

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM EXTRATOS VEGETAIS OU  
MONENSINA NA INGESTÃO DE NUTRIENTES, DIGESTIBILIDADE,  
FERMENTAÇÃO RUMINAL E METABOLISMO EM VACAS LEITEIRAS**

**SARAH NOGUEIRA DA SILVA E SILVA**

**SALVADOR - BA**

**Junho de 2021**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM EXTRATOS VEGETAIS OU  
MONENSINA NA INGESTÃO DE NUTRIENTES, DIGESTIBILIDADE,  
FERMENTAÇÃO RUMINAL E METABOLISMO EM VACAS LEITEIRAS**

**SARAH NOGUEIRA DA SILVA E SILVA**  
Zootecnista

**SALVADOR - BA**  
**Junho de 2021**

**SARAH NOGUEIRA DA SILVA E SILVA**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM EXTRATOS VEGETAIS  
OU MONENSINA NA INGESTÃO DE NUTRIENTES,  
DIGESTIBILIDADE, FERMENTAÇÃO RUMINAL E  
METABOLISMO EM VACAS LEITEIRAS**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Mestrado em  
Zootecnia, da Universidade Federal  
da Bahia como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre  
em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção de  
Ruminantes

Orientador: Prof. Dr. José Esler de Freitas Junior

Coorientador: Dr<sup>a</sup> Maria Leonor Garcia Melo Lopes Araújo

**SALVADOR – BAHIA**

**JUNHO DE 2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas  
(SIBI/UFBA), com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Nogueira da Silva e Silva, Sarah  
Efeitos da suplementação com extratos vegetais ou  
monensina na ingestão de nutrientes, digestibilidade,  
fermentação ruminal e metabolismo em vacas leiteiras /  
Sarah Nogueira da Silva e Silva. -- Salvador, 2021.  
69 f. : il

Orientador: José Esler de Freitas Junior.  
Coorientadora: Maria Leonor Garcia Melo Lopes  
Araújo.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em  
Zootecnia) -- Universidade Federal da Bahia, Escola  
de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2021.

1. Digestibilidade aparente. 2. Óleo essencial. 3.  
Perfil de ácidos graxos do leite. 4. Saponinas. I. de  
Freitas Junior, José Esler. II. Garcia Melo Lopes  
Araújo, Maria Leonor. III. Título.

**“EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM EXTRATOS VEGETAIS OU  
MONENSINA NA INGESTÃO DE NUTRIENTES, DIGESTIBILIDADE,  
FERMENTAÇÃO RUMINAL E METABOLISMO EM VACAS LEITEIRAS”**

**Sarah Nogueira da Silva e Silva**

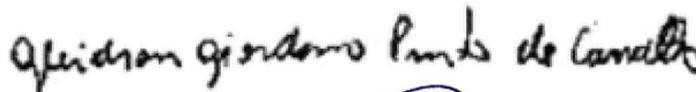
**Dissertação defendida e aprovada para obtenção do grau de  
Mestre em Zootecnia**

**Salvador, 11 de junho de 2021**

**Comissão examinadora:**



**Dr. José Esler de Freitas Júnior  
UFBA  
Orientador / Presidente**



**Dr. Gleidson Giordano Pinto de Carvalho  
UFBA**



**Dr. Francisco Palma Rennó  
USP**

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

Este trabalho é dedicado à minha avó, Maria Raquel da Silva, a quem não pude dizer adeus.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado vida e saúde para que eu conduzisse este trabalho.

Agradeço aos meus pais, João Pereira e Zélia Nogueira, pelo apoio incondicional e todo o esforço que fizeram para que eu percorresse esse caminho.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr<sup>o</sup> José Esler de Freitas Júnior, por ter me confiado esse projeto, por todo o ensinamento, acompanhamento e excelente orientação ao longo desses dois anos.

À Fernanda Gazar e Layse Gordiano, pelo acolhimento e suporte que me deram desde a minha chegada na Fazenda. Sou muito grata em tê-las como amigas.

A todos da Fazenda Experimental de Entre Rios, pelo acolhimento e carinho que tiveram por mim e pela assistência durante a fase de campo deste trabalho. Tenho um enorme carinho e gratidão por todos.

À Dr. Maria Leonor Araújo por todo o auxílio durante o mestrado.

Agradeço à Fernanda Gazar, Juliana Macedo e Layse Gordiano, minhas companheiras de "confinamento", por todas as risadas, conversas, apoio e aprendizado. A convivência com vocês tornava a rotina de trabalho mais leve.

Aos animais, minhas "filhas", as quais apelidei carinhosamente de: Paciência, Pitchula, Carol, Susinha, Princesa, Vitória, Marta e Zangada, pela fundamental participação na execução desse projeto.

Aos alunos de iniciação científica, Alexandre Andrade e Maria Clara Dourados, pela colaboração durante as fases de campo e laboratoriais.

A todos os estagiários da UFBA, UFRB e IFBaiano que tive a felicidade de conhecer e que me ajudaram no início do experimento.

Aos meus amigos: Ana Caroline Porto, Igor Moreno, Juliana Felipe e Susiane Matos, por todos os conselhos e apoio.

A Marcos Júnior que, pacientemente, esteve ao meu lado nos momentos de estresse e ansiedade. Você é calma no meio da tempestade.

Agradeço a minha família por toda a torcida e incentivo.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a execução deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFBA pela excelência de ensino e por todo conhecimento passado. Serei eternamente grata.

Agradeço às agências de pesquisa, CAPES e FAPESB, pela concessão da bolsa de estudos.

**LISTA DE FIGURAS**

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Mecanismos de ação da monensina sódica sobre o fluxo de íons em <i>S. bovis</i> . .....	12
<b>Figura 2.</b> pH ruminal de vacas Jersey de lactação intermediária a tardia alimentadas com diferentes aditivos alimentares .....	41
<b>Figura 3.</b> Concentração de nitrogênio amoniacal ruminal (NH <sub>3</sub> -N, mg / dL) de vacas Jersey de lactação intermediária a tardia alimentadas com diferentes aditivos alimentares .....	42

**LISTA DE TABELAS**

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Consumo de matéria seca (CMS) e produção de leite (PL) de vacas em lactação suplementadas com extratos vegetais (EV) e monensina (MON)..	27
<b>Tabela 2.</b> Ingredientes e composição química da dieta basal .....	29
<b>Tabela 3.</b> Consumo de nutrientes e digestibilidade aparente total de vacas Jersey em lactação média, alimentadas com diferentes aditivos .....	38
<b>Tabela 4.</b> Efeitos de diferentes aditivos na fermentação ruminal de vacas Jersey em lactação média .....	40
<b>Tabela 5.</b> Influência de diferentes aditivos na população bacteriana do rúmen de vacas Jersey em lactação média .....	42
<b>Tabela 6.</b> Balanço de Nitrogênio (N), síntese de proteína microbiana e utilização de energia de vacas Jersey em meio de lactação alimentadas com diferentes aditivos .....	43
<b>Tabela 7.</b> Metabólitos sanguíneos de vacas Jersey de lactação intermediária a tardia alimentadas com diferentes aditivos alimentares .....	44
<b>Tabela 8.</b> Produção e composição do leite de vacas Jersey em lactação media alimentadas com diferentes aditivos .....	45
<b>Tabela 9.</b> Perfil de ácidos graxos do leite de vacas Jersey em lactação media alimentadas com aditivos .....	46

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AGV	Ácidos graxos voláteis
AST	Aspartatoaminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BHBA	Beta-hidroxibutirato
CCS	Contagem de células somáticas
CLA	Ácido linoleico conjugado
CMS	Consumo de matéria seca
CNF	Carboidratos não fibrosos
CON	Controle
DP	Derivados de purina
ECC	Escore de condição corporal
ECM	Leite com correção de energia
ED	Energia digestível
EE	Extrato etéreo
ESD	Extrato seco desengordurado
EST	Extrato seco total
FCM	Leite corrigido para gordura
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
FDNi	Fibra em detergente neutro indigestível
GGT	Gama-glutamyltransferase
HAP	Hiper produtoras de amônia
MO	Matéria orgânica
MOE	Mistura de óleos essenciais
MON	Monensina
MS	Matéria Seca
MUFA	Ácidos graxos monoinsaturados
N-NH <sub>3</sub>	Nitrogênio amoniacal
NEFA	Ácidos graxos não esterificados

NEL	Energia líquida de lactação
Nmic	Nitrogênio microbiano
OE	Óleo essencial
PB	Proteína bruta
PC	Peso corporal
pH	Potencial Hidrogeniônico
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados
SAP	Suplemento alimentar a base de saponinas
SAPEO	Suplemento alimentar a base de saponinas e óleos essenciais

## SUMÁRIO

Efeitos da suplementação com extratos vegetais ou monensina na ingestão de nutrientes, digestibilidade, fermentação ruminal e metabolismo em vacas leiteiras

	<b>Página</b>
RESUMO .....	13
ABSTRACT .....	14
1. INTRODUÇÃO .....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	16
2.1. Monensina.....	16
2.2. Extratos vegetais .....	21
2.3. Saponinas .....	21
2.4. Óleos essenciais .....	24
2.4. Estudos comparativos: Desempenho de vacas em lactação suplementadas com extratos vegetais ou monensina .....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	34
3.1. Considerações éticas e localização .....	34
3.2. Animais, projeto experimental e tratamentos .....	34
3.3. Consumo de nutrientes e digestibilidade aparente do trato total .....	35
3.4. Fermentação ruminal e quantificação bacteriana.....	36
3.5. Balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana.....	39
3.6. Metabólitos sanguíneos.....	40
3.7. Produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite .....	41
3.8. Análises químico-bromatológicas.....	42
3.9. Análises estatísticas .....	42
4. RESULTADOS .....	44
4.1. Consumo de nutrientes e digestibilidade aparente total.....	44
4.2. Fermentação ruminal e quantificação bacteriana.....	45
4.3. Balanço de nitrogênio, síntese de proteína microbiana e utilização de energia.....	48
4.4. Metabólitos sanguíneos.....	49
4.5. Produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite .....	50
5. DISCUSSÕES .....	53
5.2. Consumo de nutrientes e digestibilidade aparente do trato total .....	53
5.2. Fermentação ruminal e população bacteriana.....	54
5.3. Balanço de nitrogênio, síntese de proteína microbiana e utilização de energia... ..	56

5.4. Metabólitos sanguíneos.....	57
5.5. Produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite .....	57
5. CONCLUSÃO .....	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

## Efeitos da suplementação com extratos vegetais ou monensina na ingestão de nutrientes, digestibilidade, fermentação ruminal e metabolismo em vacas leiteiras

### RESUMO

Objetivou-se com este estudo avaliar os efeitos da suplementação de monensina e saponinas isoladas ou combinadas com óleos essenciais (OEs) sobre a ingestão de nutrientes e digestibilidade aparente, parâmetros de fermentação ruminal, população microbiana, balanço de nitrogênio, síntese de proteína microbiana ruminal, metabólitos sanguíneos, produção e composição do leite, e perfil de ácidos graxos do leite de vacas Jersey no terço médio de lactação. Foram utilizadas oito vacas Jersey em lactação, canuladas no rúmen (média de produção de leite de  $17,6 \pm 5,5$  kg/dia e  $100,5 \pm 26,6$  dias de lactação (média  $\pm$  DP)) distribuídas em dois quadrados latino  $4 \times 4$ , com períodos de 21 dias (últimos sete dias para amostragem). As sequências de tratamento foram designadas aleatoriamente entre os animais e consistiram em: (1) CON - Controle, sem aditivo alimentar; (2) SAP - 16 g / vaca / dia de um suplemento à base de pó de feno-grego de semente inteira (variedade Fenucold) padronizado para diosgenina, uma das principais saponinas esteroidais de feno-grego (2000 mg / kg); (3) SAPEO - suplemento de SAP combinado com uma mistura de OEs naturais com componentes principais de carvacrol (2500 mg / kg), cinamaldeído (5600 mg / kg) e limoneno (3000 mg / kg); e (4) MON - Monensina, inclusão de monensina sódica na dieta a 24 mg / kg de MS. As vacas alimentadas com CON apresentaram maior consumo de matéria seca ( $P = 0,03$ ), matéria orgânica ( $P = 0,03$ ), proteína bruta ( $P = 0,04$ ) e extrato etéreo ( $P = 0,04$ ) do que os animais alimentados com MON, enquanto que a maior ingestão de fibra em detergente neutro ( $P = 0,04$ ) foi observada nos animais alimentados com SAPEO em comparação com aqueles alimentados com MON. Efeitos da dieta e do tempo foram observados para os valores de pH ruminal ( $P = 0,01$ ;  $P < 0,01$ ) e a concentração de nitrogênio amoniacal ruminal ( $P = 0,01$ ;  $P < 0,01$ ). As vacas alimentadas com SAP apresentaram maior proporção relativa de *Fibrobacter succinogenes* ( $P = 0,04$ ) quando comparado aos animais alimentados com MON. As vacas alimentadas com o tratamento CON obtiveram maior consumo de energia líquida ( $P = 0,01$ ) e consumo de energia digestível ( $P < 0,01$ ) do que animais alimentados com o tratamento MON. As dietas SAPEO e CON proporcionaram maiores concentrações séricas de albumina e ureia no sangue, respectivamente ( $P < 0,05$ ). Níveis mais elevados de proteína ( $P = 0,01$ ) e gordura ( $P = 0,01$ ) no leite foram observados nas vacas alimentadas com SAPEO em relação aos animais alimentados com a dieta MON. A monensina diminuiu as concentrações de ácidos graxos do leite C4:0, C6:0, C8:0 e C18:1 cis-11 ( $P < 0,05$ ). A monensina diminuiu a ingestão de nutrientes para uma via energeticamente mais eficiente, mas não alterou a produção de leite, digestibilidade ou fermentação ruminal. A suplementação de saponina associada a óleos essenciais aumentou o teor de gordura e proteína do leite em vacas Jersey em lactação, em comparação com animais alimentados com dieta suplementada com monensina.

**Palavras-chave:** Digestibilidade aparente, Óleo essencial, Perfil de ácidos graxos Leite, Saponinas

## Effects of plant extract supplementations or monensin on nutrient intake, digestibility, ruminal fermentation and metabolism in dairy cows

### ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of diet supplementation with monensin and saponins alone or combined with essential oils (EOs) on the nutrient intake and apparent digestibility, rumen fermentation parameters, microbial population, nitrogen balance, ruminal microbial protein synthesis, blood metabolites, and milk composition, yield and fatty acid (FA) profile of mid- to late-lactating Jersey cows. Eight ruminally cannulated lactating Jersey cows (average  $17.6 \pm 5.5$  kg/day of milk yield and  $100.5 \pm 26.6$  days of milk (mean  $\pm$  SD)) were used. The experiment consisted of a replicated  $4 \times 4$  Latin square design with 21-day periods (last seven days for sampling). Treatment sequences were randomly designated to cows and consisted of: (1) CON - Control, no feed additive; (2) SAP - 16 g/cow/day of a supplement based on whole-seed fenugreek powder (variety Fenucold) standardized to diosgenin, one of the major steroidal saponins of fenugreek (2000 mg/kg); (3) SAPEO - SAP supplement combined with a blend of natural EOs with major components of carvacrol (2500 mg/kg), cinnamaldehyde (5600 mg/kg) and limonene (3000 mg/kg); and (4) MON - Monensin, inclusion of monensin sodium in the diet at 24 mg/kg DM. Cows fed CON showed higher dry matter ( $P = 0.03$ ), organic matter ( $P = 0.03$ ), crude protein ( $P = 0.04$ ) and ether extract ( $P = 0.04$ ) intakes than animals fed MON, whereas higher neutral detergent fibre intake ( $P = 0.04$ ) was observed in animals fed SAPEO than those fed MON. Diet and time effects were observed for ruminal pH ( $P = 0.01$ ;  $P < 0.01$ ) and concentration of ruminal ammonia nitrogen ( $P = 0.01$ ;  $P < 0.01$ ), respectively. Cows fed SAP showed a higher relative proportion of *Fibrobacter succinogenes* ( $P = 0.04$ ) than animals fed MON. Cows fed CON had higher net ( $P = 0.01$ ) and digestible ( $P < 0.01$ ) energy intakes than animals fed MON. SAPEO and CON increased serum concentrations of albumin and urea, respectively ( $P < 0.05$ ). Higher protein ( $P = 0.01$ ) and fat ( $P = 0.01$ ) levels in the milk were observed in cows fed SAPEO than animals fed MON. Monensin decreased the concentrations of C4:0, C6:0, C8:0, and C18:1 cis-11 milk fatty acids ( $P < 0.05$ ). Monensin decreased nutrient intake to a more energetically efficient pathway but did not alter milk production, digestibility, or rumen fermentation. Saponin supplementation associated with essential oils increases milk fat and protein contents in lactating Jersey cows compared to animals fed a monensin-supplemented diet.

**Keywords:** Apparent digestibility, Essential oil, Fatty acid profile Milk, Saponins

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de aditivos alimentares com intuito de melhorar o desempenho animal e a eficiência alimentar é uma prática comum na nutrição de ruminantes. Substâncias antimicrobianas são adicionadas à ração e, após ingeridas, atuam diretamente sobre a população de microrganismos no rúmen, alterando os padrões de fermentação ruminal. Essas substâncias são classificadas em ionóforos e não ionóforos, de acordo com seu mecanismo de ação. O uso de ionóforos como moduladores de fermentação ruminal é uma estratégia interessante para melhorar a eficiência de produção de vacas em lactação (DUFFIELD et al., 2008a)

A monensina sódica é o ionóforo mais utilizado na produção de ruminantes e seu uso para vacas leiteiras em lactação é aprovado em vários países, incluindo o Brasil. Estudos mostram que a inclusão de monensina na alimentação de vacas em lactação promove melhoria no metabolismo energético, aumento na produção de leite e redução da ocorrência de distúrbios metabólicos (MCGUFFEY et al., 2001). Entretanto, a biossegurança dos ionóforos foi questionada, devido a possibilidade de efeito residual em produtos de origem animal e cepas bacterianas resistentes, dessa forma, a União Europeia, sob o princípio de precaução, proibiu a sua utilização como promotores de crescimento animal (Regulamento 1831/2003 / CE). Desde então, há um crescente interesse em avaliar a utilização de compostos secundários de plantas, como saponinas e óleos essenciais (OE), como alternativa natural aos ionóforos.

Os extratos vegetais são compostos por metabólitos secundários que apresentam atividade antimicrobiana contra uma variedade de microrganismos, como bactérias, fungos e vírus (CHAO et al., 2000). Fatores intrínsecos e extrínsecos à planta podem influenciar a atividade e concentração dos fitoquímicos bioativos (BODAS et al., 2008). O mecanismo de ação desses compostos se assemelha aos dos ionóforos (BODAS et al., 2012) e, quando extraídos e concentrados, podem ser uma alternativa aos antibióticos, atuando na modulação favorável da fermentação ruminal e desempenho animal (PATRA e SAXENA, 2009). Nas duas últimas décadas, a atividade antimicrobiana dos OE e saponinas e sua atividade como modificadores de fermentação ruminal foram revisadas e avaliadas em estudos *in vitro* (BENCHAAAR et al., 2008; CALSAMIGLIA et al., 2007; DORMAN e DEANS, 2000; WINA et al., 2005).

As saponinas apresentam atividade específica contra protozoários e, no estudo de Wang et al. (2019) esses compostos melhoraram o desempenho animal através da

modificação da fermentação ruminal. Os OEs podem modificar os parâmetros de fermentação ruminal e diminuir a excreção de nitrogênio (N) através da redução da produção de amônia (CALSAMIGLIA et al., 2007). Devido a ocorrência de efeitos aditivos e sinérgicos, comumente, os compostos presentes nos OEs são avaliados em combinação, para potencializar seu efeito antimicrobiano (GARCÍA-GARCÍA et al., 2011)

Até o momento, nenhum estudo avaliou os efeitos da combinação entre saponinas e óleos essenciais na alimentação de vacas leiteiras em lactação. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação com monensina e saponinas isoladas ou combinadas com óleos essenciais, sobre a ingestão e digestibilidade aparente dos nutrientes, parâmetros de fermentação ruminal, população microbiana, metabólitos sanguíneos e, produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite de vacas da raça Jersey em lactação intermediária à tardia. A hipótese avaliada é que as saponinas quando combinadas com OEs melhoram a digestibilidade dos nutrientes e a fermentação ruminal em comparação à monensina.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Monensina

A monensina sódica é um ionóforo carboxílico, obtido a partir da cepa de *Streptomyces cinnamonensis* (HANEY e HOEHN 1967) e desenvolvida originalmente para uso como coccidiostático em aves (RICHARDSON et al., 1976). Seus efeitos sobre a fermentação ruminal foram investigados e, na década de 70 seu uso foi liberado como aditivo na alimentação de ruminantes. Os ionóforos são classificados como antibióticos devido a sua toxicidade a diversos grupos de bactérias, protozoários e fungos (RUSSEL e STROBEL, 1989).

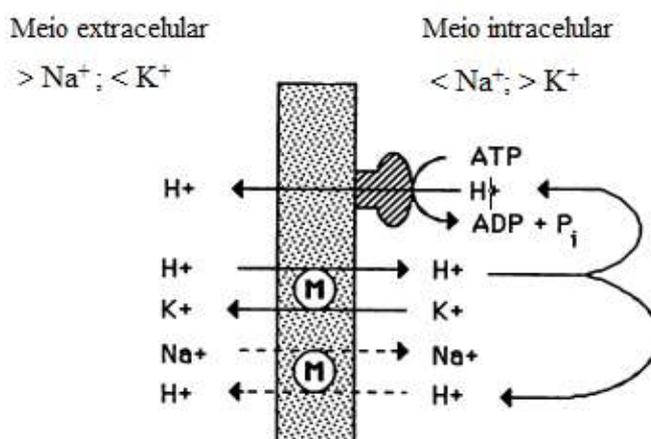
A ação dos ionóforos ocorre devido a sensibilidade dos microrganismos à translocação do gradiente de concentração de íons através da membrana celular. No ambiente ruminal,  $\text{Na}^+$  é o cátion extracelular predominante, enquanto o cátion K é predominante no meio intracelular dos microrganismos (RUSSEL e STROBEL, 1989) e a concentração tende a ser alterada na presença da monensina. Ao avaliar a ação da monensina no ambiente ruminal, Russel (1987) relatou que o meio intracelular de bactérias *Streptococcus bovis* foi alterado, com redução do pH e da concentração de  $\text{K}^+$

e, aumento da concentração de  $\text{Na}^+$ . O autor também relatou que a monensina promoveu a inibição do crescimento da população de bactérias dessa espécie.

O crescimento e a reprodução das bactérias são inibidos na presença da monensina porque grande parte da energia produzida pela célula bacteriana é utilizada para tentar manter o pH intracelular e reestabelecer o balanço iônico através das bombas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e de próton ATPase. O mecanismo de ação da monensina foi descrito por Russell e Strobel (1989) e de acordo com os autores, ao ligar-se à membrana celular, a monensina conduz um influxo de  $\text{H}^+$ , diminuindo o pH intracelular. Em seguida, com a redução do pH, a alta seletividade da monensina para  $\text{Na}^+$  provoca efluxo de  $\text{H}^+$  e influxo de cátions de Na. O efluxo de  $\text{H}^+$  também pode ser ocorrer pela ação de ATPases (Figura 1).

A membrana externa presente nas bactérias gram-negativas e o alto peso molecular da monensina não permite que a molécula modifique o transporte de íons na membrana dessas bactérias (NAGARAJA et al., 1997) . Em contraste, a ausência da membrana externa nas bactérias gram-positivas e a solubilidade da monensina em lipídeos facilita o deslocamento de íons através das membranas celulares desse grupo de bactérias, tornando-o o principal alvo de ação da monensina. Em estudo recente, kim et al. (2014) sugeriram que a presença ou ausência de uma membrana externa não deve ser o único fator que determina a susceptibilidade de bactérias à monensina. De acordo com os autores, características físico-químicas da dieta e a capacidade de adaptação dos microrganismos aos ionóforos podem afetar o efeito da monensina no ambiente ruminal.

**Figura 1.** Mecanismos de ação da monensina sódica sobre o fluxo de íons em *S. bovis*



Fonte: (Adaptado, Russel e Strobell, 1989).

De modo geral, a ação dos ionóforos inibe as bactérias produtoras de acetato, butirato e formato, e favorece as espécies que reduzem succinato à propionato (MCGUFFEY et al., 2001). A inibição desse grupo de bactérias provoca mudança na proporção molar de acetato por propionato e, conseqüentemente, redução na relação acetato:propionato e produção de metano por unidade de energia digerida. Dessa forma, a eficiência de utilização de energia em ruminantes pode ser melhorada com a suplementação com monensina, uma vez que a menor produção de acetato associada a maior produção de propionato no ambiente ruminal, reduz a disponibilidade de  $H^+$ , substrato primário para a metanogênese. A maior produção de propionato também está associada a um aumento da gliconeogênese hepática, que pode melhorar o balanço energético de vacas lactantes.

Em decorrência das mudanças na produção de AGV no rúmen, o desempenho produtivo dos ruminantes também é melhorado em resposta a mudanças na produção de gases, taxa de passagem e enchimento ruminal, além de alterações na ingestão e digestibilidade dos alimentos e no mecanismo de utilização da proteína (SCHELLING, 1984). Em vacas com maior balanço energético negativo ou maior risco de distúrbios metabólicos, a monensina pode apresentar benefícios mais evidentes (IPHARRAGUERRE e CLARK, 2003). De acordo com estudo metanalítico realizado por Duffield et al. (2008a), a inclusão de monensina na dieta de vacas lactantes proporcionou aumento de 2% na produção de leite, redução de 2% do CMS e melhora na eficiência da produção de leite. Aumentos no ECC e peso corporal foram observados com efeitos dependentes da dose fornecida e do estágio de lactação.

A dose de 24 mg/kg de MS parece ser a ideal para melhoria do desempenho de vacas em terço médio de lactação e alimentadas com dieta à base de silagem de milho (GANDRA et al., 2010, 2012; SANTOS et al., 2019). A utilização de doses de 48 mg/kg MS melhorou a fermentação e a digestibilidade da proteína bruta no estudo de Santos et al. (2019), entretanto, o consumo de matéria seca e o desempenho dos animais foram prejudicados pela dose. Resultado semelhante foi observado por Gandra et al. (2012) ao utilizar a mesma dose em vacas de mesmo estágio de lactação.

A suplementação com monensina promoveu o aumento de 0.7 litros por dia na produção de leite e reduziu a porcentagem de gordura e proteína em 3 e 1%, respectivamente (DUFFIELD et al., 2008a). Ainda de acordo com esses autores, os efeitos da monensina sobre a produção de gordura e proteína do leite foram heterogêneos e dependentes de fatores como estágio de lactação, método de administração do

suplemento e dieta fornecida. A depressão da gordura no leite de vacas suplementadas com monensina foi atribuída à redução da produção de acetato e butirato no rúmen (VAN DER WERF et al., 1998).

Ao examinar os efeitos da monensina na ingestão de alimentos e produção de leite de vacas holandesas, Phipps et al., (2000) utilizaram doses de 150, 300 e 450 mg de monensina por dia (equivalente aproximadamente 8, 16 e 24 mg/kg de MS, respectivamente). Os autores relataram pequena redução no CMS, aumento de 0.8 a 2.8 kg/d na produção de leite e queda significativa no teor de gordura e proteína, entretanto, pouca mudança na produção dos constituintes do leite.

A porcentagem de PUFA, MUFA e CLA foi alterada positivamente no leite de vacas suplementadas com monensina (24mg/kg MS), aumentando as propriedades nutricionais de interesse para a saúde humana (ODONGO et al., 2007a). Os resultados encontrados por esses autores sugerem que a monensina foi parcialmente eficaz em inibir a biohidrogenação de ácidos graxos insaturados no rúmen. O potencial da monensina em inibir a biohidrogenação ruminal de ácidos graxos de cadeia longa foi relatada anteriormente em estudo in vitro por Fellner et al., (1997), que observaram aumento dos ácidos conjugados C18:2 totais devido ao aumento do isômero cis-9, trans 11 C18:2.

A utilização da monensina promoveu efeitos benéficos na fermentação ruminal em diversos estudos com vacas em lactação. De acordo com estudo realizado por Broderick (2004), a relação acetato/propionato foi reduzida em 15%, com aumento da concentração molar de propionato em 10% e redução de 3% da concentração molar de acetato em vacas no início da lactação, alimentadas com silagem de alfafa, ao receberem dose 10 mg/kg MS de monensina em comparação a dieta controle. Resultado semelhante foi relatado por Eifert et al. (2005) ao suplementar vacas no mesmo estágio de lactação e dose de 16 mg/kg MS de monensina, em dieta a base de silagem de milho. Em doses de 20 e 24 mg/kg MS, Grazin et al. (2005) e Martineau et al. (2007), respectivamente, não relataram efeitos da monensina sobre a concentração molar de acetato, apesar da ocorrência de redução da relação acetato/propionato em ambos os estudos e aumento de 9% na porcentagem de propionato no estudo de Grazin et al. (2005).

De acordo com Odongo et al. (2007b), o uso monensina em dietas com 60% de volumoso corresponde a uma estratégia viável para reduzir a produção de metano por vacas leiteiras. Em um estudo comparativo do efeito antimetanogênico entre vacas de leite e bovinos de corte, Appuhamy et al. (2013) relataram que a redução na emissão de metano foi mais significativa em novilhos de corte em comparação a vacas leiteiras (19

g/d vs 6 g/d). A redução na produção de metano ocorre devido a menor disponibilidade de íons  $H^+$  no meio ruminal, melhorando a eficiência de utilização de energia alimentar.

A suplementação com monensina pode reduzir a produção de  $N-NH_3$ , aumentar a digestibilidade da proteína bruta e melhorar a eficiência de utilização de nitrogênio de vacas de leite. A redução de amônia no rúmen está associada a menor população de bactérias proteolíticas e fermentadoras de aminoácidos (YANG e RUSSELL, 1993), em consequência, menores quantidades de proteína dietética serão degradadas no rúmen e maiores quantidades de proteína e aminoácidos chegarão ao intestino delgado, melhorando a digestibilidade da proteína bruta. Os achados de Ruiz et al. (2001), Martineau et al. (2007) e Gandra et al. (2012) corroboram com os efeitos esperados da monensina sobre o metabolismo de nitrogênio. Entretanto, diferentes respostas podem ser observadas devido à composição da dieta basal. De acordo com Plaizier et al. (2000), o aumento da digestibilidade aparente total da PB ocorrerá em rações com altas proporções de volumoso.

Os efeitos da utilização da monensina no metabolismo de vacas leiteiras foram investigados por Duffield et al. (2008b) por meio de uma metanálise reunindo 59 estudos com monensina na alimentação de vacas de leite. De acordo com os autores, a monensina reduziu as concentrações sanguíneas de BHBA, acetoacetato e NEFA em 13, 14 e 7%, respectivamente. A utilização de monensina aumentou em 3 e 6% as concentrações de glicose e ureia. Contudo, fatores como método de fornecimento, tempo de administração, estágio lactacional e dieta influenciam a magnitude dos efeitos do tratamento com monensina.

A ocorrência de resíduos no leite de vacas suplementadas com monensina foi investigada. Mesmo em doses dez vezes acima do recomendado, não foi detectado resíduos de monensina nas amostras de leite coletadas por Bagg et al. (2005). O limite máximo para detecção de monensina no leite é de 2  $\mu g/l$ , de acordo com a Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO). Em estudo com diferentes doses de monensina (24 e 48 mg/kg MS), Gandra (2009) relataram que as concentrações residuais de monensina no leite das doses utilizadas estavam dentro do limite máximo estabelecido pela FAO/WHO. Esses resultados indicam que o leite de vacas recebendo monensina são seguros para o consumo humano.

## 2.2. Extratos vegetais

Os vegetais produzem uma diversidade de compostos orgânicos classificados como metabolitos primários e secundários. Os metabolitos primários são necessários para o desenvolvimento das plantas, enquanto os metabolitos secundários correspondem a compostos derivados e não possuem função direta no crescimento e desenvolvimento da planta, mas atuam como atrativos para polinizadores e como agentes defensivos contra microrganismos, insetos e predadores (BALANDRIN et al., 1985; TAIZ e ZIEGER, 2004). A maioria dos metabolitos secundários apresenta atividade antimicrobiana, afetando a taxa de crescimento de alguns microrganismos (BLUMENTHAL, 2003). Os metabolitos secundários são classificados em três grupos que diferem quimicamente: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (TAIZ e ZIEGER, 2004).

Fatores como parte da planta, localização geográfica, condições climáticas, época de coleta, assim como o processamento e armazenamento das plantas podem influenciar a atividade e concentração dos fitoquímicos nos vegetais (BODAS et al., 2008). O mecanismo de ação desses compostos se assemelha aos dos ionóforos, causando o extravasamento de íons devido a desestruturação da membrana celular da bactéria (BODAS et al., 2012). Em decorrência da sua atividade antimicrobiana e do seu mecanismo de ação, a atividade de alguns extratos vegetais, a exemplo das saponinas e dos óleos essenciais, como modificadores de fermentação ruminal foram revisadas em diferentes estudos (BENCHAAAR et al., 2008; CALSAMIGLIA et al., 2007; PATRA e SAXENA, 2009; WALLACE, 2004; WINA et al., 2005).

## 2.3. Saponinas

As saponinas são moléculas de caráter anfifílico e de alto peso molecular (WALLACE, 2004), normalmente encontradas em tecidos mais vulneráveis a ataques de fungos e bactérias ou à predação de insetos (WINA et al., 2005). Recebem essa denominação devido a sua capacidade de, em solução aquosa, formar espumas como as de sabão (FRANCIS et al., 2002). Para serem usadas como aditivos alimentares, as saponinas podem ser extraídas de diversas partes da planta.

Quimicamente, as saponinas são formadas por uma fração de açúcar ligada a uma aglicona hidrofóbica. Classificam-se de acordo com o número fundamental da aglicona e

pelo seu caráter ácido, básico ou neutro (Schenkel et al., 2001). As agliconas podem ser triterpenóide ou esteroides. As saponinas triterpenóides são encontradas, principalmente, em leguminosas e, as saponinas do tipo esteroides estão presentes em plantas usadas como ervas, a exemplo o feno-grego e giseng (FRANCIS et al., 2002). O extrato de *Yucca schidigera* possui 4,4% de saponinas esteroides, enquanto o extrato de *Q. saponária Molina* possui 10% de saponinas totais (WINA et al., 2005). As saponinas *Yucca* e *Quillaja* são as mais utilizadas comercialmente e correspondem às maiores fontes de saponinas usadas como aditivos alimentares (DEMATTE FILHO, 2004).

Devido a sua capacidade de ligar-se aos esteróis presentes na superfície de protozoários, as saponinas têm ação deletéria sobre esses microrganismos (FRANCIS et al., 2002). Estudos *in vitro* demonstraram os efeitos negativos de saponinas de diferentes fontes sobre essa população de microrganismos ruminais (GUO et al., 2008; HU et al., 2005). Entretanto, a atividade antiprotozoária das saponinas parece ser transitória. Newbold et al. (1997) observaram redução de 60% da população de protozoários 4 dias após início da alimentação com *S. sesban*, mas após 10 dias, a população se recuperou.

Os protozoários são responsáveis por cerca de 10-14% do nitrogênio ruminal (VAN SOEST, 1994) e são predadores de bactérias. A redução da sua população diminui a predação e lise bacteriana, assim como a liberação de produtos gerados pela degradação das proteínas. Dessa forma, as saponinas podem contribuir, indiretamente, para diminuição da concentração de amônia ruminal. A redução da população de protozoários pode melhorar a utilização do nitrogênio proveniente da dieta e aumentar o fluxo de proteína microbiana (JOUANY, 1996).

A utilização de saponinas na alimentação animal pode contribuir com a redução da produção ruminal de metano. Os protozoários são grandes produtores de  $H_2$  e a redução dessa população de microrganismos diminui o fornecimento desse substrato no rúmen. Dessa forma, a atividade antimetanogênica ocorre devido a ação sobre os microrganismos envolvidos na formação do metano. Hess et al. (2003) observaram redução de 54% na contagem de protozoários e redução de 20% na produção de metano, sugerindo que a defaunação reduz a produção de metano.

A inclusão de saponinas na alimentação de ruminantes pode aumentar a produção de propionato, resultado do redirecionamento de  $H_2$  do metano para a via do propionato e, diminuir a relação acetato:propionato (PATRA e SAXENA, 2009). Wina et al., (2005) sumarizaram 51 estudos, *in vitro* e *in vivo*, sobre os efeitos das saponinas no ambiente ruminal e, em 10 de 12 resultados, o aumento de propionato estava relacionado com a

redução de protozoários. Entretanto, havia 12 resultados que não mostraram efeitos na produção de propionato, sugerindo que os efeitos das saponinas sobre o perfil de AGV pode variar com a dieta e nível de suplementação.

Não houve efeito da suplementação de saponina na produção e composição de leite de vacas em terço médio de lactação (HOLTSHAUSEN et al., 2009). Os autores relataram aumento do CMS de vacas alimentadas com saponinas, reduzindo a eficiência de produção de leite por unidade de CMS dos animais alimentados com extrato de *Yucca* ou *Quillaja* (1,41 vs.  $1,37 \pm 0,04$  kg, controle vs. saponinas, respectivamente). A suplementação com esses aditivos não teve efeito sobre digestão dos nutrientes, entretanto, é possível que as saponinas reduzam a absorção intestinal de nutrientes. Em estudo conduzido por Benchaar et al., (2008a), a suplementação de 60 g/d de extrato de saponinas de *Yucca schidigera* também não teve efeitos significativos sobre a produção e composição de leite de vacas em lactação.

Estudo conduzido por Anantasook et al. (2015) com vacas em início de lactação ( $36 \pm 8$  DEL), suplementadas com farinha de vagem de *S. saman* (60 g/kg de MS) não foi observado efeitos sobre o CMS, entretanto, a produção de leite aumentou significativamente (14.1 vs 12.8 kg/d, saponinas vs controle, respectivamente). A inclusão de saponinas na alimentação de vacas leiteiras também aumentou o teor de gordura, proteína, e gordura não sólida. A farinha de vagem de *S. saman* é rica em saponinas e taninos condensados. Em outro estudo utilizando extrato rico em saponinas e taninos (*Antidesma thwaitesianum* Muell. Arg.) em vacas lactantes, Gunun et al. (2019) não observaram alteração no CMS, digestibilidade dos nutrientes e produção de leite ao suplementar doses de 100, 200 ou 300 g/d.

Em estudo para investigar os efeitos da saponina do chá no desempenho, composição de ácidos graxos do leite e função imunológica de vacas em lactação, Wang et al. (2017) forneceram suplementação de 0, 20, 30 ou 40 g/d de extratos de saponinas do chá para vacas primíparas e multíparas. Os autores relataram que o CMS, a produção de leite, gordura do leite, lactose e ECM apresentaram efeito quadrático com o aumento das doses, sendo menor para as vacas alimentadas com 40 g/d. Foi observado interação entre a adição de saponinas e semana de lactação no perfil de ácidos graxos do leite, com maiores concentrações de C16:1 cis-9 e C18:1 cis-9 no leite de vacas suplementadas com 40 g/d de saponinas nas semanas 2, 3 e 4. No entanto, após a 4ª semana, os valores foram semelhantes aos dos demais tratamentos. De acordo com os autores, a suplementação com

saponinas do chá ( $\geq 56\%$  de pureza das saponinas triterpenóides) pode reduzir o estresse oxidativo e melhorar a imunidade de vacas leiteiras.

A adição de saponinas do chá na alimentação de cordeiros em crescimento (MAO et al., 2010) e ovelhas (ZHOU et al., 2011) promoveu diminuição da liberação de metano por ação direta sobre os microrganismos ruminais. Os autores observaram que a redução de  $\text{CH}_4$  se deu, principalmente, devido à redução da contagem de protozoários. Utilizando saponinas do chá, Guyader et al. (2017) observaram redução na produção de  $\text{CH}_4$  em avaliação *in vitro*, entretanto, em avaliação *in vivo* o mesmo extrato vegetal aumentou em 14% as emissões de metano expressas em gramas por quilograma de CMS.

Menor digestibilidade da proteína bruta, concentração de  $\text{N-NH}_3$  e número de bactérias proteolíticas e protozoários foi observada por Anantasook et al. (2013) ao alimentar vacas lactantes com extrato rico em saponinas (60 g/kg de MS). Esses resultados contribuíram para um maior aporte de proteína microbiana e eficiência do fornecimento de N microbiano. Em estudo *in vitro*, Patra e Yu (2015) relataram que as saponinas *Quillaja* reduziram a produção de amônia ruminal e contagem de protozoários, mas a população de bactérias proteolíticas não foi alterada.

Em geral, a adição de saponinas não afetou o pH ruminal e a produção total de AGV, entretanto, foi observado mudança nas concentrações individuais dos AGV. No estudo de Anantasook et al. (2015), os autores relataram aumento da produção de propionato e redução na relação acetato:propionato. Resultados semelhantes foram observados por Holtshausen et al. (2009) em avaliação *in vitro*, entretanto, os mesmos autores não observaram efeitos sobre as concentrações totais e individuais de AGV em avaliação *in vivo* utilizando extratos de *Yucca* ou *Quillaja*.

#### 2.4. Óleos essenciais

Óleos essenciais são compostos aromáticos voláteis, em sua maioria de caráter lipofílico, densidade menor que a da água e baixo peso molecular (BAKKALI et al., 2008). São denominados como óleos devido a característica lipofílica e, o termo essencial está associado à sua característica de fornecer sabores e odores às plantas (CALSAMIGLIA et al., 2007).

Em geral, os óleos essenciais são caracterizados pela presença de dois ou três compostos principais, que representam a maior parte da concentração total de componentes químicos. Esses componentes podem corresponder a cerca de 85% dos

óleos essenciais (BURT, 2004). Ao avaliar a composição dos óleos essenciais de *Thymus*, através de cromatografia gasosa e espectrometria de massa, Cosentino et al. (1999) identificaram 19 compostos em diferentes concentrações e concluíram que hidrocarbonetos monoterpênicos e monoterpênicos fenólicos correspondiam aos principais constituintes dos óleos analisados.

Diversos fatores podem provocar variação na composição dos óleos essenciais. Em uma revisão sobre óleos essenciais, Burt (2004) relatou que o método utilizado para extração pode modificar o perfil organoléptico dos óleos, alterando a concentração dos compostos ativos. Essa mudança na concentração de compostos foi observada por Jing et al. (2019) ao comparar a composição do óleo de *Flos Chrysanthemi indici*, obtidos a partir de diferentes métodos de extração. De acordo com os autores, a extração por hidrodestilação proporcionou maior concentração de terpenos em comparação a outros métodos.

As propriedades antimicrobianas dos OEs se dá, principalmente, devido a estrutura fenólica dos compostos (PECLZAR et al., 1998; COSENTINO et al., 1999). A atividade bactericida e bacteriostática de compostos fenólicos como o carvacrol, eugenol e timol foi relatada no estudo de Dorman e Deans (2000). Os mesmos autores relataram que os componentes químicos e grupos funcionais presentes nos OEs, as proporções e interações entre eles estão associados à atividade antimicrobiana dos óleos.

Existem muitas hipóteses para explicar os mecanismos de ação dos OEs contra as bactérias. A maioria envolve a interação dos compostos químicos com a membrana celular bacteriana. Entretanto, devido a sua complexa composição, Benchaar et al. (2008b) sugerem que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais esteja associada à sua capacidade de interação com um grande número de alvos celulares bacterianos. A natureza lipofílica dos OEs permite um aumento da permeabilidade celular bacteriana, o que pode interferir em algumas reações essenciais dependentes de proteínas ou enzimas (BURT, 2004). A interação entre compostos e membrana provoca o extravasamento de íons através da membrana celular, diminuindo o gradiente iônico transmembranar (CALSAMIGLIA et al., 2007), provocando inibição do crescimento e/ou reprodução dos microrganismos sensíveis.

Dentre os demais mecanismos de ação propostos, alguns autores (BENCHAAR e GREATHEAD, 2011; CALSAMIGLIA et al., 2007) citam a capacidade do eugenol, principal composto do óleo de cravo-da-índia (*S. aromaticum*), em se ligar às proteínas e assim causar morte celular através da inativação das atividades enzimáticas. Segundo

Benchaar e Greathead (2011), o eugenol também pode alterar a composição dos ácidos graxos da membrana celular bacteriana. Para Burt (2004), a presença do grupo carbonil na estrutura do cinamaldeído, permite a inativação de enzimas microbianas e esgotamento do ATP celular. Da mesma forma que acontece com os ionóforos, bactérias gram-positivas são mais sensíveis aos óleos essenciais. Entretanto, algumas moléculas de baixo peso molecular podem interagir com a água, através de pontes de hidrogênio, e atravessar a parede celular através de difusão, interagindo com a bicamada lipídica das células (DORMAN e DEANS, 2000). Dessa forma, o peso molecular dos compostos ativos pode permitir a ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Os óleos essenciais podem ser utilizados como moduladores de fermentação ruminal, promovendo melhoria no desempenho desses animais. Através da diminuição da população de protozoários, a produção de metano foi reduzida em 37% no estudo de Szumacher-Strabel e Cieślak (2010). No estudo de Soliva et al. (2011), o óleo de alho (*Allium sativum*) foi capaz de reduzir em 91% a formação diária absoluta de metano. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pode promover alterações no metabolismo de nitrogênio no rúmen. De acordo com Wallace (2004), bactérias hiper-produtoras de amônia (HAP) são sensíveis aos OEs e seus compostos ativos, promovendo diminuição na taxa de produção de NH<sub>3</sub>. Ainda de acordo com esse autor e outros (MCINTOSH et al., 2003; Newbold et al., 2004), os efeitos dos óleos essenciais sobre o metabolismo proteico está relacionado com a desaminação devido a inibição de bactérias HAP.

Os efeitos dos OEs podem depender do pH ruminal. Em estudos *in vitro*, Cardozo et al. (2005) relataram que, em pH mais baixo, o efeito dos OEs sobre o perfil de fermentação ruminal foi mais pronunciado, sugerindo que a atividade antimicrobiana dos OEs é mais ativa em estar dissociado, favorecido pelo pH reduzido. Os mesmos autores observaram que em pH 7,0, o óleo de canela (*Cinnamomum cassia*) e o cinamaldeído aumentaram a proporção de acetato:propionato, já em pH 5,0, a relação acetato:propionato foi reduzida. Os efeitos dos óleos essenciais sobre os AGV também podem ser dependentes da composição da dieta (BENCHAAR et al., 2007)

Em avaliação *in vitro*, Cardozo et al. (2005) observaram que os microrganismos ruminais podem se adaptar aos OEs após longos períodos de exposição. Em estudo com diferentes extratos vegetais, os autores relataram que os óleos de canela (*Cinnamomum cassia*), alho (*Allium sativum*), orégano (*Origanum spp.*) e anis (*Pimpinella anisum*) em dose de 7,5 mg/ de MS modificaram a proporção de acetato, propionato e butirato entre

o segundo e sexto dias de incubação, entretanto, após esse período, nenhum efeito foi observado.

Por meio de estudo metanalítico, Khiaosa-ard e Zebeli (2013), relataram ausência de efeitos dos OEs sobre o CMS e a produção de leite. Entre outros fatores, Benchaar et al. (2007) atribuíram a ausência de efeitos dos OEs sobre o desempenho de vacas em lactação à adaptação dos microrganismos ruminais aos compostos utilizados. Nenhum efeito sobre o CMS foi observado nos estudos conduzidos por Benchaar et al. (2007), Vendramini et al. (2016) e Santos et al. (2019) utilizando doses de 750 mg/d, 1g/d e 44 mg/MS da dieta, respectivamente. Em contraste, Tassoul e Shaver (2009) relataram redução no consumo de matéria seca de vacas em início de lactação, suplementadas com dose de 1.2 g/d da mistura, enquanto Kung et al. (2008), utilizando a mesma dose, observaram aumento no CMS de vacas em período médio de lactação. Os diferentes efeitos sobre o CMS observados nesses estudos, podem estar associados às doses utilizadas e/ou estágio de lactação dos animais.

Os efeitos dos OEs podem estar relacionados à interação entre os compostos presentes nos óleos. O CMS de vacas lactantes suplementadas com folhas de orégano (*Origanum vulgare L.*) teve comportamento diferentes nos estudos de Hristov et al., 2013 e Tekippe et al., 2011). No estudo de Tekippe et al. (2011) a suplementação de 500 g/d não teve efeito sobre o consumo de nutrientes, enquanto que Hristov et al. (2013) relataram tendência de redução de consumo com o aumento da dose. Ambos produtos utilizados possuíam o carvacrol como componente principal, entretanto, a presença de p-cimene e timol também como constituintes principais no OEs utilizado no segundo estudo podem ter interagido com os demais compostos.

A resposta ao aditivo também pode estar associada a fatores como dose e paridade. Em um estudo para determinar os efeitos de uma mistura encapsulada de cinamaldeído e eugenol na produção de vacas primíparas e múltíparas, Wall et al. (2014) relataram aumento na produção de leite de vacas múltíparas suplementadas com 350 mg/d da mistura. Contudo, em um segundo experimento com diferentes doses da mesma mistura (200, 400 e 600 mg/d), os autores observaram que a produção de leite das vacas múltíparas foi reduzida quando as doses mais altas foram fornecidas, enquanto houve aumento na produção de leite de vacas primíparas alimentadas com a dose mais baixa. No estudo de Blanch et al. (2016), os autores utilizaram doses de 300 mg de aditivo encapsulado a base de cinamaldeído (430 g/kg) e óleo de alho (*Allium sativum*) (70 g/kg) na dieta de vacas em lactação de diferentes paridades (primíparas vs múltíparas) e

relataram que, após um período de 15 dias, os aditivos promovem aumento da produção de leite de vacas multíparas, enquanto não houve diferença entre os tratamentos para vacas primíparas.

No estudo de Santos et al. (2010) os efeitos de uma mistura de OE, contendo eugenol, acetato de geranila e óleo de coentro (*Coriandrum sativum*) como componentes principais, não afetaram a produção de leite de vacas de alta produção, entretanto, foi observado aumento da produção e concentração de gordura no leite. O aumento da síntese de gordura foi associado à uma mudança energética do ganho de condição corporal, sugerindo aumento da produção de acetato e e/ou da relação acetato/propionato no rúmen.

Mudanças no perfil de ácidos graxos no leite de vacas suplementadas com óleo de alho (*Allium sativum*) (5 g/d) e óleo de zimbro (*Juniperus oxycedrus*) (2 g/d) foram relatadas por Yang e He (2016). De acordo com os autores, os compostos promoveram aumento na proporção do ácido linoleico conjugado trans 10, cis 12 na gordura do leite. A utilização de óleo de orégano (*Origanum vulgare L.*) e carvacrol não alteraram a produção de ácidos graxos do leite no estudo de Benchaar (2020). Da mesma forma, outros autores (HRISTOV et al., 2013; KOLLING et al., 2018) relataram nenhuma ou pouca mudança no perfil de ácidos graxos do leite de vacas alimentadas com folhas ou extratos de orégano.

Vacas suplementadas com folhas de orégano (*Origanum vulgare L.*) tiveram menor produção de metano 8 horas após a alimentação (TEKIPPE et al., 2011), entretanto, nesse estudo o efeito dos compostos ativos sobre a produção de metano pode ter sido mais acentuado pois o suplemento foi fornecido diretamente no rúmen. Segundo os autores, é improvável que, considerando todo o ciclo de alimentação, a produção de metano seja igualmente afetada. Um único OE fornecido em uma dose baixa pode não deprimir de forma significativa a produção de metano ruminal, entretanto, a combinação de vários OEs ou a combinação de OEs com outros agentes antimetanogênicos pode ser eficaz na redução da produção de metano por ruminantes (Patra et al., 2012).

Em estudos *in vivo*, os efeitos dos óleos essenciais sobre a fermentação ruminal foram inconsistentes. As doses utilizadas em estudo *in vitro* foram consideradas altas para avaliação *in vivo*, podendo apresentar efeitos negativos na fermentação ruminal. No estudo de Tager e Krause (2011) os autores relataram que uma dose de 0.5 g/d de uma mistura comercial composta por cinamaldeído e eugenol não teve efeito sobre a fermentação ruminal, entretanto, a dose de 10 g/dia da mesma mistura afetou negativamente a fermentação microbiana no rúmen.

#### 2.4. Estudos comparativos: Desempenho de vacas em lactação suplementadas com extratos vegetais ou monensina

Devido à semelhança do mecanismo de ação entre a monensina e os componentes bioativos presentes nos extratos vegetais, diversos estudos vêm sendo realizados afim de comparar os efeitos desses aditivos no desempenho e fermentação ruminal de vacas em lactação. Há um crescente interesse em consolidar a dose e composição ideal de fitonutrientes como aditivos alimentares para substituir os ionóforos na alimentação de ruminantes, atendendo as atuais diretrizes da utilização de aditivos alimentares na produção animal.

Os efeitos dos OEs no metabolismo ruminal observados em estudos *in vitro* não foram confirmados no estudo de Bechaar et al. (2006). Os autores analisaram os efeitos da adição de OEs e monensina na dieta de vacas em lactação. A monensina promoveu aumento da digestibilidade aparente total de PB em comparação às vacas que não receberam o aditivo. O pH ruminal aumentou quando OE foi adicionado à dieta. Nenhum dos aditivos alterou a produção de AGV total e proporções molares individuais dos AGV. Nesse estudo, a inclusão de OE não afetou a composição do leite das vacas, enquanto a monensina reduziu a concentração de gordura e N ureico no leite. De acordo com os autores, doses de 2 g/vaca de OEs e 350 mg/vaca de MON, promoveram efeitos limitados na digestão fermentação, produção e composição do leite de vacas em lactação média.

De acordo com Yang et al. (2007), alimentar vacas em terço médio de lactação com óleos essenciais de alho (*Allium sativum*) (5 g/d) e baga de zimbro (*Juniperus oxycedrus*) (2 g/d) melhorou a digestibilidade ruminal da dieta, entretanto, esse efeito pode ocorrer devido à um menor fluxo de proteína para o intestino delgado. Enquanto que a inclusão de monensina aumentou o fluxo da proteína by-pass do rúmen, mas não promoveu melhoras na digestão e produção de leite. Os OEs não afetaram o CMS, fermentação ruminal, digestibilidade no trato total e produção e composição do leite, apresentando efeitos benéficos mínimos em vacas leiteiras. A monensina reduziu a degradabilidade ruminal da proteína e o teor de gordura no leite, entretanto, não afetou o CMS, digestibilidade total, fermentação ruminal e produção de leite.

Nos estudos mais recentes de (BENCHAAR, 2015, 2020), o autor comparou os efeitos de OEs e seus principais compostos bioativos com a monensina. A adição de cinamaldeído, óleo de canela (*Cinnamomum cassia*) ou monensina não afetou o CMS, a

retenção de N, digestibilidade dos nutrientes da dieta, fermentação e população de protozoários ruminal e, emissão de metano. De acordo com o autor, esses aditivos alimentares não são estratégias viáveis para redução da produção de metano na pecuária leiteira (Benchaar, 2015).

A adição de óleo de orégano (*Origanum vulgare*) e seu principal composto, o carvacrol, não teve efeito sobre a digestibilidade dos nutrientes, utilização de N, fermentação ruminal, população de protozoários no rúmen e produção de leite em vacas (Benchaar, 2020). Nesse estudo, a monensina na dose de 24 mg/kgMS aumentou a proporção de propionato e tendeu a aumentar a digestibilidade do trato total da proteína bruta. Os aditivos não tiveram efeito sobre a produção de metano. A monensina promoveu aumento na proporção de do ácido graxo trans-10 18:1.

Uma mistura contendo cinamaldeído, eugenol e capsaicina (CEC) foi comparada com a monensina como controle positivo, no desempenho e composição do leite (Oh et al., 2018). Os autores avaliaram as doses de 450 mg/vaca/d de MON, 100 mg/vaca/d de CEC e uma mistura de capsaicina e MON (250 mg/vaca/d de capsicum + 450 mg/vaca/d de MON). A suplementação com CEC aumentou a eficiência alimentar em comparação ao tratamento com MON, mas não afetou a eficiência alimentar com base no leite corrigido para energia. Os aditivos não promoveram mudanças no perfil de ácidos graxos do leite.

A combinação de OEs e biotina parece ser uma alternativa viável para evitar a ocorrência de cetose em vacas de alta produção no período de transição. No estudo de Hausmann et. al., (2018) a combinação de OE e biotina evitou a perda de peso corporal em vacas no pós-parto em comparação a vacas alimentadas com monensina e foi associada a maiores rendimentos do leite corrigido por energia.

A inclusão de MON, OE e a combinação de OE e amilase promoveu a redução da concentração de N-NH<sub>3</sub> em vacas (SILVA et al., 2018 - Experimento 1). Em comparação à MON, os animais alimentados com OE e OE + amilase tiveram menor pH ruminal, maior concentração de N-NH<sub>3</sub> e tendência a maior concentração total de AGV. Os tratamentos não afetaram a produção e composição do leite. Em um segundo experimento, os autores relataram que a utilização de OE com ou sem amilase teve efeito semelhante ao da monensina sobre o CMS e produção de leite.

A Tabela 1 reúne os principais estudos realizados nos últimos 15 anos com o objetivo de comparar os efeitos da suplementação dos compostos bioativos e da monensina no desempenho de vacas lactantes. De modo geral, os aditivos alimentares

não afetaram o CMS e a digestibilidade aparente total dos nutrientes. A ausência de efeitos da MON e OE sobre a produção de leite são consistentes com a ausência de efeitos desses produtos sobre os parâmetros de ingestão de matéria seca, digestibilidade dos nutrientes e perfil de fermentação ruminal. As diferentes doses, compostos e dietas utilizados podem ter contribuído para as diferentes respostas observadas.

**Tabela 1.** Consumo de matéria seca (CMS) e produção de leite (PL) de vacas em lactação suplementadas com extratos vegetais (EV) e monensina (MON).

Estudo	Monensina (Dose)	Compostos e Dose	$\Delta$ CMS (kg/d)		$\Delta$ PL (kg/d)		Outros resultados
			EV	MON	EV	MON	
Benchaar et al. (2006)	350 mg/d	Timol, eugenol, vanilina e limonemo (2 g/d)	-0,4	-0,6	-2,3	-0,3	OE aumentou o pH ruminal. A concentração de N-NH <sub>3</sub> diminuiu com a suplementação com MON. MON e OE não alteraram a concentração total de AGV e as proporções molares de AGV individual. MON promoveu maior concentração de trans-10 18:1 (17%) e trans-11 18:1 (16%). MON e OE não afetaram a contagem de protozoários.
Yang et al. (2007)	330 mg/d	Óleo de alho (5 g/d)	-0,3	-0,8	0,9	-0,1	OE aumentou a digestibilidade ruminal da MS; Os aditivos alimentares não tiveram efeito sobre o pH e fermentação ruminal.
		Baga de Zimbro (2 g/d)	-0,2	-0,8	0,4	-0,1	
Benchaar (2015)	24 mg/KgMS	Óleo de canela (50 mg/kgMS)	0,5	-0,6	-0,6	0	OE e composto ativo não afetaram o pH e concentração total de AGV. MON aumentou a concentração de isobutirato e isovalerato Os aditivos alimentares não afetaram a produção de metano e o número de protozoários.
		Cinamaldeído (50 mg/kgMS)	-0,6	-0,6	-0,4	0	
Vendramini et al. (2016)	24 mg/KgMS	Timol, eugenol, vanilina, guaiacol e salicialdeído (1g/d)	0,7	0,2	0,2	0,4	EO aumentou nitrogênio nas fezes em comparação a MON; MON reduziu a produção de acetato e relação acetato:propionato e, aumentou a produção de propionato.
Ferreira de Jesus et al. (2016)	22 mg/KgMS	Blend de CNSL <sup>1</sup> (500 mg/kgMS)	0,5	0,1	1,2	1,3	Os aditivos aumentaram a PL e a concentração molar de propionato.
	13 mg/kgMS	Timol, Eugenol, vanilina e	-0.2	-1.1	0.4	1.3	Os aditivos alimentares diminuíram a concentração de N-NH <sub>3</sub> . OEs reduziram o pH ruminal e menor

Silva et al. (2018)		limoneno (44 mg/kgMS)					concentração de N-NH <sub>3</sub> em relação a MON. Os aditivos alimentares aumentaram a eficiência de produção de leite
Benchaar (2020)	24 mg/KgMS	Óleo de orégano (50 mg/KgMS)	0,4	-0,4	0,3	-0,1	MON aumentou a concentração molar de propionato e reduziu a relação acetato:propionato; MON promoveu maior concentração de trans-10 18-1;
		Carvacrol (50 mg/KgMS)	-0,1	-0,5	-0,7	-0,1	

---

Δ Variação de resposta em comparação aos valores do grupo controle: +, aumento; -, redução. <sup>1</sup>Líquido de casca de castanha de caju;

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Considerações éticas e de localização

Todos os procedimentos realizados no presente experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brasil, com número de protocolo (47/2018).

O experimento foi conduzido entre janeiro e abril de 2019, no SETOR DE PESQUISA EM NUTRIÇÃO DE GRANDES RUMINANTES localizado na Fazenda Experimental da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (UFBA) localizada no município de Entre Rios, região nordeste da Bahia, Brasil (11° 56'31" S, 38° 05'04" W e 162 m de altitude). A região possui uma temperatura média mínima de 22 °C, temperatura média máxima de 29 °C, precipitação média anual de 1.000–1.251 mm e clima quente e semi-úmido.

#### 3.2. Animais, projeto experimental e tratamentos

Foram utilizadas oito vacas da raça Jersey em lactação, portadora de cânulas ruminais (média de produção de leite de  $17,6 \pm 5,5$  kg / dia e  $100,5 \pm 26,6$  dias em lactação, média de  $\pm$  DP). O experimento consistiu em um delineamento em quadrado latino  $4 \times 4$  replicado, contemporâneos e balanceados, com períodos de 21 dias, em que os últimos sete dias foram utilizados para a coleta de dados.

As vacas foram alojadas em baias individuais (25 m<sup>2</sup>) com ventiladores, cochos para alimentação e livre acesso a ração e água. Para proporcionar maior conforto e bem-estar, os animais foram soltos em curral coberto com leitos de areia, 1 hora antes da alimentação matinal durante o período experimental. Os animais foram pesados no início do estudo e no último dia de cada período experimental, antes da alimentação da manhã e após a ordenha, em balança eletrônica para animais de grande porte. Os escores de condição corporal foram determinados nos mesmos períodos que o peso corporal, usando um sistema de 5 pontos (1 = muito magra; 5 = obeso) de acordo com Wildman et al. (1982).

As vacas foram alimentadas com a mesma dieta basal de controle (Tabela 2), formulada para atender as exigências nutricionais de vacas da raça Jersey no terço médio

de lactação e produção média de leite de 20 kg/dia, de acordo com as recomendações do National Research Council (NRC, 2001). As vacas foram distribuídas aleatoriamente para receber um dos quatro tratamentos dietéticos: (1) CON - Controle, sem aditivo alimentar; (2) SAP - 16 g/vaca/ dia de suplemento à base de pó de semente de feno-grego (variedade Fenucold) padronizado em diosgenina, uma das principais sapogeninas esteroidais do feno-grego (2000 mg/kg), (Boostar Tonic® - Phytosynthese Group Lehning, França); (3) SAPEO - suplemento SAP combinado com uma mistura de EOs naturais, tendo como componentes principais carvacrol (2500 mg/kg), cinamaldeído (5600 mg/kg) e limoneno (3000 mg/kg) (Ruminolac® - Phytosynthese Group Lehning, França); e (4) MON - Monensina, inclusão de monensina sódica (Poulcox 40®, Huvepharma, Bulgária) na dieta a 24 mg/kg de MS. Todos os aditivos foram pesados diariamente e misturados à mão no concentrado antes da alimentação matinal.

**Tabela 2.** Ingredientes e composição química da dieta basal

Item	Dieta
Ingrediente (g/kg MS)	
Silagem de milho	500
Milho moído	200
Farelo de soja	173
Farelo de trigo	90
Ureia	5.0
Sulfato de amônia	2.4
Calcário	6.0
Bicarbonato de sódio	7.0
Mistura mineral e vitamínica <sup>a</sup>	14.9
Sal	1.2
Química (g/kg MS)	
Proteína bruta	1.64
Extrato etéreo	32
Fibra em detergente neutro	316
Carboidratos não fibrosos <sup>b</sup>	442
Nutrientes digestíveis totais <sup>c</sup>	720
Energia líquida de lactação (Mcal/kg de MS) <sup>d</sup>	1.55

<sup>a</sup>Composição/kg: 160g Ca, 16g P, 16g S, 93.60g Na, 38g Mg, 380mg Cu, 2160mg Zn, 1070mg Mn, 11mg Co, 44mg I, 14mg Se, 750mg Fe, 15mg Cr, 300.000 IU vitamina A, 30.000 IU vitamina D, e 925 IU vitamina E;

<sup>b</sup>De acordo com a equação de Hall (2000);

<sup>c</sup>De acordo com o modelo proposto pelo NRC (2001);

<sup>d</sup>De acordo com equação de Weiss et al. (1992)

### 3.3. Consumo de nutrientes e digestibilidade aparente do trato total

As vacas foram alimentadas duas vezes ao dia, às 8h00 e 14h00, em quantidades iguais, visando sobras entre 5 e 10% com base na alimentação. As quantidades de forragem e concentrado fornecidas e as sobras de cada vaca foram pesadas diariamente para calcular o consumo de ração. Amostras de forragem e ingredientes foram coletadas semanalmente e congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As amostras de sobras de cada vaca foram coletadas diariamente durante o período de coleta para gerar uma amostra composta e armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para análise posterior.

Nos dias 16, 17 e 18 de cada período experimental, amostras fecais foram coletadas duas vezes ao dia (06:00 e 16:00h), diretamente do reto e congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ao final de cada período experimental, amostras de cada vaca/período foram homogeneizadas para gerar uma amostra composta por período por vaca. As amostras de fezes foram secas em estufa de ventilação forçada ( $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 72h), moídas em moinho Wiley para passar por uma peneira de 1 mm e analisadas quanto à matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), e teores de fibra em detergente neutro (FDN) de acordo com os métodos da AOAC (2000), descritos posteriormente. Os coeficientes de digestibilidade foram calculados como  $\{[\text{ingestão (kg/dia)} - \text{produção fecal (kg/dia)}] \div \text{ingestão (kg/dia)}\} \times 100$ .

A excreção fecal total de cada animal foi determinada com base na concentração de fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) usada como marcador interno. Amostras de ingredientes, sobras e fezes foram moídas em um moinho Wiley para passar por uma peneira de 2 mm e, em seguida, colocadas em sacos de tecido não tecido ( $4 \times 5$  cm, tamanho de poro  $50\text{ }\mu\text{m}$ ) seguindo a recomendação de no máximo 100g de MS/m<sup>2</sup> (CASALI et al., 2008). Amostras processadas foram incubadas por 288h no rúmen de duas vacas canuladas recebendo a mesma dieta usada no ensaio de digestão (DETMANN et al., 2012). Após o período de incubação, os sacos foram lavados em água corrente, secos em estufa de ventilação forçada ( $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 72 h) e analisados quanto à concentração de FDN. A concentração de FDNi foi calculada usando a seguinte equação, de acordo com Detmann et al. (2012):

$$iFDN (\%MS) = \frac{iFDN (g)}{MS (\%)} \times 100$$

#### 3.4. Fermentação ruminal e quantificação bacteriana

No dia 17 de cada período experimental, amostras de digesta ruminal foram coletadas em cinco sítios ruminiais diferentes (saco craniano - porção dorsal, saco craniano - porção ventral, saco ventral, saco caudal e saco dorsal - porção caudal). Amostras de digesta foram coletadas através da cânula ruminal a cada 2h em relação à alimentação matinal (08:00 h - tempo 0 e 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h após). Imediatamente após a coleta, as amostras de fluido ruminal foram filtradas usando quatro camadas de pano de algodão (malha de 1 mm), e o pH foi medido com um medidor de pH digital (ORP 8651, AZ Instrument Corp., Tanzi District, Taichung City, Taiwan). Posteriormente, alíquotas (250 mL) de fluido ruminal foram armazenadas em garrafas plásticas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para análises subsequentes de nitrogênio amoniacal ruminal ( $\text{N-NH}_3$ ) e ácidos graxos voláteis (AGV).

Após o descongelamento, as amostras de líquido ruminal foram centrifugadas ( $1800 \times g$  por 15 min) e um mililitro de sobrenadante foi transferido para tubos contendo um mililitro de ácido metafosfórico a 25% (peso/volume). Os tubos foram armazenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para análise subsequente das concentrações de ácidos graxos de cadeia curta por cromatografia líquida (MATHEW et al., 1997). As concentrações de  $\text{N-NH}_3$  foram avaliadas usando 0,5 mL de solução de tungstato de sódio a 10% (p/v) misturada com amostras de alíquota de 1,5 mL de fluido ruminal. As misturas foram centrifugadas imediatamente ( $1800 \times g$  15 min) (centrífuga Centribio 80-2B Centribio, São Paulo, SP, Brasil) à temperatura ambiente. Posteriormente,  $50\mu\text{L}$  do sobrenadante foram pipetados e combinados com os reagentes do kit comercial, seguindo a metodologia descrita (K047 ©, Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil). As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (AJX-1900, Micronal SA, São Paulo, Brasil). A emissão entérica de metano ( $\text{CH}_4$ ) foi estimada como  $\text{CH}_4$  (gramas/dia) =  $0,45$  acetato (mmol/L) -  $0,275$  propionato (mmol/L) +  $0,40$  butirato (mmol/L) (MOSS et al., 2000).

No dia 17 de cada período experimental, a digesta ruminal coletada 6h após a alimentação matinal também foi avaliada para quantificação bacteriana. Amostras representativas das porções sólidas (25g) e líquidas (25mL) foram processadas de acordo com Stevenson e Weimer (2007). Em seguida, o pellet bacteriano foi ressuspensão em  $700\mu\text{L}$  de solução tampão (Tris 100 mM, EDTA 10 mM e NaCl 0,15 M; pH 8,0) e armazenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a extração do DNA. Duzentos microlitros da amostra ressuspensa foram usados no processo de extração de DNA usando o kit comercial Qiagen (Qiagen QIAamp DNA stool, Qiagen, Valencia, CA). Posteriormente, a precipitação com

etanol foi realizada como última etapa da extração do DNA (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

A quantificação bacteriana relativa foi realizada por RT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real). Neste procedimento, o sistema de detecção ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Lennik, Bélgica) e a tecnologia SYBR (Invitrogen, Carlsbad, CA) em microplacas de 96 poços foram usados. As amostras foram analisadas em duplicata usando um controle negativo para cada bactéria avaliada. Cada poço foi preenchido com 10µL de 2 × SYBR Green Master Mix (Life Technologies, Foster City, CA), iniciadores de 0,30µM para cada espécie bacteriana, 6,6 µL de água livre de nuclease e 1µL de DNA extraído, dando um resultado final volume de 20µL por poço. Cinco táxons bacterianos foram quantificados: *Fibrobacter succinogenes*, *Streptococcus bovis*, *Selenomonas ruminantium*, *Ruminococcus albus* e *Prevotella ruminicola*. Os iniciadores foram selecionados com base nas sequências direta (F) e reversa (R) de iniciadores bacterianos como segue F: GGTATGGGATGAGCTTGC e R: GCCTGCCCCTGAACTATC para *F. succinogenes* (TAJIMA et al., 2001; 445 bp); F: TTCCTAGAGATAGGAAGTTTCTTCGG e R: ATGATGGCAACTAACAATAGGGGT para *S. bovis*; (STEVENSON e WEIMER, 2007; 127 bp); F: CAATAAGCATTCCGCCTGGG e R: TTCACTCAATGTCAAGCCCTGG para *S. ruminantium* (STEVENSON e WEIMER, 2007; 82 bp); F: CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCG e R: CCTCCTTGCGGTTAGAACA para *R. albus* (KOIKE; KOBAYASHI, 2001; 175 bp); e F: GAAAGTCGGATTAATGCTCTATGTTG e R: CATCCTATAGCGGTAAACCTTTGG, para *P. ruminicola* (STEVENSON e WEIMER, 2007; 74 bp).

O protocolo de amplificação RT-PCR incluiu uma desnaturação inicial (95 °C por 10 min), seguida por 44 ciclos de aquecimento (95 °C por 15 s) e resfriamento (55 °C por 30 s), e uma etapa final de extensão (72 °C por 30 s). A especificidade de cada primer foi verificada por meio de uma curva de dissociação. Uma curva padrão foi construída para cada bactéria do estudo (*Streptococcus bovis*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Selenomonas ruminantium* e *Prevotella ruminicola*) com base em diluições em série com 100, 60, 30, 15 e 7,5% de um pool de amostras com as mesmas concentrações de DNA. A quantificação relativa de bactérias foi executada em duplicata. Um controle negativo foi incluído em cada ensaio. Como os alvos bacterianos mostraram eficiências semelhantes às da população bacteriana total (16S ribossomal RNA-Eubacteria), a

quantificação relativa das populações foi avaliada usando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  descrito por Livak e Schmittgen (2001).

### 3.5. Balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana

Nos dias 16, 17 e 18 de cada período experimental, amostras de urina foram coletadas de todas as vacas, 4 h após a alimentação matinal após a micção espontânea. Ao final de cada coleta, as amostras eram imediatamente filtradas em gaze e alíquotas de urina (10 mL) diluídas em solução de ácido sulfúrico (40 mL; 0,036 N) para manter o pH abaixo de 3, evitando a degradação microbiana do derivado de purina (CHEN e GOMES, 1992) e volatilização de amônia (PLAIZIER et al., 2000). As amostras foram então armazenadas em recipientes plásticos a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a análise. Uma amostra de urina pura sem adição de solução de ácido sulfúrico foi armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  para análise de nitrogênio total e creatinina.

O nitrogênio total foi estimado como a quantidade de nitrogênio em g/100 mL de urina encontrada na amostra multiplicada pelo volume total de urina. O balanço de nitrogênio no corpo dos animais foi calculado usando a diferença entre o nitrogênio ingerido (ingestão de N) e o nitrogênio total nas fezes [calculado com base na proteína bruta nas fezes (g/kg)  $\times$  excreção fecal de MS (kg/dia)  $\times$  6,25], na urina (g/dia) e no leite (g/dia). A excreção de nitrogênio do leite foi calculada usando a seguinte equação: N do leite = concentração de proteína bruta do leite (g/kg)  $\times$  produção de leite (kg/dia)  $\times$  6,38.

A excreção urinária diária total (kg/dia) foi calculada conforme descrito por Chizzotti et al. (2008). Amostras de ração, urinária e fecal foram analisadas quanto ao conteúdo de nitrogênio total usando o método Kjeldahl (AOAC, 2000; ID 984.13). A excreção urinária de nitrogênio foi calculada multiplicando o volume urinário (kg/dia) pelo nitrogênio urinário (g/kg).

As concentrações de creatinina e ácido úrico foram determinadas usando kits comerciais (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, Brasil, ID: 35-100 e ID: 140-1/100, respectivamente). As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro (AJX-1900, Micronal SA, São Paulo, Brasil).

O volume urinário diário foi estimado com base nas concentrações de creatinina na urina. As concentrações de creatinina e ácido úrico foram determinadas usando kits comerciais (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, Brasil, ID: 35-100 e ID: 140-1/100, respectivamente) por uma reação enzimática colorimétrica cinética em um

espectrofotômetro (AJX 1900, Micronal SA, São Paulo, Brasil). A excreção urinária de creatinina foi estimada com base em um PC de 24,05 mg/kg (PC - peso corporal; Chizzotti et al., 2008).

A síntese de proteínas microbianas foi determinada de acordo com Chen e Gomes (1992). As concentrações de alantoína e ácido úrico na urina e de alantoína no leite foram analisadas por método colorimétrico (Chen e Gomes, 1992). Amostras de leite foram desproteinizadas com solução de ácido tricloroacético (25%, p/v), filtradas em filtro Whatman e analisadas para posterior análise de alantoína.

A excreção total de derivados de purina (DP, mmol/dia) foi calculada como a soma das quantidades de alantoína e ácido úrico excretadas na urina e no leite (ORELLANA BOERO et al., 2001). As purinas microbianas absorvidas (absP) foram calculadas usando a seguinte equação descrita por Chen e Gomes (1992):

$$absP = (DP - 0.385 \times PC^{0.75}) / 0.84,$$

onde PC é o peso corporal, 0.84 é a recuperação de absP e  $0.385 \times PC^{0.75}$  é a excreção endógena de PD.

A síntese de nitrogênio e proteína microbiana foi estimada pela equação de Chen e Gomes (1992). A síntese de nitrogênio ruminal (gramas N<sub>mic</sub> de N / dia) foi calculada usando as purinas microbianas absorvidas de acordo com a equação de Chen e Gomes (1992):

$$N_{mic} = (70 \times DP_{abs}) / (0.83 \times 0.134 \times 1000),$$

onde 70 é o conteúdo de N de derivados de purina (mg de N/mol), 0.83 é o coeficiente de digestibilidade intestinal de purinas microbianas e 0.134 é o N em purinas para N em bactérias ruminais (VALADARES et al., 1999).

### 3.6. Metabólitos sanguíneos

No dia 21 de cada período experimental, amostras de sangue (10 mL) foram coletadas por punção venosa da veia coccígea em tubos Vacutainers® antes da alimentação da manhã. Imediatamente após a coleta de sangue, os tubos foram centrifugados (1800 x g por 15 min em temperatura ambiente) (Centribio 80-2B

Centribio, São Paulo, SP, Brasil), o soro foi coletado, transferido para tubos Eppendorf® e armazenado a -20 ° C.

As concentrações séricas de proteína total, albumina, ureia, glicose, aspartato-aminotransferase (AST) e gama-glutamilttransferase (GGT) foram analisadas por métodos colorimétricos com kits comerciais (Doles Reagents Ltd., Goiânia, GO, Brasil). As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro (AJX-1900, Micronal SA, São Paulo, Brasil).

### 3.7. Produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite

A produção de leite foi registrada em medidor automático (MM6® DeLaval, Suécia). A produção de leite foi corrigida para 3,5% de gordura (FCM) de acordo com a equação proposta por Sklan et al. (1992), onde  $FCM = (0,432 + 0,165 \times \text{teor de gordura do leite}) \times \text{produção de leite (kg/dia)}$ . O leite com correção de energia (ECM) foi calculado usando a equação descrita pelo Dairy Records Management System (2014) onde  $ECM = 0,327 \times \text{produção de leite (kg/dia)} + 12,86 \times \text{produção de gordura (kg/dia)} + 7,65 \times \text{produção de proteína (kg/dia)}$ .

Nos dias 16, 17 e 18 de cada período experimental, amostras de leite foram coletadas diretamente do medidor e transferidas para frascos plásticos contendo 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol (Bronopol®) como conservante e analisadas quanto à composição do leite, nitrogênio ureico e contagem de células somáticas. Além disso, as amostras de leite foram coletadas e, em seguida, liofilizadas a -43 °C por 96 h para análise dos perfis de ácidos graxos. Lipídios extraídos de amostras de leite foram metilados usando hexano como solvente de extração. Metóxido de sódio e cloreto de acetila foram usados como catalisadores básicos e ácidos, respectivamente (KRAMER et al., 1997). Um cromatógrafo a gás (Focus GC-Thermo Scientific, Milão, Itália) equipado com um detector de ionização de chama (CG-DIG) e uma coluna capilar SP-2560 (Supelco, 100 m × 0,25 mm × 0,2 μm) foram usados para quantificar a gordura ésteres metílicos de ácido. O cromatógrafo foi configurado da seguinte forma: temperaturas do injetor e do detector ajustadas para 250 °C e 280 °C, respectivamente, e uma razão de divisão de 30:1. A temperatura inicial do forno era de 140 °C, elevada a 1 °C / min até atingir 220 °C e mantida por 25 min. O gás hidrogênio foi usado como gás de arraste (taxa de fluxo de 1,5 mL / min). As injeções (1 μL) foram realizadas em duplicata para cada extração.

A identificação putativa de ésteres metílicos de ácidos graxos foi feita com base nos tempos de retenção dos padrões de FA (GLC-674, Nu-Chek Prep, Inc.). O resultado foi obtido pela normalização das áreas e expresso em mg / 100 mg de ácidos graxos.

### 3.8. Análises químico-bromatológicas

A forragem, os ingredientes e as amostras de sobras foram secas em estufa de ventilação forçada (55 °C por 72h), moídas em moinho Wiley com peneira de 1 mm e avaliadas quanto à matéria seca (MS; ID 920,15), cinzas (MM; ID 942.05), proteína bruta (PB = N × 6,25; ID 984.13), extrato de éter (EE; ID 920.39) e fibra de detergente ácido e lignina (sa) (FDA e LIG; ID 973,18) de acordo com os métodos da AOAC International (2000). As amostras foram analisadas quanto ao teor de fibra em detergente neutro (FDN) (FDNcp; expresso livre de cinzas residuais) de acordo com Mertens (2002), com o auxílio de um analisador de fibra (Ankom Tech Corp., Fairport, NY, EUA) usando termoestável alfa-amilase e nenhum sulfito de sódio no detergente.

O conteúdo de carboidratos não fibrosos na dieta foi calculado usando a equação proposta por Hall (2000). Os conteúdos de nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados de acordo com o NRC (2001) e a energia líquida da lactação (NEL) foi calculada conforme descrito por Weiss, Conrad e Pierre (1992). Assim, a proteína bruta indigestível dos valores alimentares foi descontada pelo nível de ingestão de matéria seca e usados 1 como fator de processamento.

### 3.9. Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o procedimento MIXED do software SAS (Statistical Analysis System - SAS Institute Inc., Cary, NC, versão 9.2) de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + c_i(S_i) + P_k + D_l + SD_{il} + e_{ijkl}$$

onde  $Y_{ijkl}$  é a variável dependente,  $\mu$  é a média geral,  $S_i$  é o efeito fixo da vaca no quadrado latino  $i$  (grupo de vacas) ( $i = 1-2$ ),  $c_j(S_i)$  é o efeito aleatório da vaca dentro do quadrado  $j$  ( $j = 1-8$ ),  $P_k$  é o efeito fixo do período experimental  $k$  ( $k = 1-4$ ),  $D_l$  é o efeito fixo da dieta  $l$  ( $l = 1-4$ ),  $SD_{il}$  é o efeito aleatório da interação entre o quadrado e a dieta, e  $e_{ijkl}$  é o erro residual.

As características de fermentação ruminal foram analisadas como medidas repetidas ao longo do tempo (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h em relação a alimentação matinal) usando o procedimento MIXED do SAS seguindo o modelo abaixo:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + c_j(S_i) + P_k + D_l + SD_{il} + e_{ijkl} + T_m + T_m \times D_l + e_{ijklm}$$

onde  $Y_{ijkl}$  é a variável dependente,  $\mu$  é a média geral,  $S_i$  é o efeito fixo do quadrado  $i$  ( $i =$  grupo de vaca) (1-2),  $c_j(S_i)$  é o aleatório efeito do animal dentro do quadrado  $j$  ( $j = 1-8$ ),  $P_k$  é o efeito fixo do período  $k$  ( $k = 1-4$ ),  $D_l$  é o efeito fixo da dieta  $l$  ( $l = 1-4$ ),  $SD_{il}$  é o efeito aleatório da interação entre o quadrado e a dieta,  $e_{ijkl}$  é o erro experimental,  $T_m$  é o efeito fixo do tempo de amostragem  $m$  ( $m = 1-7$ ),  $T_m \times D_l$  é o efeito de interação fixo entre o tempo de amostragem e o tratamento, e  $e_{ijklm}$  é o experimental aleatório erro. A metodologia de Akaike foi usada para determinar a matriz de covariância. Os graus de liberdade foram definidos de acordo com o método de Kenward e Roger (1997). Os efeitos de interação entre dieta e quadrado foram removidos dos modelos quando não significativo.

Todas as médias foram estimadas pelo procedimento LSMEANS e comparadas pelo teste de Tukey. O nível de significância foi estabelecido em 0,05, e tendências foram consideradas quando  $0,05 < P \leq 0,10$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Consumo de nutrientes e digestibilidade aparente total

As vacas alimentadas com a dieta CON apresentaram maior ingestão de MS ( $P = 0,03$ ; variação total de 9,9 a 11,9 kg / dia entre as dietas), MO ( $P = 0,03$ ), PB ( $P = 0,04$ ), FDN ( $P = 0,04$ ) e EE ( $P = 0,03$ ), expressos em kg/dia, do que aquelas alimentadas com MON (Tabela 3). Os animais alimentados com MON apresentaram consumos semelhantes de MS, MO, PB e EE com aqueles alimentados com SAP e SAPEO. As vacas alimentadas com SAPEO apresentaram maior ingestão de FDN ( $P = 0,04$ ), expresso em kg/dia, do que os animais alimentados com MON (Tabela 3). Além disso, os animais alimentados com MON apresentaram ingestão de FDN semelhante às vacas alimentadas com CON e SAP. Os animais alimentados com CON apresentaram maiores consumos de MS ( $P = 0,02$ ) e FDN ( $P = 0,02$ ), expresso em porcentagem do peso corporal, do que aqueles alimentados com MON (Tabela 3). As vacas alimentadas com MON apresentaram consumo de MS semelhante àquelas alimentadas com SAP e SAPEO. Além disso, os animais alimentados com MON apresentaram ingestão de FDN semelhante àquelas alimentadas com SAP. Uma tendência para aumento no consumo de CNF ( $P = 0,08$ ) foi observada em vacas alimentadas com CON, e uma diminuição foi observada em animais alimentados com MON. Além disso, os tratamentos não influenciaram a digestibilidade aparente dos nutrientes nas vacas ( $P > 0,05$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Efeitos da utilização de diferentes aditivos na alimentação de vacas em lactação média sobre o consumo de nutrientes e digestibilidade aparente total

Item	Aditivos				SEM <sup>b</sup>	P-valor
	COM	SAP	SAPEO	MON		
Consumo (kg/dia)						
Matéria seca	11.9 <sup>a</sup>	11.2 <sup>ab</sup>	11.6 <sup>ab</sup>	9.99 <sup>b</sup>	0.37	0.03
Matéria orgânica	11.5 <sup>a</sup>	10.8 <sup>ab</sup>	11.1 <sup>ab</sup>	9.63 <sup>b</sup>	0.36	0.03
Proteína bruta	1.84 <sup>a</sup>	1.71 <sup>ab</sup>	1.72 <sup>ab</sup>	1.52 <sup>b</sup>	0.05	0.04
Fibra em detergente neutro	5.18 <sup>ab</sup>	4.85 <sup>ab</sup>	5.26 <sup>a</sup>	4.30 <sup>b</sup>	0.05	0.04
Extrato etéreo	0.46 <sup>a</sup>	0.43 <sup>ab</sup>	0.45 <sup>ab</sup>	0.39 <sup>b</sup>	0.01	0.04
Carboidratos não fibrosos	4.76	4.49	4.41	4.05	0.17	0.08
Consumo (% Peso corporal)						
Matéria seca	3.99 <sup>a</sup>	3.69 <sup>ab</sup>	3.75 <sup>ab</sup>	3.29 <sup>b</sup>	0.12	0.02
Fibra em detergente neutro	1.72 <sup>a</sup>	1.59 <sup>ab</sup>	1.70 <sup>a</sup>	1.42 <sup>b</sup>	0.05	0.02
Coefficiente de digestibilidade aparente total (g/kg)						
Matéria seca	613	623	620	624	11.1	0.96
Matéria orgânica	666	683	674	681	11.9	0.81
Proteína bruta	649	681	668	664	13.6	0.63
Extrato etéreo	718	719	776	770	17.8	0.20
Fibra em detergente neutro	517	521	525	523	10.5	0.98

<sup>a</sup>CON - Controle, sem aditivo alimentar; SAP - saponinas de pó de feno-grego de planta inteira, 16g / dia / vaca; SAPEO - uma mistura de óleos essenciais naturais, com carvacrol, cinamaldeído e limoneno como componentes majoritários combinados com SAP, 16g / dia / vaca; MON - Monensina, inclusão dietética de 24 mg / kg MS de monensina sódica (média 0.24 g / dia de MON);

<sup>b</sup>Erro padrão da média;

<sup>c</sup>O nível de significância foi estabelecido em 0.05 e as tendências foram consideradas quando  $0.05 < P \leq 0.10$ .

#### 4.2. Fermentação ruminal e quantificação bacteriana

Foram observados efeitos da dieta ( $P = 0,01$ ) e do tempo ( $P < 0,01$ ) para o pH ruminal (Tabela 4; Fig. 2) e para a concentração ruminal de N-NH<sub>3</sub> (Tabela 4; Fig. 3). As vacas alimentadas com CON apresentaram pH ruminal superior ao dos animais alimentadas com MON. No entanto, o pH ruminal foi semelhante entre as vacas alimentadas com dietas contendo aditivos (SAP, SAPEO e MON) e àquelas alimentadas com CON, SAP e SAPEO.

As vacas alimentadas com MON apresentaram maiores concentrações de N-NH<sub>3</sub> ruminal do que aquelas alimentadas com CON. Além disso, as concentrações ruminais de N-NH<sub>3</sub> foram semelhantes entre os animais alimentados com SAP, SAPEO e MON e entre as vacas alimentadas com CON, SAP e SAPEO. Os tratamentos não influenciaram a concentração total de AGV, a relação C2:C3 ou as emissões entéricas de metano ( $P > 0,05$ ; Tabela 4). Uma tendência para aumento na concentração de acetato ( $P = 0,09$ ) foi

observada nas vacas alimentadas com MON, e uma diminuição foi observada quando os animais foram alimentados com SAP (Tabela 4). As vacas alimentadas com SAPEO apresentaram maiores concentrações de butirato ( $P < 0,01$ ) do que aquelas alimentadas com CON e MON (Tabela 4). Além disso, esta concentração foi semelhante entre os animais alimentados com CON e SAP, bem como entre os alimentados com SAP e SAPEO.

**Tabela 4.** Efeitos da utilização de diferentes aditivos na alimentação de vacas em lactação média sobre a fermentação ruminal

Item	Aditivo <sup>a</sup>				EPM <sup>b</sup>	P-valor <sup>c</sup>		
	CON	SAP	SAPEO	MON		Dieta	Tempo	Dieta* Tempo
pH	6.28 <sup>a</sup>	6.21 <sup>ab</sup>	6.19 <sup>ab</sup>	6.11 <sup>b</sup>	0.02	0.01	<0.01	0.99
NH <sub>3</sub> -N (mg/dL) <sup>d</sup>	22.0 <sup>b</sup>	25.1 <sup>ab</sup>	23.4 <sup>ab</sup>	26.5 <sup>a</sup>	0.61	0.01	<0.01	0.82
Total AGV (mmol/L)	52.7	53.4	57.8	54.2	1.14	0.42	0.74	1.00
AGV (mmol/100 mmol) <sup>e</sup>								
Acetato (C2)	64.5	63.8	64.0	64.9	0.73	0.09	0.64	0.39
Propionato (C3)	26.1	26.4	25.8	26.2	0.14	0.53	0.25	0.34
Butirato	9.31 <sup>bc</sup>	9.77 <sup>ab</sup>	10.0 <sup>a</sup>	8.79 <sup>c</sup>	0.09	<0.01	0.95	0.51
C2:C3 relação <sup>f</sup>	2.49	2.42	2.77	2.49	0.08	0.49	0.42	0.37
CH <sub>4</sub> (g/100 g de AGV) <sup>g</sup>	13.6	13.6	14.9	13.9	0.30	0.42	0.67	1.00

<sup>a</sup>CON - Controle, sem aditivo alimentar; SAP - saponinas de pó de feno-grego de planta inteira, 16 g/vaca/dia; SAPEO - uma mistura de óleos essenciais naturais, com carvacrol, cinamaldeído e limoneno como componentes majoritários combinados com SAP, 16 g/vaca/dia; MON - Monensina, inclusão dietética de 24 mg/kg de MS de monensina sódica (média de 0,24 g / dia do MON).

<sup>b</sup>Erro padrão da média.

<sup>c</sup>O nível de significância foi estabelecido em 0,05 e as tendências foram consideradas quando  $0,05 < P \leq 0,10$ ; Probabilidade de efeito aditivo; Probabilidade para o efeito do tempo; Probabilidade para a interação entre o aditivo e o efeito do tempo.

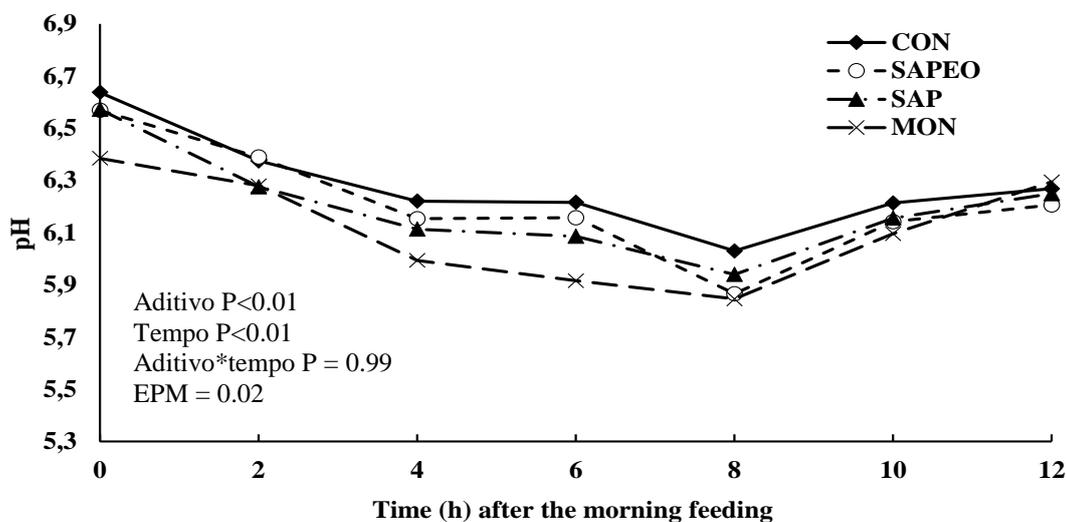
<sup>d</sup>Concentração ruminal de nitrogênio amoniacal.

<sup>e</sup>Ácidos graxos voláteis.

<sup>f</sup>Proporção acetato para propionato.

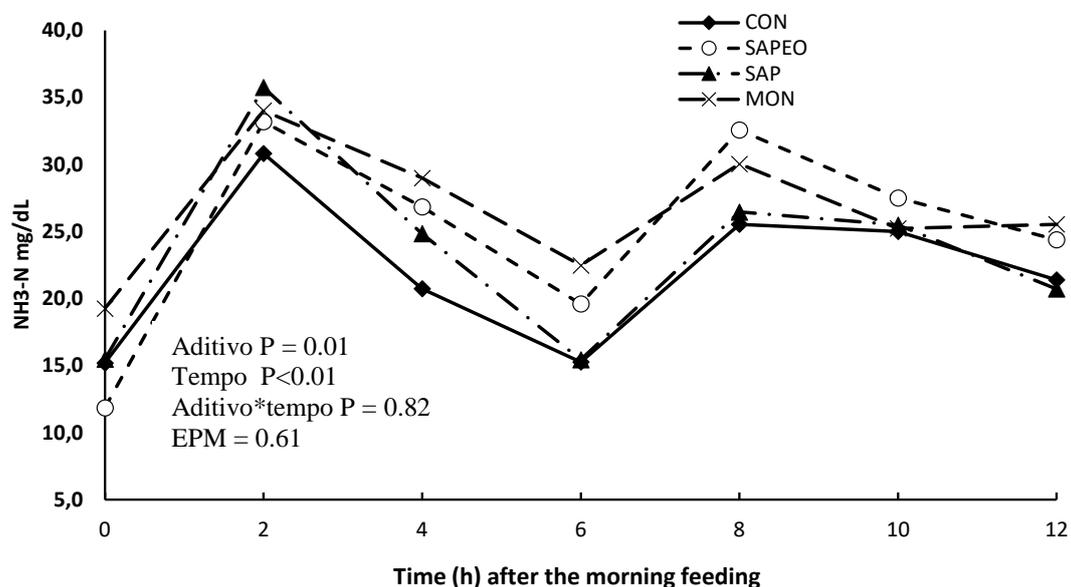
<sup>g</sup>Emissão de metano entérico:  $CH_4 = (\text{ácido acético} \times 0,45) - (\text{ácido propiônico} \times 0,275) + (\text{ácido butírico} \times 0,40)$  estimado de acordo com Moss et al. (2000) equação.

**Figura 2.** pH ruminal de vacas em lactação média alimentadas com diferentes aditivos alimentares.



CON - Controle, sem aditivo alimentar; SAP - saponinas de pó de feno-grego de planta inteira, 16g / dia / vaca; SAPEO - uma mistura de EO natural, com carvacrol, cinamaldeído e limoneno como componentes majoritários combinados com SAP, 16g / dia / vaca; MON - Monensina, inclusão dietética de 24 mg / kg MS de monensina sódica. Erro padrão da média (SEM).

**Figura 3.** Concentração de nitrogênio amoniacal ruminal (NH<sub>3</sub>-N, mg / dL) de vacas em lactação média alimentadas com diferentes aditivos alimentares.



CON - Controle, sem aditivo alimentar; SAP - saponinas de pó de feno-grego de planta inteira, 16g / dia / vaca; SAPEO - uma mistura de EO natural, com carvacrol, cinamaldeído e limoneno como componentes majoritários combinados com SAP, 16g / dia / vaca; MON - Monensina, inclusão dietética de 24 mg / kg MS de monensina sódica. Erro padrão da média (SEM).

As vacas alimentadas com CON, SAP e SAPEO apresentaram uma maior população bacteriana relativa de *F. succinogenes* ( $P = 0,04$ ) em comparação com aquelas alimentadas com MON (Tabela 5). No entanto, a população bacteriana relativa de *F. succinogenes* foi semelhante entre os animais alimentados com CON, SAP e SAPEO. Da mesma forma, as proporções relativas de *R. albus*, *S. ruminantium*, *S. bovis* e *P. ruminicola* não foram afetadas pela dieta ( $P > 0,05$ ; Tabela 5).

**Tabela 5.** Efeitos da utilização de diferentes aditivos na alimentação de vacas em lactação média sobre a população bacteriana no rúmen

Item	Aditivo <sup>a</sup>				EPM <sup>b</sup>	P-valor <sup>c</sup>
	CON	SAP	SAPEO	MON		
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	1.00 <sup>a</sup>	1.15 <sup>a</sup>	0.98 <sup>a</sup>	0.44 <sup>b</sup>	0.02	0.04
<i>Ruminococcus albus</i>	1.00	1.27	1.23	2.20	0.04	0.30
<i>Selenomonas ruminantium</i>	1.00	0.84	1.41	0.84	0.05	0.17
<i>Streptococcus bovis</i>	1.00	1.06	1.11	1.44	0.02	0.37
<i>Pseudomonas ruminicola</i>	1.00	1.14	0.98	1.57	0.06	0.30

<sup>a</sup>CON - Controle, sem aditivo alimentar; SAP - saponinas de pó de feno-grego de planta inteira, 16g / dia / vaca; SAPEO - uma mistura de óleos essenciais naturais, com carvacrol, cinamaldeído e limoneno como componentes majoritários combinados com SAP, 16g / dia / vaca; MON - Monensina, inclusão dietética de 24 mg / kg MS de monensina sódica (média 0,24 g / dia de MON);

<sup>b</sup>Erro padrão da média;

<sup>c</sup>O nível de significância foi estabelecido em 0,05 e as tendências foram consideradas quando  $0,05 < P \leq 0,10$ ; dMédia expressa como variação de dobra em relação ao CON.

#### 4.3. Balanço de nitrogênio, síntese de proteína microbiana e utilização de energia

As vacas alimentadas com CON, SAP e SAPEO apresentaram consumos de energia líquida ( $P = 0,01$ ) e digestível ( $P < 0,01$ ) semelhantes entre si e maiores do que aquelas alimentadas com MON (Tabela 6). Os animais alimentados com SAPEO apresentaram maior eficiência (leite NEL/ED consumido;  $P = 0,01$ ) do que aqueles alimentados com CON e SAP (Tabela 6). Entretanto, a eficiência foi semelhante entre as vacas alimentadas com SAPEO e MON e entre os animais alimentados com CON, SAP e MON. Foi observada uma tendência para aumento na produção de leite (NEL) ( $P = 0,08$ ) em vacas alimentadas com SAPEO, e uma diminuição foi observada quando os animais foram alimentados SAP (Tabela 6).

**Tabela 6.** Efeitos da utilização de diferentes aditivos na alimentação de vacas em lactação média sobre o balanço de nitrogênio (N), síntese de proteína microbiana e utilização de energia

Item	Aditivo <sup>a</sup>				EPM <sup>b</sup>	P-valor <sup>c</sup>
	CON	SAP	SAPEO	MON		
Utilização de nitrogênio						
Consumido– N (g/d)	322	325	312	290	24.6	0.12
Urinário – N (g/100 g)	32.4	30.6	32.7	32.1	4.82	0.94
Fecal – N (g/100 g)	35.5	31.9	31.5	34.1	3.97	0.30
Leite – N (g/100 g)	21.2	20.3	24.1	21.2	3.05	0.32
Nitrogênio microbiano, g/d	178	190	166	163	36.7	0.78
Síntese de proteína microbiana	143	150	136	150	25.2	0.91
Utilização de energia (Mcal/d)						
Consumo de energia NET	19.3 <sup>a</sup>	18.0 <sup>a</sup>	18.3 <sup>a</sup>	16.1 <sup>b</sup>	1.71	0.01
Consumo de energia digestível	34.8 <sup>a</sup>	33.4 <sup>a</sup>	33.8 <sup>a</sup>	29.5 <sup>b</sup>	2.55	<0.01
Produção de leite EL, <sup>e</sup>	13.7	13.1	15.5	13.7	2.02	0.08
Balanço, NEL A. Mant <sup>f</sup>	5.82	5.80	5.87	5.88	0.13	0.58
EL Leite/DE Consumo <sup>g</sup>	0.41 <sup>b</sup>	0.37 <sup>b</sup>	0.48 <sup>a</sup>	0.47 <sup>ab</sup>	0.05	0.01

<sup>a</sup>CON - Controle, sem aditivo alimentar; SAP - saponinas de pó de feno-grego de planta inteira, 16g / dia / vaca; SAPEO - uma mistura de óleos essenciais naturais, com carvacrol, cinamaldeído e limoneno como componentes majoritários combinados com SAP, 16g / dia / vaca; MON - Monensina, inclusão dietética de 24 mg / kg MS de monensina sódica (média 0,24 g / dia de MON);

<sup>b</sup>Erro padrão da média;

<sup>c</sup>O nível de significância foi estabelecido em 0,05 e as tendências foram consideradas quando  $0,05 < P \leq 0,10$ ;

<sup>d</sup>Gramas de proteína bruta microbiana / kg de ingestão total de nutrientes digestíveis;

<sup>e</sup>Net energia de lactação (EL);

<sup>f</sup>Net energia de lactação disponível para manutenção = EL (ingestão) - EL (Ganho de PV) - EL (leite);

<sup>g</sup>(produção de leite EL + ganho de peso corporal EL) / ingestão de energia digestível.

#### 4.4. Metabólitos sanguíneos

As vacas alimentadas com SAPEO apresentaram maiores concentrações de albumina ( $P = 0,04$ ) do que aquelas alimentadas com CON, SAP e MON (Tabela 7). Entretanto, as concentrações de albumina foram semelhantes entre os animais alimentados com CON, SAP e MON. As vacas alimentadas com CON mostraram maiores concentrações de ureia ( $P = 0,04$ ) do que aquelas alimentadas com SAP e SAPEO (Tabela 7). No entanto, as concentrações de ureia foram semelhantes entre os animais alimentados com CON e MON e entre os animais alimentados com SAP, SAPEO e MON. Os tratamentos não influenciaram ( $P > 0,05$ ) as concentrações séricas de proteína total, glicose, GGT ou AST (Tabela 7).

**Tabela 7.** Efeitos da utilização de diferentes aditivos na alimentação de vacas em lactação média sobre os metabólitos sanguíneos

Item	Aditivo <sup>a</sup>				EPM <sup>b</sup>	P-valor <sup>c</sup>
	CON	SAP	SAPEO	MON		
Albumina (U/L)	2.39 <sup>b</sup>	2.26 <sup>b</sup>	2.45 <sup>a</sup>	2.25 <sup>b</sup>	0.06	0.04
Ureia (mg/dL)	57.0 <sup>ab</sup>	41.8 <sup>c</sup>	45.4 <sup>c</sup>	50.1 <sup>bc</sup>	5.42	0.04
Proteínas totais (U/L)	8.48	8.37	7.41	8.13	0.70	0.46
Glicose (g/dL)	78.9	79.7	84.7	70.2	9.67	0.57
GGT (U/L)	28.3	26.6	25.7	26.5	1.56	0.63
AST (U/L)	54.8	54.6	60.0	56.6	5.76	0.65

<sup>a</sup>CON - Controle, sem aditivo alimentar; SAP - saponinas de pó de feno-grego de planta inteira, 16g / dia / vaca; SAPEO - uma mistura de óleos essenciais naturais, com carvacrol, cinamaldeído e limoneno como componentes majoritários combinados com SAP, 16g / dia / vaca; MON - Monensina, inclusão dietética de 24 mg / kg MS de monensina sódica (média 0,24 g / dia de MON);

<sup>b</sup>Erro padrão da média;

<sup>c</sup>O nível de significância foi estabelecido em 0,05 e as tendências foram consideradas quando  $0,05 < P \leq 0,10$ .

#### 4.5. Produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite

As vacas alimentadas com SAPEO apresentaram maiores níveis de gordura ( $P = 0,01$ ) e proteína ( $P = 0,01$ ) no leite do que os animais alimentados com MON (Tabela 8). Contudo, os níveis de gordura e proteína foram semelhantes entre as vacas alimentadas com CON, SAP e MON e entre os animais alimentados com CON, SAP e SAPEO. O tratamento não influenciou a composição do leite, NUL, CCS, ECM ou a eficiência das vacas ( $P > 0,05$ ; Tabela 8). Da mesma forma, não foram observados efeitos dos tratamentos na produção de leite (média de 17,6 kg/dia), PLC, gordura, proteína, lactose, EST ou ECM ( $P > 0,05$ ). Uma tendência de aumento no conteúdo de ESD ( $P = 0,09$ ) foi observada nas vacas alimentadas com SAPEO, e uma tendência de redução foi observada quando os animais foram alimentados com MON (Tabela 8).

**Tabela 8.** Efeitos da utilização de diferentes aditivos na alimentação de vacas em lactação média sobre a produção e composição do leite

Item	Aditivo <sup>a</sup>				EPM <sup>b</sup>	P-valor <sup>c</sup>
	CON	SAP	SAPEO	MON		
Produção (kg/dia)						
Leite	17.5	16.4	18.7	17.7	2.47	0.38
PLC (3.5 %) <sup>d</sup>	20.9	20.1	23.8	20.9	2.98	0.14
Gordura	0.81	0.80	0.96	0.82	0.12	0.10
Proteína	0.65	0.61	0.72	0.64	0.10	0.18
Lactose	0.73	0.71	0.82	0.78	0.13	0.31
EST	2.39	2.31	2.52	2.34	0.40	0.74
ESD	1.60	1.49	1.72	1.59	0.26	0.33
ECM <sup>e</sup>	21.2	20.3	24.1	21.2	3.05	0.13
Composition (g/kg)						
Gordura	47.5 <sup>ab</sup>	49.3 <sup>ab</sup>	52.5 <sup>a</sup>	46.0 <sup>b</sup>	1.22	0.01
Proteína	36.7 <sup>ab</sup>	37.5 <sup>ab</sup>	38.8 <sup>a</sup>	36.0 <sup>b</sup>	0.42	0.01
Lactose	44.2	43.6	44.0	43.7	0.36	0.70
EST	137	142	138	139	2.48	0.38
ESD	90.6	90.6	91.9	89.7	0.66	0.09
NUL (mg/dL) <sup>f</sup>	18.5	18.8	18.4	18.1	0.45	0.92
CSS (unit/mL) <sup>g</sup>	142	173	139	196	59.3	0.25
Eficiência <sup>h</sup>	1.44	1.47	1.58	1.77	0.12	0.17
Desempenho corporal						
ECC (unidade) <sup>i</sup>	2.50	2.31	2.44	2.44	0.16	0.28
PC (kg) <sup>j</sup>	304	302	308	308	9.51	0.64

<sup>a</sup>CON - Controle, sem aditivo alimentar; SAP - saponinas de pó de feno-grego de planta inteira, 16 g/vaca/dia; SAPEO - uma mistura de óleos essenciais naturais, com carvacrol, cinamaldeído e limoneno como componentes majoritários combinados com SAP, 16 g/vaca/dia; MON - Monensina, inclusão dietética de 24 mg/kg de MS de monensina sódica (média de 0,24 g/dia do MON).

<sup>b</sup>Erro padrão da média.

<sup>c</sup>O nível de significância foi estabelecido em 0,05 e as tendências foram consideradas quando  $0,05 < P \leq 0,10$ .

<sup>d</sup>Leite corrigido para gordura (PLC, 3,5%) foi calculado de acordo com Sklan et al. (1992):  $PLC = (0,432 + 0,165 \times \text{porcentagem de gordura no leite}) \times \text{produção de leite (kg/dia)}$ .

<sup>e</sup>Leite com energia corrigida:  $ECM = 0,327 \times \text{produção de leite (kg/dia)} + 12,86 \times \text{produção de gordura (kg/dia)} + 7,65 \times \text{produção de proteína (kg/dia)}$  foi calculada de acordo com o leite Sistema de Gestão de Registros (2014).

<sup>f</sup>nitrogênio ureico do leite.

<sup>g</sup>células somáticas de contagem.

<sup>h</sup>Produção de leite / consumo de matéria seca.

<sup>i</sup>escore de condição corporal.

<sup>j</sup> peso corporal.

Os animais alimentados com CON, SAP e SAPEO apresentaram maiores concentrações de ácidos graxos de cadeia média no leite, como butirato (C4;  $P = 0,01$ ) e capríco (C6;  $P = 0,03$ ) do que aqueles alimentados com MON (Tabela 9). Concentrações mais altas de ácido graxo C8 ( $P = 0,03$ ) foram observadas no leite de vacas alimentadas com SAP e SAPEO, e menores concentrações foram observadas nas vacas alimentadas com MON (Tabela 9). Apesar disso, foram observadas concentrações semelhantes de ácidos graxos C8 entre as vacas alimentadas com CON e MON.

**Tabela 9.** Efeitos da utilização de diferentes aditivos na alimentação de vacas em lactação média sobre o perfil de ácidos graxos do leite

Item (g/100 AG)	Aditivo <sup>a</sup>				EPM <sup>b</sup>	P-valor <sup>c</sup>
	CON	SAP	SAPEO	MON		
C4:0	0.75 <sup>a</sup>	0.79 <sup>a</sup>	0.75 <sup>a</sup>	0.65 <sup>b</sup>	0.02	0.01
C6:0	1.02 <sup>a</sup>	1.04 <sup>a</sup>	1.03 <sup>a</sup>	0.88 <sup>b</sup>	0.02	0.03
C8:0	0.99 <sup>ab</sup>	1.00 <sup>a</sup>	1.00 <sup>a</sup>	0.87 <sup>b</sup>	0.03	0.03
C10:0	2.84	2.84	2.82	2.62	0.10	0.46
C10:1 <i>trans</i> -11	0.31	0.33	0.33	0.31	0.01	0.44
C12:0	3.78	3.86	3.73	3.61	0.15	0.80
C14:0	11.0	11.2	11.1	10.6	0.20	0.42
C14:1	0.89	0.97	0.98	0.92	0.02	0.45
C16:0	34.4	35.2	35.0	35.2	0.43	0.79
C16:1 <i>cis</i> -7	0.19	0.18	0.19	0.22	0.01	0.07
C18:0	10.7	10.3	10.2	9.39	0.22	0.06
C18:1 <i>trans</i> -9	0.37	0.36	0.38	0.35	0.01	0.65
C18:1 <i>trans</i> -11	1.12	1.08	1.18	1.58	0.13	0.34
C18:1 <i>cis</i> -9	19.4	19.0	19.2	19.7	0.59	0.92
C18:1 <i>cis</i> 11	0.49 <sup>ab</sup>	0.44 <sup>b</sup>	0.45 <sup>b</sup>	0.57 <sup>a</sup>	0.02	0.01
C18:2 <i>n6-cis</i>	2.28	2.14	2.11	2.44	0.08	0.15
C18:3 <i>n6</i>	0.07	0.02	0.05	0.03	0.01	0.49
C18:3 <i>n3</i>	0.07	0.09	0.07	0.09	0.01	0.59
CLA <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	0.40	0.41	0.52	0.42	0.03	0.15
CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	0.04	0.04	0.08	0.05	0.01	0.40
Outros	3.30	2.87	3.01	3.32	0.14	0.42
<C16	23.8	24.2	24.0	22.9	0.54	0.35
>C16	36.1	35.2	35.5	35.9	0.82	0.81
C16 total	36.6	37.7	37.5	37.9	0.42	0.92
C18						
C18 Insaturado	24.2	23.6	24.0	25.2	0.69	0.36
C18 Saturado	10.7	10.3	10.2	9.26	0.22	0.17
Total						
Saturado	68.7	69.6	69.1	67.4	0.67	0.20
Insaturado	27.5	27.0	27.4	28.8	0.71	0.24
Insaturado:saturado <sup>e</sup>	0.40	0.39	0.39	0.43	0.02	0.27

<sup>a</sup>CON - Controle, sem aditivo alimentar; SAP - saponinas de pó de feno-grego de planta inteira, 16 g/vaca/dia; SAPEO - uma mistura de óleos essenciais naturais, com carvacrol, cinamaldeído e limoneno como componentes majoritários combinados com SAP, 16 g/vaca/dia; MON - Monensina, inclusão dietética de 24 mg/kg de MS de monensina sódica (média de 0,24 g/dia do MON).

<sup>b</sup>Erro padrão da média.

<sup>c</sup>O nível de significância foi estabelecido em 0,05, e as tendências foram consideradas quando  $0,05 < P \leq 0,10$

Maiores concentrações de ácido graxo C18: 1 *cis*-11 (P = 0,01) foram observadas no leite de vacas alimentadas com MON em comparação com o leite daquelas alimentadas com SAP e SAPEO (Tabela 9). No entanto, a concentração de C18:1 *cis*-11 foi

semelhante entre o leite de vacas alimentadas com CON e MON e entre o leite dos animais alimentados com CON, SAP e SAPEO. Uma tendência para aumento nas concentrações de C16:1 cis-7 ( $P = 0,07$ ) e C18:0 ( $P = 0,06$ ) foi observada quando as vacas foram alimentadas com MON e CON, e uma tendência para diminuição foi observada quando os animais foram alimentados com SAP e MON (Tabela 9).

## 5. DISCUSSÕES

### 5.2. Consumo de nutrientes e digestibilidade aparente do trato total

As vacas alimentadas com MON apresentaram menor CMS do que aquelas alimentadas com CON. No entanto, não houve diferença no CMS entre vacas alimentadas com MON e aquelas alimentadas com SAPEO ou SAP. De acordo com Duffield et al. (2008a), a suplementação com MON pode reduzir o CMS em até 2%. Em vacas leiteiras com um balanço energético positivo, a suplementação com MON pode aumentar a energia disponível e diminuir o CMS (TEDESCHI et al., 2003). Essa tendência foi observada no presente estudo, visto que observamos queda de 16% no CMS, sem efeito na produção de leite, quando as vacas foram alimentadas com MON em comparação com aquelas alimentadas com CON. Embora os tratamentos com aditivos não tenham afetado o CMS das vacas, houve uma redução de aproximadamente 13% no CMS de vacas alimentadas com MON em comparação com aquelas alimentadas com tratamentos contendo extratos vegetais (SAPEO e SAP).

Há uma inconsistência entre os resultados do CMS nas vacas alimentadas com aditivos alimentares e os resultados dos estudos que avaliaram o uso de extratos vegetais na dieta de animais de produção. Em um estudo recente, Patra et al. (2019) mostrou que a suplementação dietética com compostos lipídicos bioativos ricos em mentol, em doses de 80 mg/d a 160 mg/d, influenciaram o comportamento alimentar circadiano de ovinos. Estudos utilizando misturas de óleos essenciais (MOEs) contendo limoneno, timol e eugenol em sua composição apresentaram diferentes respostas. Alguns estudos relataram uma diminuição no CMS (BENCHAAR et al., 2006, 2 g/d; TASSOUL e SHAVER, 2009, 1,2 g/d). Contudo, outros estudos relataram um aumento no CMS (KUNG et al., 2008), 40 e 80 mg/d), enquanto Benchaar et al. (2007) e Vendramini et al. (2016) não relataram mudança no CMS ao alimentar vacas leiteiras com 750 mg/d e 1 g/d de MOEs, respectivamente. No entanto, Silva et al. (2020) relataram que a suplementação com OEs

contendo formas puras de carvacrol, cinamaldeído e eugenol diminui o CMS em vacas leiteiras. Além disso, estudos com vacas leiteiras foram realizados com uma dieta contendo saponinas, e os efeitos no CMS foram semelhantes aos deste estudo (ANANTASOOK et al., 2013). A variação nas respostas sugere que os efeitos dos OEs variam com a dose e o tipo de compostos presentes nos OEs (BENCHAAR et al., 2008a).

Espera-se que as respostas positivas aos aditivos alimentares sejam mais evidentes quando houver uma redução na digestibilidade do componente fibroso e quando o primeiro nutriente limitante da dieta for a energia, como é o caso das vacas no início da lactação (BEAUCHEMIN et al., 2003). Os tratamentos não influenciaram a digestibilidade aparente da FDN. Além disso, é imprescindível mencionar que as vacas neste estudo estavam no período médio-final da lactação, portanto, em balanço energético positivo. Em estudos anteriores, nenhum efeito do óleo essencial na digestibilidade do trato total foi relatado quando vacas leiteiras foram suplementadas com folhas de orégano ricas em carvacrol (TEKIPPE et al., 2011) ou com uma mistura de cinamaldeído e eugenol (TAGER e KRAUSE, 2011). Holtshausen et al., (2009) realizaram um estudo com vacas leiteiras para determinar os efeitos da alimentação com fontes de saponinas (*Yucca schidigera* ou *Quillaja saponaria*) na fermentação ruminal, produção de metano e digestibilidade dos nutrientes do trato total. Da mesma forma, os autores relataram que a digestibilidade aparente dos nutrientes não diferiu entre os tratamentos.

## 5.2. Fermentação ruminal e população bacteriana

Houve uma redução no pH ruminal de vacas alimentadas com SAP e SAPEO em comparação com aquelas alimentadas com CON, mas esta diminuição foi menos pronunciada em vacas alimentadas com MON. A suplementação com monensina aumenta o pH ruminal devido a uma inibição de bactérias produtoras de lactato (SURBER e BOWMAN, 1998). No entanto, no presente estudo, foi observado um valor de pH ruminal mais baixo nas vacas alimentadas com MON em comparação com aquelas alimentadas com CON. A variação do pH ruminal está negativamente correlacionada com a concentração total de ácidos graxos de cadeia curta (ALLEN, 1997). Apesar disso, a diminuição do pH ruminal não foi acompanhada por um aumento na concentração total média de ácidos graxos de cadeia curta.

As vacas alimentadas com MON também apresentaram maior concentração de N-NH<sub>3</sub> no fluido ruminal em comparação aos animais alimentados com CON. Este resultado é contrário aos resultados comumente observados com o uso de monensina. Um dos principais mecanismos de ação do MON consiste na inibição de bactérias que desativam proteínas no ambiente ruminal, diminuindo as concentrações ruminiais de NH<sub>3</sub> (SCHELLING, 1984). Assim, a monensina atua degradando os peptídeos em aminoácidos no duodeno, o que melhora a digestibilidade da proteína bruta (MCGUFFEY et al., 2001). O aumento na concentração ruminal de N-NH<sub>3</sub> indica que a MON foi ineficiente em reduzir a produção de amônia no ambiente ruminal. Sugerimos que o aumento nas concentrações de N-NH<sub>3</sub> está relacionado à diminuição no CMS sem quaisquer efeitos na digestibilidade aparente de proteínas. Além disso, a diminuição da amônia ruminal pela monensina poderia estar correlacionada com um aumento da concentração de proteína microbiana (YANG e RUSSELL, 1993). No entanto, os tratamentos não influenciaram a síntese de proteína microbiana no presente estudo.

No estudo atual, houve um aumento na concentração de N-NH<sub>3</sub> de vacas alimentadas com tratamentos contendo aditivos alimentares em comparação com aquelas alimentadas com CON, o que é surpreendente. Estudos realizados *in vitro* (MCINTOSH et al., 2003) e *in vivo* (WALLACE et al., 2002) mostraram efeitos positivos dos OEs na redução da concentração ruminal de N-NH<sub>3</sub>, pela redução da desaminação de aminoácidos. Muitos estudos também mencionam que a diminuição da concentração ruminal de amônia também é um dos principais efeitos das saponinas, o que é atribuído ao seu efeito antiprotozoário (PATRA e SAXENA, 2009). Entretanto, o tratamento com saponinas nem sempre promove uma redução nas concentrações de N-NH<sub>3</sub>, pois seu efeito antiprotozoário pode aumentar a população bacteriana, conforme observado por Hess et al. (2004). Essa inconsistência também pode estar relacionada a um efeito de adaptação de microrganismos ruminiais às saponinas (NEWBOLD et al., 1997) e é suportado pela falta de resposta nos parâmetros de fermentação ruminal. Uma quantidade significativa de NH<sub>3</sub> também pode ser relacionada à capacidade da glicofração de saponinas em ligar-se à NH<sub>3</sub> (MAKKAR e BECKER, 1997). O maior nível de proteína no leite pode apoiar esta hipótese, pois manter a amônia ruminal adequada poderia aumentar a proteína microbiana e a transferência de N para o leite.

Os óleos essenciais e seus componentes bioativos podem afetar a produção total de AGV de uma maneira dependente da dose. Em estudo *in vitro*, Castillejos et al. (2007) relataram mudanças na concentração total de AGV com uma mistura de OEs contendo

timol e limoneno como principais compostos ativos, em doses de 5 mg/L. No entanto, em doses mais altas (50 e 500 mg/L), nenhum efeito dos OEs foi relatado na produção e proporção de ácidos graxos voláteis. Da mesma forma, os efeitos das saponinas na fermentação ruminal são contrastantes e geralmente são dependentes da dosagem utilizada nas dietas e da sua composição (PATRA e SAXENA, 2009). Maiores concentrações de propionato com a suplementação de saponina pode ser mais pronunciada em animais alimentados com uma dieta rica em grãos (DEVANT et al., 2007) em comparação com aqueles alimentados com dietas de alta forragem (HESS et al., 2004), possivelmente devido ao pH ruminal.

O aumento das concentrações de butirato no tratamento com SAPEO pode estar associado ao efeito do carvacrol. Busquet et al. (2006) conduziram um estudo *in vitro* e observaram que doses de 300 mg/L de carvacrol resultaram em um aumento nas concentrações de butirato.

Embora a monensina tenha sido mais eficaz na redução da população de *F. succinogenes*, bactéria que produz acetato, os animais alimentados com MON não mostraram diferença na concentração de acetato no rúmen e na produção de metano em comparação com outros tratamentos. Este resultado não é consistente com outros estudos realizados anteriormente, uma vez que o modo de ação da monensina afeta bactérias gram-positivas. Goel et al. (2008), em estudo *in vitro*, afirmaram que saponinas de fenogrego podem modificar a comunidade microbiana em direção à proliferação de bactérias degradadoras de fibras. No entanto, não observamos esse efeito no estudo atual, realizado *in vivo*.

### 5.3. Balanço de nitrogênio, síntese de proteína microbiana e utilização de energia

Não houve efeito da dieta na utilização de N e na síntese de N microbiano em vacas no presente estudo. Esses resultados podem ser justificados pela similaridade observada na digestibilidade da proteína bruta entre os animais alimentados com CON e aqueles alimentados com dietas com aditivos. Da mesma maneira, estudos anteriores não relataram efeitos de síntese de N microbiano quando os animais foram alimentados com dietas contendo OE ou MON (VENDRAMINI et al., 2016; YANG et al., 2007). As vacas alimentadas com SAPEO apresentaram maior eficiência (leite NEL / DE consumido) do que os animais alimentados com CON e SAP. Esse resultado indica um melhor

aproveitamento de energia quando os OEs foram associados às saponinas nas dietas das vacas.

#### 5.4. Metabólitos sanguíneos

Os resultados dos parâmetros sanguíneos são consistentes com os da literatura. Em geral, não houve efeito da inclusão de aditivos alimentares sobre esses parâmetros, exceto para a diminuição observada na concentração de ureia plasmática em vacas alimentadas com SAP e SAPEO. Em um estudo de análise de regressão, Kennedy e Milligan (1980) mostraram que a concentração de ureia no plasma está positivamente associada à reciclagem de ureia e, por sua vez, é negativamente correlacionada à concentração de N-NH<sub>3</sub> no rúmen.

Saponinas presentes em extratos de plantas podem aumentar a disponibilidade de nitrogênio ruminal e a síntese de proteína microbiana (BENCHAAAR et al., 2006). A maior transferência de nitrogênio para o leite apoia a hipótese de que as saponinas podem aumentar a retenção de amônia no rúmen.

A alimentação com SAPEO também aumentou a concentração de albumina sérica. No entanto, nenhuma diferença foi observada no consumo e digestibilidade de PB entre vacas alimentadas com SAPEO e aquelas alimentadas com outros tratamentos. A albumina pode ser considerada um parâmetro que serve como um indicador do status da proteína dos animais (GONZÁLEZ, 2000). No entanto, de acordo com Payne e Payne (1987), a albumina deve ser considerada um indicador do estado de proteína dos animais em longo prazo, sendo necessário um mês para detectar mudanças significativas devido à baixa taxa de síntese e degradação.

#### 5.5. Produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite

Os tratamentos não influenciaram a produção de leite. No entanto, o leite de vacas alimentadas com o tratamento SAPEO apresentou maiores níveis de gordura e proteína do que o de vacas alimentadas com MON. O aumento da concentração de gordura no leite de vacas alimentadas com SAPEO pode estar relacionado com o aumento da produção ruminal de butirato. Este resultado pode estar associado ao metabolismo do butirato no epitélio ruminal, para a formação de beta-hidroxibutirato e seu uso para sintetizar ácidos graxos no tecido adiposo e na glândula mamária (BERGMAN, 1990)

Embora vacas alimentadas com SAPEO tenham maior consumo de FDN do que aquelas alimentadas com MON, nenhuma diferença foi observada no CMS e na digestibilidade da fibra entre esses grupos. Duffield et al. (2008a) relataram que a monensina reduziu as concentrações de gordura e proteína no leite. No entanto, no presente estudo, não podemos confirmar a ausência de efeitos dos aditivos alimentares na produção de leite porque um quadrado latino experimental o projeto com períodos de 21 dias não é o projeto mais adequado para avaliar o desempenho animal (VENDRAMINI et al., 2016).

Os extratos vegetais avaliados nos tratamentos SAPEO e SAP não alteraram o perfil de ácidos graxos (FA) do leite comparado com o tratamento CON. No entanto, suplementar vacas com MON promoveu mudanças em algumas proporções de AG na gordura do leite em comparação com outros tratamentos. Os ionóforos têm atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, e este efeito está associado ao fato de que os ionóforos estão envolvidos na biohidrogenação ruminal de ácidos graxos insaturados (BAUMAN et al., 1999).

Uma diminuição no CMS foi observada junto com o teor de gordura do leite de vacas alimentadas com MON. Concentrações mais baixas de ácidos graxos saturados, como C4, C6 e C8, também foram observados, bem como um aumento da concentração do ácido graxo insaturado C18: 1-cis11. Odongo et al. (2007a) avaliaram a MON em vacas e observaram aumento nos ácidos graxos insaturados do leite. Os autores sugeriram que este aditivo foi parcialmente eficaz na inibição da biohidrogenação ruminal. De acordo com Fellner et al., (1997), o presente estudo verificou que a monensina pode afetar a biohidrogenação ruminal.

## 5. CONCLUSÃO

A monensina reduziu a ingestão de nutrientes para uma via mais eficiente energeticamente, mas não alterou a produção de leite, digestibilidade ou fermentação ruminal. A associação de saponinas e OE pode exercer um efeito sinérgico no rúmen melhorando a qualidade do leite, gordura, e proteína em vacas Jersey em lactação em comparação com a monensina. Em contraste, as saponinas isoladas podem promover a transferência de nitrogênio para o leite através da retenção de amônia no rúmen. Um ensaio em maior escala avaliaria melhor o efeito desta associação sobre a eficiência de produção de leite.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, M. S. Relationship between Fermentation Acid Production in the Rumen and the Requirement for Physically Effective Fiber. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 7, p. 1447–1462, 1997.

ANANTASOOK, N. et al. Effect of plants containing secondary compounds with palm oil on feed intake, digestibility, microbial protein synthesis and microbial population in dairy cows. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 26, n. 6, p. 820–826, 2013.

ANANTASOOK, N. et al. Effect of tannins and saponins in *Samanea saman* on rumen environment, milk yield and milk composition in lactating dairy cows. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 99, n. 2, p. 335–344, 2015.

BAGG, R. et al. Milk residues and performance of lactating dairy cows administered high doses of monensin. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 3, p. 180–185, 2005.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, fev. 2008.

BALANDRIN, M. et al. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. **Science**, v. 228, n. 4704, p. 1154–1160, 7 jun. 1985.

BAUMAN, D.E., BAUMGARD, L.H., CORL, B.A., GRINARI, D.J., 1999.

Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. In: Proceedings of the American Society of **Animal Science Meeting**. pp. 1–15

BEAUCHEMIN, K.A., COLOMBATTO, D., MORGAVI, D.P., YANG, W.Z., 2003.

Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **J. Anim. Sci.** 81, E37–E47.

BENCHAAR, C. et al. 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, n. 11, p. 4352–4364, 2006.

BENCHAAR, C. et al. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 886–897, 2007.

BENCHAAR, C. et al. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, n. 1–4, p. 209–228, 2008b.

BENCHAAR, C. Diet supplementation with cinnamon oil, cinnamaldehyde, or monensin does not reduce enteric methane production of dairy cows. **Animal**, v. 10, n. 3, p. 418–425, 2015.

BENCHAAR, C. Feeding oregano oil and its main component carvacrol does not affect ruminal fermentation, nutrient utilization, methane emissions, milk production, or milk fatty acid composition of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 2, p. 1516–1527, 2020.

BENCHAAR, C.; GREATHEAD, H. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 166–167, p. 338–355, 2011.

BENCHAAR, C.; MCALLISTER, T. A.; CHOUINARD, P. Y. Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or *Yucca schidigera* saponin extracts. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 12, p. 4765–4777, 2008a.

BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, v. 70, n. 2, p. 567–590, 1 abr. 1990.

BLANCH, M. et al. Influence of a mixture of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen fermentation, feeding behavior and performance of lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 219, p. 313–323, 2016.

BODAS, R. et al. In vitro screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, n. 1–4, p. 245–258, 2008.

BODAS, R. et al. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, n. 1–4, p. 78–93, 2012.

BRODERICK, G. A. Effect of Low Level Monensin Supplementation on the Production of Dairy Cows Fed Alfalfa Silage. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 2, p. 359–368, fev. 2004.

- 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. et al. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 2, p. 761–771, 2006.
- CALSAMIGLIA, S. et al. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 6, p. 2580–2595, 2007.
- CARDOZO, P. W. et al. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 11, p. 2572–2579, 2005.
- CASALI, A. O. et al. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos in situ. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 2, p. 335–342, fev. 2008.
- CASTILLEJOS, L. et al. Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 132, n. 3–4, p. 186–201, 2007.
- CHAO, S. C. ; YOUNG, D. G. ; OBERG, C. J. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, n. No.5, p. 639–649, 2000.
- CHEN, X.B., GOMES, M.J., 1992. Estimation of Microbial Protein Supply to Sheep and Cattle Based on Urinary Excretion of Purine Derivatives - An Overview of the Technical Details. Occasional Publication. **International Feed Resources Unit**, Rowett Research Institute, Aberdeen, UK.
- CHIZZOTTI, M. L. et al. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. **Livestock Science**, v. 113, n. 2–3, p. 218–225, fev. 2008.
- COSENTINO, S. et al. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 130–135, 1999.

DAIRY RECORDS MANAGEMENT SYSTEMS (DHI Glossary), 2014.  
<http://www.drms.org/PDF/materials/glossary.pdf> (accessed 21 June 2014).

DEMATTE FILHO, L. Aditivos em dietas para frangos de corte criados em sistema alternativo. **Aleph**, p. 19–22, 2004.

DEVANT, M.; ANGLADA, A.; BACH, A. Effects of plant extract supplementation on rumen fermentation and metabolism in young Holstein bulls consuming high levels of concentrate. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 1–2, p. 46–57, set. 2007.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308–316, 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, n. 4, p. 1347–1360, 2008a.

DUFFIELD, T. F.; RABIEE, A. R.; LEAN, I. J. A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 1. Metabolic effects. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 4, p. 1334–1346, 2008b.

EIFERT, E. DA C. et al. Efeitos do fornecimento de monensina e óleo de soja na dieta sobre o desempenho de vacas leiteiras na fase inicial da lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2123–2132, dez. 2005.

FELLNER, V.; SAUER, F. D.; KRAMER, J. K. G. Effect of Nigericin, Monensin, and Tetronasin on Biohydrogenation in Continuous Flow-Through Ruminal Fermenters. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 5, p. 921–928, 1997.

FERREIRA DE JESUS, E. et al. Influence of a blend of functional oils or monensin on nutrient intake and digestibility, ruminal fermentation and milk production of dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 219, p. 59–67, 2016.

FRANCIS, G. et al. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. 6, p. 587–605, 2002.

GANDRA, J. R. Avaliação do uso de monensina sódica em rações de vacas leiteiras: desempenho produtivo e resíduos no leite. p. 93, 2009.

GANDRA, J. R. et al. 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, ago. 2010.

GANDRA, J. R. et al. Nutrients balances and milk fatty acid profile of mid lactation dairy cows supplemented with monensin. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 4, p. 1180–1196, dez. 2012.

GARCÍA-GARCÍA, R.; LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E. Bactericidal Action of Binary and Ternary Mixtures of Carvacrol, Thymol, and Eugenol against *Listeria innocua*. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. 95–100, 2011.

GOEL, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Effects of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* leaves and Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrients from roughage- and concentrate-based feeds to methane. **Animal Feed Science and Technology**, v. 147, n. 1–3, p. 72–89, nov. 2008.

GONZÁLEZ, F.H.D., 2000. Uso de perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: González, F.H.D., Barcellos, J.O., Ospina, H., Ribeiro, L.A.O. (Eds.), *Perfil Metabólico Em Ruminantes: Seu Uso Em Nutrição E Doenças Nutricionais*. pp. 63–74. Porto Alegre.

GUNUN, P. et al. Effects of *Antidesma thwaitesianum* Muell. Arg. pomace as a source of plant secondary compounds on digestibility, rumen environment, hematology, and milk production in dairy cows. **Animal Science Journal**, v. 90, n. 3, p. 372–381, 2019.

GUO, Y. Q. et al. Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene, in cultures of rumen micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 421–426, 2008.

GUYADER, J. et al. Tea saponin reduced methanogenesis in vitro but increased methane yield in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 3, p. 1845–1855, 2017.

HALL, M.B., 2000. Calculation of Non-structural Carbohydrate Content of Feeds That Contain Non-protein Nitrogen. Bulletin 339. **University of Florida**, pp. 1–25.

HANEY, M. E., J. AND M. M. H. Monensin, a new biologically active compound. **Antimicrobial Agents and Chemother.**, p. 349, 1967.

HAUSMANN, Janis et al. Effects of a combination of plant bioactive lipid compounds

and biotin compared with monensin on body condition, energy metabolism and milk performance in transition dairy cows. **PloS one**, v. 13, n. 3, p. e0193685, 2018.

HESS, H. D. et al. Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. **Animal Feed Science and Technology**, v. 109, n. 1–4, p. 79–94, 2003.

HESS, H. D. et al. Ruminant fermentation, methanogenesis and nitrogen utilization of sheep receiving tropical grass hay-concentrate diets offered with *Sapindus saponaria* fruits and *Cratylia argentea* foliage. **Animal Science**, v. 79, n. 1, p. 177–189, 2004.

HOLTSHAUSEN, L. et al. Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 6, p. 2809–2821, 2009.

HRISTOV, A. N. et al. Effect of *Origanum vulgare* L. leaves on rumen fermentation, production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 2, p. 1189–1202, 2013.

HU, W.-L. et al. Effect of tea saponin on rumen fermentation in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, v. 120, n. 3–4, p. 333–339, maio 2005.

IPHARRAGUERRE, I. R.; CLARK, J. H. Usefulness of ionophores for lactating dairy cows: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 106, n. 1–4, p. 39–57, abr. 2003.

JAMES B. RUSSELL. A Proposed Mechanism of Monensin Action in Inhibiting Ruminant Bacterial Growth: Effects on Ion Flux and Protonmotive Force. **Journal of Animal Science**, v. 64, n. 5, p. 1519–1525, 1987.

JOUANY, J.-P. Effect of Rumen Protozoa on Nitrogen Utilization by Ruminants. **The Journal of Nutrition**, v. 126, n. suppl\_4, p. 1335S-1346S, 1 abr. 1996.

KENNEDY, P. M.; MILLIGAN, L. P. THE DEGRADATION AND UTILIZATION OF ENDOGENOUS UREA IN THE GASTROINTESTINAL TRACT OF RUMINANTS: A REVIEW. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 60, n. 2, p. 205–221, 1 jun. 1980.

KHIAOSA-ARD, R.; ZEBELI, Q. Meta-analysis of the effects of essential oils and their bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in

ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 4, p. 1819–1830, 2013.

KIM, M.; EASTRIDGE, M. L.; YU, Z. Investigation of ruminal bacterial diversity in dairy cattle fed supplementary monensin alone and in combination with fat, using pyrosequencing analysis. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 65–71, 2014.

KOIKE, S.; KOBAYASHI, Y. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, n. 2, p. 361–366, nov. 2001.

KOLLING, G. J. et al. Performance and methane emissions in dairy cows fed oregano and green tea extracts as feed additives. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 4221–4234, 2018.

KRAMER, J. K. G. et al. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. **Lipids**, v. 32, n. 11, p. 1219–1228, nov. 1997.

KUNG, L. et al. 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, n. 12, p. 4793–4800, 2008.

L. F. RICHARDSON, A. P. RAUN, E. L. POTTER, C. O. COOLEY, R. P. R. Effect of Monensin on Rumen Fermentation in Vitro and in Vivo. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 3, p. 657–664, 1976.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Degradation of quillaja saponins by mixed culture of rumen microbes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 243–245, set. 1997.

MAO, H. L. et al. Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. **Livestock Science**, v. 129, n. 1–3, p. 56–62, 2010.

MARTINEAU, R. et al. Effects of lasalocid or monensin supplementation on digestion,

ruminal fermentation, blood metabolites, and milk production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 12, p. 5714–5725, 2007.

MCGUFFEY, R. K.; RICHARDSON, L. F.; WILKINSON, J. I. D. Ionophores for Dairy Cattle: Current Status and Future Outlook. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. E194–E203, 2001.

MCINTOSH, F. M. et al. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 5011–5014, 2003.

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

MOSS, A. R.; JOUANY, J.-P.; NEWBOLD, J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annales de Zootechnie**, v. 49, n. 3, p. 231–253, maio 2000.

NAGARAJA, T. G.; NEWBOLD, C.J; VAN NEVEL, C.J; DERMEYER, D. . Manipulation of ruminal fermentation. In: **The Rumen Microbial Ecosystem**. [s.l.] Springer, Dordrecht, 1997. p. 523–632.

NEWBOLD, C. . et al. Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. **British Journal of Nutrition**, v. 78, n. 2, p. 237–249, 1997.

NEWBOLD, C. J. et al. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. **Animal feed science and technology**, v. 114, n. 1-4, p. 105-112, 2004.

ODONGO, N. E. et al. Long-term effects of feeding monensin on milk fatty acid composition in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 11, p. 5126–5133, 2007a.

ODONGO, N. E. et al. Long-term effects of feeding monensin on methane production in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 4, p. 1781–1788, 2007b.

OH, J. et al. Effects of phytonutrients alone or in combination with monensin on productivity in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 8, p. 7190-7198, 2018.

- ORELLANA BOERO, P. et al. Excretion of purine derivatives in cows: endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. **Livestock Production Science**, v. 68, n. 2–3, p. 243–250, mar. 2001.
- PATRA, A. K. et al. Dietary supplementation of menthol-rich bioactive lipid compounds alters circadian eating behaviour of sheep. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p. 352, 21 dez. 2019.
- PATRA, A. K.; SAXENA, J. The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. **Nutrition Research Reviews**, v. 22, n. 2, p. 204–219, 2009.
- PATRA, Amlan K. et al. Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 6, n. 5, p. 416–428, 2011.
- PATRA, A. K.; YU, Z. Effects of garlic oil, nitrate, saponin and their combinations supplemented to different substrates on in vitro fermentation, ruminal methanogenesis, and abundance and diversity of microbial populations. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 1, p. 127–138, 2015.
- PAYNE, J.M., PAYNE, S., 1987. *The Metabolic Profile Test*. Oxford University Press.
- PHIPPS, R. H. et al. Effect of monensin on milk production of Holstein-Friesian dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 12, p. 2789–2794, 2000.
- PLAIZIER, J. C. et al. Effect of a prepartum administration of monensin in a controlled-release capsule on apparent digestibilities and nitrogen utilization in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 12, p. 2918–2925, 2000.
- RANGA NIROSHAN APPUHAMY, J. A. D. et al. Anti-methanogenic effects of monensin in dairy and beef cattle: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 8, p. 5161–5173, 2013.
- RUIZ, R. et al. Effect of Monensin on the Performance and Nitrogen Utilization of Lactating Dairy Cows Consuming Fresh Forage. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 7, p. 1717–1727, jul. 2001.
- RUSSEL, J. B.; STROBEL, H. J. Effect of lonophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 1–6, 1989.

- SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W., 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. third ed. **Cold Spring Harbor Press**, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- SANTOS, M. B. et al. Effects of addition of an essential oil complex to the diet of lactating dairy cows on whole tract digestion of nutrients and productive performance. **Animal Feed Science and Technology**, v. 157, n. 1–2, p. 64–71, 2010.
- SANTOS, M. C. B. et al. Effects of increasing monensin doses on performance of mid-lactating Holstein cows. **Journal of Applied Animal Research**, v. 47, n. 1, p. 297–302, 2019.
- SCHELLING, G. T. Monensin Mode of Action in the Rumen. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 6, p. 1518, 1984.
- SILVA, R. B. DA et al. A blend of essential oils improved feed efficiency and affected ruminal and systemic variables of dairy cows. **Translational Animal Science**, v. 4, n. 1, p. 182–193, 2020.
- SILVA, G. G. et al. Nutrient digestibility, ruminal fermentation, and milk yield in dairy cows fed a blend of essential oils and amylase. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 11, p. 9815–9826, 2018.
- SKLAN, D. et al. Fatty Acids, Calcium Soaps of Fatty Acids, and Cottonseeds Fed to High Yielding Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 9, p. 2463–2472, set. 1992.
- SOLIVA, C. R. et al. Ruminal methane inhibition potential of various pure compounds in comparison with garlic oil as determined with a rumen simulation technique (Rusitec). **British Journal of Nutrition**, v. 106, n. 1, p. 114–122, 14 jul. 2011.
- STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J. Dominance of Prevotella and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 165–174, 1 maio 2007.
- SURBER, L. M.; BOWMAN, J. G. Monensin effects on digestion of corn or barley high-concentrate diets. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 7, p. 1945, 1998.
- SZUMACHER-STRABEL, M.; CIEŚLAK, A. Potential of phytofactors to mitigate rumen ammonia and methane production. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 19, n. 3, p. 319–337, 16 ago. 2010.

TAGER, L. R.; KRAUSE, K. M. Effects of essential oils on rumen fermentation, milk production, and feeding behavior in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2455–2464, 2011.

TAIZ; ZIEGER. Energia e enzimas. **Fisiologia Vegetal**, p. 21, 2004.

TAJIMA, K. et al. Diet-Dependent Shifts in the Bacterial Population of the Rumen Revealed with Real-Time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2766–2774, 1 jun. 2001.

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, n. 4, p. 1734–1740, 2009.

TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G.; TYLUTKI, T. P. Potential Environmental Benefits of Ionophores in Ruminant Diets. **Journal of Environmental Quality**, v. 32, n. 5, p. 1591–1602, set. 2003.

TEKIPPE, J. A. et al. Rumen fermentation and production effects of *Origanum vulgare* L. leaves in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 10, p. 5065–5079, 2011.

VALADARES, R. F. D. et al. Effect of Replacing Alfalfa Silage with High Moisture Corn on Ruminal Protein Synthesis Estimated from Excretion of Total Purine Derivatives. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 12, p. 2686–2696, dez. 1999.

VAN DER WERF, J. H. J.; JONKER, L. J.; OLDENBROEK, J. K. Effect of Monensin on Milk Production by Holstein and Jersey Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 2, p. 427–433, fev. 1998.

VENDRAMINI, T. H. A. et al. Effects of a blend of essential oils, chitosan or monensin on nutrient intake and digestibility of lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 214, p. 12–21, 2016.

WALL, E. H. et al. The effects of supplementation with a blend of cinnamaldehyde and eugenol on feed intake and milk production of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 9, p. 5709–5717, 2014.

WALLACE, R. J. et al. Natural products as manipulators of rumen fermentation. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 15, n. 10, p. 1458–1468, 2002.

- WALLACE, R. J. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, n. 4, p. 621–629, 2004.
- WANG, B. et al. Effect of tea saponins on milk performance, milk fatty acids, and immune function in dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 10, p. 8043–8052, 2017.
- WANG, B. et al. Saponin-induced shifts in the rumen microbiome and metabolome of young cattle. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. FEB, p. 1–14, 2019.
- WEISS, W. P.; CONRAD, H. R.; ST. PIERRE, N. R. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. **Animal Feed Science and Technology**, v. 39, n. 1–2, p. 95–110, nov. 1992.
- WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production - A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 21, p. 8093–8105, 2005.
- YANG, C. M.; RUSSELL, J. B. The effect of monensin supplementation on ruminal ammonia accumulation in vivo and the numbers of amino acid-fermenting bacteria. **Journal of animal science**, v. 71, n. 12, p. 3470–3476, 1993.
- YANG, W. Z. et al. Effects of garlic and juniper berry essential oils on ruminal fermentation and on the site and extent of digestion in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 12, p. 5671–5681, 2007.
- YANG, Wen Zhu; HE, Mao Long. Effects of feeding garlic and juniper berry essential oils on milk fatty acid composition of dairy cows. **Nutrition and metabolic insights**, v. 9, p. NMI. S33395, 2016.
- ZHOU, Y. Y. et al. Inhibition of rumen methanogenesis by tea saponins with reference to fermentation pattern and microbial communities in Hu sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 166–167, p. 93–100, 2011.