e digerido, quando a amilase foi adicionada, indica alteração da fermentação ruminal, provavelmente devido ao incremento do “cross feeding” entre os microrganismos, favorecido pelo aumento de metabólitos, produtos da ação da amilase, embora a digestibilidade de FDN não tenha sido afetada.

Os dados da emissão de CH₄ do nosso estudo (com vacas produzindo 19,4 kg / dia de leite) foram inferiores aos relatados por Ranga Niroshan Appuhamy *et al.* (2013) em meta-análise do efeito anti-metanogênico da monensina. Esta meta-análise incluiu 11 estudos realizados em condições de clima temperado com vacas *Bos Taurus* com um rendimento médio de leite de 20,5 kg / d e emissões médias de 338 g / dia, 6,87% de perda de energia na forma de CH₄ e ingestão de matéria seca de 18,6 kg / dia.

O metano pode ser afetado por um efeito seletivo dos óleos essenciais através da inibição direta das archaea metanogênicas e/ou depressão dos processos metabólicos microbianos envolvidos na metanogênese (Bodas et al., 2012). A utilização de recursos que atuem na redução da emissão de CH₄ de origem ruminal resultam em benefícios econômicos, pela maior eficiência na utilização dos alimentos e, principalmente, benefícios para o meio ambiente (McGinn et al., 2004).

A realização de único ensaio de bioenergética e de balanço de nitrogênio não permitiu detectar a influência da adição de amilase na partição de energia e nitrogênio. Sugerimos que, em estudos futuros, essas avaliações sejam realizadas em diferentes momentos ao longo da lactação ou período de avaliação. Isso visa elucidar os processos metabólicos que conferem aumentos no rendimento do leite com adição de amilase a dietas com monensina.

O balanço positivo de nitrogênio indica que houve retenção de proteína no organismo animal, proporcionando condições para que não ocorresse perda de peso nos animais, indicando, provavelmente, que as exigências de proteína nas dietas foram satisfeitas. Takiya *et al.* (2017) relatam tendências de diminuição linear de N excretadas em fezes, quando introduziram um extrato de *Aspergillus oryzae* com atividade de alfa-amilase em dietas de gado leiteiro, contudo, outros estudos, que avaliaram o metabolismo de N, não relataram diferenças na excreção de N (Klingerman *et al.*, 2009; Gencoglu *et al.*, 2010; Nozière *et al.*, 2014).

DeFrain *et al.* (2005) relataram tendência de grandes níveis de concentração de glicose para vacas suplementadas com amilase no início da lactação, mas Tricarico *et al.*, (2005) e Takiya *et al.* (2017) não observaram diferenças na concentração de glicose no sangue para vacas leiteiras suplementadas com amilase, de acordo com nossos resultados.

O efeito positivo sobre a produção de leite, gordura, proteína e sólidos totais nas vacas alimentadas com OE + Amilase pode ter sido influenciado pelo maior consumo de matéria seca. O efeito supressor da monensina na porcentagem de CMS, gordura e proteína pode ter contribuído para maior porcentagem de CMS, gordura e proteína para o grupo que recebeu OE + Amilase em comparação com a dieta com Monensina + Amilase. A metanálise do impacto da monensina na produção em gado leiteiro (Duffield *et al.*, 2008a) mostrou redução significativa de CMS em 0,3 kg, gordura do leite (0,13%) e proteína (0,03%) em vacas leiteiras em lactação.

De acordo com Giannenas *et al.* (2011), a inclusão de Ruminantes Crina® aumentou a produção total de leite em ovelhas que receberam 50, 100 e 150 mg de Crina®

/ kg de concentrado em comparação com o controle sem Crina®. Embora os autores tenham demonstrado que a inclusão de Crina® não afetou a composição do leite, diminuiu a concentração de ureia e a contagem de células somáticas em amostras de leite no nível de suplementação mais elevado em comparação com o controle. No entanto, o uso desse mesmo produto a 750 mg e 2 g / dia (Benchaar *et al.*, 2006; Benchaar *et al.*, 2007) ou 1 g / dia (Vendramini *et al.*, 2016) não alterou o CMS, rendimento e composição do leite em vacas holandesas. De acordo com nossos resultados, Drong *et al.* (2016) observaram que a suplementação de OE para vacas leiteiras de transição aumentou o teor de gordura do leite, mas relatou tendências para aumentar a excreção de nitrogênio no leite, fezes e urina.

De acordo com Ranga Niroshan Appuhamy *et al.* (2013), em estudo de meta-análise, a monensina tem a capacidade de reduzir marginalmente a emissão de CH₄ em vacas leiteiras (-6g / d CH₄). Portanto, é desejável que qualquer substituto tenha essa capacidade. A substituição de monensina por OE não aumentou nenhum dos parâmetros de CH₄ avaliados no presente estudo, indicando que a monensina pode ser substituída por OE sem alterar a emissão de CH₄.

De acordo com nossos resultados, Tomkins *et al.* (2015) encontraram as mesmas emissões para bovinos de corte alimentados com capim Rhodes (*Chloris gayana*) de média a baixa qualidade, suplementadas com CRINA® (1 ou 2 g / d) ou monensina (60 mg / d), mas em alta dose de monensina (250 mg / dia) e observaram redução do metano entérico, devido à diminuição do CMS. Klop *et al.* (2017) mostraram que a alimentação contínua de um concentrado continha uma mistura de óleos essenciais (Agolin Ruminant, Agolin SA, Bière, Suíça) para vacas leiteiras que resultou em um declínio transitório de 12% no rendimento de CH₄ (g / kg de CMS) e 11 % de intensidade (g / kg de LCGP).

A medição do metano em nosso experimento foi realizada com animais suplementados por mais de 3 semanas com OE + amilase ou monensina + amilase. Portanto, nossos resultados representam os efeitos a longo prazo dos aditivos, excluindo os efeitos provavelmente transitórios da monensina + amilase ou OE + amilase.

O ensaio de bioenergética e de balanço de nitrogênio não explicou as variações na produção e composição do leite. Dessa forma, ensaios em diferentes momentos ao longo da lactação ou período de avaliação podem ser importantes para explicar as maiores produções de LCG e LCE, quando a monensina é substituída por OE. A tendência de maior excreção de N fecal em animais suplementados com OE + amilase pode ter sido influenciada pela tendência de menor digestibilidade de proteína bruta em animais suplementados com OE + amilase, sendo o nitrogênio retido utilizado para manutenção. As

tendências de maior excreção de N fecal estão de acordo com o estudo de Drong *et al.* (2016), focado na suplementação de OE para vacas leiteiras de transição.

Uma metanálise relacionada com os efeitos metabólicos da monensina em bovinos leiteiros em lactação (Duffield *et al.*, 2008b) apresentou redução significativa de BHBA (13%), acetoacetato (14%) e AGNE (7%). No entanto, para as concentrações de glicose no sangue e ureia, os autores relataram aumentos de 3 e 6%, respectivamente. É desejável que quaisquer substitutos da monensina não afetem negativamente os parâmetros sanguíneos das vacas leiteiras.

A concentração de ureia plasmática em ruminantes está diretamente relacionada com o consumo de proteína e tem sido usada para verificar o estado nutricional proteico dos animais (Ruas *et al.*, 2000). A ureia difunde-se facilmente nos tecidos do organismo dos bovinos. Quando a taxa de produção de amônia é maior que a sua utilização pelos microrganismos ruminais, observa-se alteração da concentração de NH_3 no rúmen, com consequente excreção de ureia e aumento do custo energético da produção de ureia, resultando, assim, em perda de proteína (Morrison & Mackie, 1996).

Não há efeitos negativos da substituição da monensina por OE e valores mais baixos de AGNE, assim, para o tratamento por OE, indicam a ação metabólica sistêmica deste aditivo. O equilíbrio energético foi o mesmo para todos os tratamentos, mas os baixos níveis de AGNE para o tratamento com OE + Amilase são evidências de possíveis efeitos positivos de OE no metabolismo energético, relacionado à menor mobilização lipídica do corpo.

Uma das primeiras respostas do organismo ao balanço energético negativo (BEN) é a mobilização do tecido adiposo e a capacidade do tecido muscular esquelético de utilizar AGNE para gerar energia para manutenção (Overton & Waldron, 2004). Os AGNE são usados como fonte de energia pelo fígado e por outros tecidos, e sua oxidação celular faz parte dos sinais fisiológicas de saciedade (Van Saun, 2000).

Em contraste com nossos resultados, Drong *et al.* (2016) demonstraram que uma cápsula de liberação controlada de monensina melhorou o estado da energia e a utilização de AGNE circulante de vacas leiteiras de transição enquanto OE (CRINA®) não conseguiu provocar nenhum efeito.

Hausmann *et al.* (2017) avaliaram a associação entre OE e niacina em vacas no periparto e observaram que as concentrações séricas de triglicerídeos e glicose diminuíram pós-parto em ambos os grupos, sem diferenças significativas entre os mesmos ($P > 0,05$). AGNE e BHB entre os grupos que receberam ou não o aditivo foram semelhantes no pré e

pós-parto. No entanto, Tassoul e Shaver (2009) não encontraram diferença nos parâmetros de sangue de vacas leiteiras de alta produção que receberam CRINA, em comparação com o controle, embora apresentassem tendências para um balanço energético mais negativo para o grupo suplementado com CRINA. São necessários mais estudos para compreender melhor os fatores relacionados à ação metabólica sistêmica do OE.

VII - CONCLUSÃO

Os óleos essenciais associados à amilase podem ser usados em dietas para vacas em lactação como substituto da monensina, pois melhora a eficiência e potencializa a produção de leite.

VIII - REFERÊNCIAS

AFRC. AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL. 1993. Energy and requirements of ruminants. (**Commonwealth Agricultural Bureaux International**, Wallingford), 159.

ALLEN, M.S. 2014. Drives and limits to feed intake in ruminants. **Animal Production Science**. 54:1513–1524. doi:10.1071/AN14478.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. Vol. 15th ed. **Association of Official Analytical Chemists** (AOAC), Arlington, VA.

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. Vol. 15th ed. **Association of Official Analytical Chemists** (AOAC), Washington, D.C.), 2000.

BAILE, C. A; MCLAUGHLIN, C. L.; POTTER, E. L.; CHALUPA, W. Feeding behavioural changes of cattle during introduction to monensin with roughage or concentrate diets. **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 6, p. 1501-1508, 1979.

BEAUCHEMIN, K.A., D. COLOMBATTO, D.P. MORGAVI, AND W.Z. YANG. 2003. Use of Exogenous Fibrolytic Enzymes to Improve Feed Utilization by Ruminants 1 , 2. **Journal of Animal Science**. 37–47. doi:/2003.8114_suppl_2E37x.

BENCHAAR, C., PETIT, 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. **Journal of Dairy Science**. 90, 886-897, [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71572-2](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71572-2).

BENCHAAR, C.; DUYNISVELD, J.L.; CHARMLEY, E. Effects of monensin and increasing dose levels of a mixture of essential oil compounds on intake, digestion and growth performance of beef cattle. **Journal of Animal Science**., Ottawa, v. 86, n. 1, p. 91-96, 2006.

BODAS, R. et al. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. **Animal Feed Science and Technology** 176: 78-93, 2012.

BROUWER, E. 1965. Report of sub-committee on constants and factors. Pages 441–443 in **Energy Metabolism of Farm Animals**, Academic Press, London, UK.

CALSAMIGLIA, S., M. BUSQUET, P.W. CARDOZO, L. CASTILLEJOS, AND A. FERRET. 2007. Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. **Journal of Dairy Science**. 90:2580–2595. doi:10.3168/jds.2006-644.

DEFRAIN, J.M., A.R. HIPPEN, K.F. KALSCHEUR, AND J.M. TRICARICO. 2005. Effects of Dietary α -Amylase on Metabolism and Performance of Transition Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**. 88:4405–4413. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)73127-1.

DILORENZO, N., D.R. SMITH, M.J. QUINN, M.L. MAY, C.H. PONCE, W. STEINBERG, M.A. ENGSTROM, AND M.L. GALYEAN. 2011. Effects of grain processing and supplementation with exogenous amylase on nutrient digestibility in feedlot diets. **Livestock Science**. 137:178–184. doi:10.1016/j.livsci.2010.11.003.

DRONG, C., U. MEYER, D. VON SOOSTEN, J. FRAHM, J. REHAGE, G. BREVES, AND S. DÄNICKE. 2016. Effect of monensin and essential oils on performance and energy metabolism of transition dairy cows. **Journal of Animal Physiology**. Anim. Nutr. (Berl.) 100:537–551.

DUFFIELD, T.F., A R. RABIEE, AND I.J. LEAN. 2008a. A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 2. Production effects.. **Journal of Dairy Science**. 91:1347–1360. doi:10.3168/jds.2007-0608.

DUFFIELD, T.F., A R. RABIEE, AND I.J. LEAN. 2008b. A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 1. Metabolic effects.. **Journal of Dairy Science**. 91:1334–1346. doi:10.3168/jds.2007-0608.

EMBRAPA, Utilização de Ionóforos para Bovinos de Corte. Documentos 101, jul., 2006.

EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL, 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. **Official Journal of the European Communities**. L268, 29-43.

FERRARETO, L. F., SHAVER, R. D., ESPINHEIRA, M., GENCOGLU, H., BERTICS, S. J. 2011. Influence of a reduced-starch diet with or without exogenous amylase on lactation performance by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.94, p. 1490-1499.

GALLO, A., G. GIUBERTI, AND F. MASOERO. 2016. Gas production and starch degradability of corn and barley meals differing in mean particle size. **Journal of Dairy Science**. 99:4347–4359. doi:10.3168/jds.2015-10779.

GENCOGLU, H., R. D. SHAVER, W. STEINBERG, J. ENSINK, L. F. FERRARETO, S. J. BERTICS, J. C. LOPES, AND M. S. AKINS. 2010. Effect of feeding a reduced-starch diet with or without amylase addition on lactation performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. 93:723–732.

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

HAUSMANN, J., DEINER, C., IMMIG, I., PIEPER, R., STARKE, A., ASCHENBACH, J. R. 2017. Effects of combined supplementation with plant bioactive lipid compounds and biotin on ruminal fermentation, body condition and energy metabolism in transition dairy cows. **Animal Feed Science Technology**. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.anifeedsci.2017.01.009>

HRISTOV, A. N., C. E. BASEL, A. MELGAR, A. E. FOLEY, J. K. ROPP, C. W. HUNT, AND J. M. TRICARICO. 2008. Effect of exogenous polysaccharide- degrading enzyme preparations on ruminal fermentation and digestibility of nutrients in dairy cows. **Animal Feed Science Technology**. 145:182–193.

IFCN World Dairy Map 2014. **Results of the IFCN Dairy Report 2013** – www.ifcndairy.org.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION – IDF. **International Standard 141C:2000**. Whole milk – Determination of milkfat, protein and lactose content. Guidance on the operation of mid-infrared instruments. Bruxelles: International Dairy Federation, 2000

KLINGERMAN, C.M., W. HU, E.E. MCDONELL, M.C. DERBEDROSIAN, AND L. KUNG. 2009. An evaluation of exogenous enzymes with amylolytic activity for dairy cows. **Journal of Dairy Science**. 92:1050–1059. doi:10.3168/jds.2008-1339.

KLOP, G., J. DIJKSTRA, K. DIEHO, W.H. HENDRIKS, AND A. BANNINK. 2017. Enteric methane production in lactating dairy cows with continuous feeding of essential oils or rotational feeding of essential oils and lauric acid. **Journal of Dairy Science**. 100:3563–3575. doi:10.3168/jds.2016-12033.

MACHADO, F. S. *ET AL*. 2016. Technical note: A facility for respiration measurements in cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 6, p. 4899-4906.

MCALLISTER TA, HRISTOV AN, BEAUCHEMIN KA, RODE LM, CHENG KJ. 2001. Enzymes in ruminant diets. **In: Bedford MR, Partridge GG, editors. Enzymes in farm animal nutrition**.Oxon: Cab International; p.273-298

MCCARTHY, M. M., M. A. ENGSTROM, E. AZEM, AND T. F. GRESSLEY. 2013. The effect of an exogenous amylase on performance and total- tract digestibility in lactating dairy cows fed a high-byproduct diet. **Journal of Dairy Science**. 96:3075–3084.

MCGINN, S.M. et al. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. **Journal of Animal Science**, v.82, p.3346-3356, 2004.

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

MERTENS, D.R. 1997. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows, **Journal of Dairy Science**., v.80, p.1463. doi:10.3168/jds.S0022-0302(97)76075-2

MILLEN, D. D. **Desempenho, avaliação ruminale perfil metabólico sanguíneo de bovinos jovens confinados suplementados com monensina sódica ou anticorpos**

policlonais. 2008. 131f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia e Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

MOMANY FA, SESSA DJ, LAWTON JW, SELLING GW, HAMAKER SAH AND WILLET JL. 2006. Structural characterization of alpha-zein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** [acesso em 03 maio 2017]; 54 (1): 543-547. Disponível em: http://www.researchgate.net/publication/7355762_Structural_Characterization_of_-Zein

MORRISON, M.; MACKIE, R.I. Nitrogen metabolism by ruminal microorganism: current understanding and future perspectives. **Journal Agriculture Research**, v.47, p.227-246, 1996.

NOZIÈRE, P., W. STEINBERG, M. SILBERBERG, AND D.P. MORGAVI. 2014. Amylase addition increases starch ruminal digestion in first-lactation cows fed high and low starch diets. **Journal of Dairy Science**. 97:2319-2328.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7. ed., Washington, D.C.: National Academic Press, 2000. 242p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. ed. Washinton, D.C.: National Academic Press, 2001. 381 p.

OBA, M., AND M.S. ALLEN. 2003. Effects of Corn Grain Conservation Method on Feeding Behavior and Productivity of Lactating Dairy Cows at Two Dietary Starch Concentrations. **Journal of Dairy Science**. 86:174–183. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73598-X.

OVERTON, T.R.; WALDRON, M.R. Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health, **Journal of Dairy Science**, v.87, p.E105–E119, 2004.

PAREKH, H. K. 1986. A new formula for fat-corrected milk. **Indian Journal Animal Science**. 56:608–609.

PATRA, A.K., YU, Z., 2015. Essential oils affect populations of some rumen bacteria in vitro as revealed by microarray (RumenBactArray) analysis. **Frontiers in Microbiology**. 6, 297, <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00297>.

POORE, M.H.; MOORE, J.A.; ECK, T.P.; SWINGLE, R.S.; THEURER, C.B. Effect of fiber source and ruminal starch degradability on site and extent of digestion in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.2244-2253, 1993.

RANGA NIROSHAN APPUHAMY. J. A. D. , STRATHE, A. B.; JAYASUNDARA, S.; WAGNER-RIDDLE, C.; DIJKSTRA, J.; FRANCE, J. AND KEBREAB, E. 2013. Anti-methanogenic effects of monensin in dairy and beef cattle: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**. 96 :1–13. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5923>

ROGERS, J. A.; DAVIS, C. L. Rumen volatile fatty acid production and nutrient utilization in steers fed a diet supplemented with sodium bicarbonate and monensin. **Journal of Dairy Science**, Albany, v. 65, p. 944-952, 1982.

RUAS, J.R.M.; TORRES, C.A.A.; BORGES, L.E. Efeito da suplementação protéica a pasto sobre eficiência reprodutiva e concentração sanguínea de colesterol, glicose e ureia em vacas Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.2043-2050, 2000.

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

RUSSELL, J.B. 1985. Fermentation of cellodextrins by cellulolytic and noncellulolytic rumen bacteria. **Applied Environmental Microbiology**. 49:572–576.

RUSSELL, J.B. A proposed model of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: effects on ion flux and proton motive force. **Journal of Animal Science**, v.64, p.1519-1525, 1987.

SAS. 2006. User's Guide: Statistics. Version 9.4 SAS Inst. Inc., Cary, NC.

TAKIYA, C.S., G.D. CALOMENI, T.H. SILVA, T.H.A. VENDRAMINI, G.G. SILVA, C.E.C. CONSENTINI, J.C. BERTONI, E.M.C. ZILIO, AND F.P. RENNÓ. 2017. Increasing dietary doses of an *Aspergillus oryzae* extract with alpha-amylase activity on nutrient digestibility and ruminal fermentation of lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**. 228:159–167. doi:10.1016/j.anifeedsci.2017.04.017.

TASSOUL, M.D., AND R.D. SHAVER. 2009. Effect of a mixture of supplemental dietary plant essential oils on performance of periparturient and early lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**. 92:1734–1740. doi:10.3168/jds.2008-1760.

TOMKINS, N.W., S.E. DENMAN, R. PILAJUN, M. WANAPAT, C.S. MCSWEENEY, AND R. ELLIOTT. 2015. Manipulating rumen fermentation and methanogenesis using an essential oil and monensin in beef cattle fed a tropical grass hay. **Animal Feed Science and Technology**. 200:25–34. doi:10.1016/j.anifeedsci.2014.11.013.

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

TRICARICO, J.M., J.D. JOHNSTON, K.A. DAWSON, K.C. HANSON, K.R. MCLEOD, AND D.L. HARMON. 2005. The effects of an *Aspergillus oryzae* extract containing alpha-amylase activity on ruminal fermentation and milk production in lactating Holstein cows. **Journal of Animal Science**. 81:365–374. doi:10.1079/ASC50410365.

VAN SAUN, R. **Blood profiles as indicators of nutritional status**. Corvallis, Oregon: Department of Large Animal Clinical Sciences, 2000.

VAN SOEST, P. J., J. B. ROBERTSON, AND B. A. LEWIS. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal production. **Journal of Dairy Science**. 74:3583–3597.

VARGAS-RODRIGUEZ, C.F., M. ENGSTROM, E. AZEM, AND B.J. BRADFORD. 2014. Effects of dietary amylase and sucrose on productivity of cows fed low-starch diets. **Journal of Dairy Science**. 97:4464–4470. doi:10.3168/jds.2013-7845.

VENDRAMINI, T.H.A., C.S. TAKIYA, T.H. SILVA, F. ZANFERARI, M.F. RENTAS, J.C. BERTONI, C.E.C. CONSENTINI, R. GARDINAL, T.S. ACEDO, AND F.P. RENNÓ. 2016. Effects of a blend of essential oils, chitosan or monensin on nutrient intake and digestibility of lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**. 214:12–21. doi:10.1016/j.anifeedsci.2016.01.015.

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