



DOUGLAS VINÍCIUS LAGE DUARTE

**Feed efficiency of dairy cows fed amylase with monensin or a
blend of essential oils**

LAVRAS – MG

2017

DOUGLAS VINÍCIUS LAGE DUARTE

Feed efficiency of dairy cows fed amylase with monensin or a blend of essential oils

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Marcos Neves Pereira

LAVRAS – MG

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Duarte, Douglas Vinícius Lage.

Feed efficiency of dairy cows fed amylase with monensin or a
blend of essential oils / Douglas Vinícius Lage Duarte. – Lavras :
UFLA, 2017.

106 p. : il.

Orientador(a): Marcos Neves Pereira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Vacas Leiteiras. 2. Nutrição. 3. Aditivos. I. Pereira, Marcos.
II. Universidade Federal de Lavras.

DOUGLAS VINÍCIUS LAGE DUARTE

Feed efficiency of dairy cows fed amylase with monensin or a blend of essential oils

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de Março de 2017

Dr^a. Renata Apocalypse Nogueira Pereira –Epamig Sul- BIP FAPEMIG

Dr^a. Carla Luiza da Silva Ávila - DXO/UFLA

Orientador

Ptof. Marcos Neves Pereira

LAVRAS – MG

2017

*À minha mãe, Vera,
Ao meu pai, Cleber,
e
Ao meu irmão, Paulo*

DEDICO

*“Mas graças a Deus, que nos dá a vitória por meio de nosso Senhor Jesus Cristo.
Portanto, meus amados irmãos, mantenham-se firmes, e que nada os abale. Sejam
sempre dedicados à obra do Senhor, pois vocês sabem que, no Senhor, o trabalho de
vocês não será inútil.” (Coríntios 15:57-58)*

AGRADECIMENTOS

À minha família, que é a minha base. São meus exemplos de força, dedicação, persistência e, sobretudo, honestidade.

Ao Grupo do leite por ter me acolhido e ser a minha família em Lavras. Junto aos membros desse grupo eu realizei esse trabalho, sempre com muita amizade e companheirismo.

Aos bolsistas de iniciação científica do Grupo do Leite, em especial, Jenifer e Cecília.

À Renata pela disponibilidade e tempo despendidos durante esses 2 anos para me ajudar, amparar e dar os melhores conselhos.

Ao professor Marcos Neves pela orientação e transmissão de conhecimento.

À professora Carla Luiza pelos conhecimentos transmitidos em aula e pela participação na banca examinadora.

Ao Bocão, bem mais que um colega de pós graduação, foi um irmão que me ensinou inúmeras coisas sobre vaca e sobre a vida.

Aos colegas e amigos de pós graduação, Izabela Ribeiro, Fabiana Cardoso, Naina Lopes, Eugênio Faria, Julia Dias, Karina Toledo, Rayana Brito, Letícia Resende, Josiane Santos e Ricardo Peixoto com todos aprendi alguma coisa e muito contribuíram na conclusão dessa fase.

Aos amigos feitos em Lavras. Em especial ao Kaique por toda compreensão, amizade e companheirismo.

À fazenda São Francisco e seus funcionários, Carlos, Sebastião, Josi e Geraldo que foram peças fundamentais para a realização do experimento e por serem exemplo de pessoas retas e lutadoras.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado, que sem ela seria impossível a realização do Mestrado

À Universidade Federal de Lavras e Programa de Pós-Graduação em Zootecnia e a todos os seus professores, pela possibilidade da realização deste curso e pela formação científica a mim oferecida.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO GERAL

Amilase e Óleos Essenciais são aditivos para vacas leiteiras que aumentam a fermentação e a saúde ruminal nesses animais. Os objetivos com essa pesquisa foi avaliar a resposta de vacas leiteiras à suplementação com uma amilase exógena em uma dieta basal contendo monensina e avaliar a substituição de monensina por uma mistura de óleos essenciais em dieta contendo amilase exógena. Utilizou-se 30 vacas da raça Holandês (DEL 207± 100 d). As vacas receberam uma dieta de padronização durante 14 dias. Ao final desse período foram blocadas de acordo com a paridade e produção de leite e foram alocadas aleatoriamente em três tratamentos por um período de comparação de 56 dias em um desenho experimental de casualizado ajustado à covariável com medidas repetidas ao longo do tempo. Os tratamentos foram: monensina (M, 15 mg/kg of DM), monensina + amilase exógena (MA, 15 mg monensina/kg de MS + Ronozyme RumiStar®, 375 KNU/kg de MS) e óleos essenciais + amilase (EA, Crina®, 50 mg/kg de MS, uma mistura composta por Timol, guaiacol, eugenol, vanillina, e Limoneno + Ronozyme RumiStar®, 375 KNU/kg de MS). O período de comparação foi dividido em dois com 28 dias cada. No primeiro a dieta continha milho moído reidratado e ensilado (REC) e no segundo foi substituído por milho maduro moído fino (FGC) O efeito fixo da dieta e a interação do tratamento e da dieta foram analisados como medidas repetidas ao longo do tempo com dados obtidos nas semanas 4 e 8, representando dietas REC e FGC, respectivamente e para todas as variáveis foram testados dois contrastes: M vs MA e MA vs EA. Produção de leite e CMS não foram diferentes entre os tratamentos. A substituição de M por OE reduziu a secreção de gordura em 99.5 g/d (P = 0.04). A suplementação com amilase tendeu a aumentar as duas medidas de eficiência alimentar (Leite/CMS e LeiteE/CMS) quando associado a M. Amilase tendeu a reduzir NUL (P = 0.06) e também tendeu a diminuir a proporção de Butirato no AGV total no líquido ruminal. O tratamento MA aumentou em 3,1% a ingestão diária de MS no período da manhã quando comparada com o M (P = 0.08), e diminuiu 4,2% no período da tarde (P=0.07), os animais desse tratamento tiveram maior preferência por dietas com tamanho de partícula (>19 mm). No tratamento EA, a taxa de mastigação foi 55 minutos por dia a menos que no MA. A adição de amilase em dietas contendo M aumenta a eficiência alimentar em vacas leiteiras mas a substituição de monensina por óleos essenciais elimina o efeito positivo da amilase.

Palavras-chave: Amilase. Óleos Essenciais. Ionóforos. Eficiência Alimentar.

GENERAL ABSTRACT

Amylases and essential oils are additives of dairy cows that improve fermentation and ruminal health in dairy cows. The objectives of this study were to evaluate the response of dairy cows to supplementation with an exogenous amylase in a basal diet containing monensin (MON) varying in ruminal acidogenic capacity, and to evaluate the substitution of monensin by a blend of essential oils (EO, Crina Ruminants, DSM) in a diet containing AM Thirty Holstein cows (207 ± 100 DIM) were individually fed a standard TMR for two weeks. At the end of the standardization period, cows were blocked based on parity and milk yield and were randomly allocated to one of three treatments in eight weeks of comparison period. Treatments were MON (M 15 mg/kg of DM), MON plus AMY (MA, 15 mg/kg of DM plus Ronozyme RumiStar, 375 KNU/kg of DM), and EO plus amylase (EA, 50 mg/kg of DM plus Ronozyme RumiStar, 375 KNU/kg of DM). Two diets were fed in sequence during the comparison period. A diet containing rehydrated and ensiled finely ground mature corn and finely ground mature corn was fed during weeks one to four (REC) and another diet formulated only with finely ground mature corn was fed during weeks five to eight (FGC). For all variables, two contrasts were tested: M vs. MA and MA vs. EA. Milk production and dry matter intake were not different between treatments. The substitution to MON by EO reduced milk fat yield (1.208 vs. 1.109 kg/d). Did not affect MUN in cows fed MA compared with M in REC diets (18.1 vs. 18.2 mg/dL), but decreased in FGC diets (20.3 vs. 22.6 mg/dL). The amylase supplementation tended to increase feed efficiency Milk/DMI and ECM/DMI when associated to M (1.59 vs. 1.55 and 1.59 vs. 1.51), however, the supplementation of amylase associated to EO decreased compared to MA (1.54 vs. 1.59 and 1.48 vs. 1.59). The treatment EA increased the proportion of butyrate in reticular fluid compared with MA (10.3 vs. 9.6 % of total VFA). When MA was fed in REC diets it did not affect rumen pH compared with M alone (6.53 vs. 6.49), and decreased in FGC diets (6.57 vs. 7.09). The amylase tended to increase the proportion of daily intake in the morning and to reduce the proportion of daily intake in the afternoon. Cows fed EA reduced chewing by 55 min/d compared with MA. The Addition of amylase increased feed efficiency in dairy cows only when fed with MON, the EO eliminated the positive effect of amylase.

Keywords: amylase, essential oils, ionophores, feed efficiency, reconstituted corn.

LISTA DE TABELAS

Table 1. Composition and particle size of diets containing rehydrated and ensiled finely ground mature corn fed during weeks 1 to 4 or weeks 5 to 8 on treatments monensin (M), monensin plus amylase (MA), and essential oils plus amylase (EA) (% of DM)	96
Table 2. Intake, lactation performance, MUN, feed efficiency, BW, BCS, and subcutaneous fat thickness (SFT) during the 56 d of the comparison period on treatments monensin (M), monensin plus amylase (MA), and essential oils plus amylase (EA).....	97
Table 3. Intake, digestible OM intake (DOMI), lactation performance, MUN, feed efficiency, BW, BCS, and subcutaneous fat thickness (SFT) during weeks 4 and 8 on treatments monensin (M), monensin plus amylase (MA), and essential oils plus amylase (EA)	98
Table 4. Ruminal molar proportion of VFA, protozoa concentration, and pH, and plasma D-lactate concentration during weeks 4 and 8 on treatments monensin (M), monensin plus amylase (MA), and essential oils plus amylase (EA).....	99
Table 5. Total tract apparent digestibility of DM DMD, OM, starch, and NDF, plasma glucose concentration, urinary allantoin excretion, allantoin over digestible OM intake (DOMI), and fecal guanine during weeks 4 and 8 on treatments monensin (MO), monensin plus amylase (MA), and essential oils plus amylase (EA).....	100
Table 6. Starch, NDF, and particle size sorting behaviors (Observed/Predicted. < 100 % is rejection, > 100 % is preferential intake, = 100 % is no selection) and daily refusal as a proportion of feed offered during weeks 4 and 8 on treatments monensin (M), monensin plus amylase (MA), and essential oils plus amylase (EA).....	101
Table 7. Chewing activity and proportion of intake during periods of the day during weeks 4 and 8 on treatments monensin (M), monensin plus amylase (MA), and essential oils plus amylase (EA).....	102
Table 8. Blood urea-N (BUN) at differing hours post-morning feeding during weeks 4 and 8 on treatments monensin (M), monensin plus amylase (MA), and essential oils plus amylase (EA)	103

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1 DIGESTÃO DO AMIDO EM RUMINANTES.....	10
2.2 AMILASE	14
2.2.1 AMILASES EXÓGENAS NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES.....	16
2.3 MONENSINA	21
2.3.1 MECANISMO DE AÇÃO DA MONENSINA	23
2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	25
2.4.1 MECANISMOS DE AÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	28
2.4.2 UTILIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS COMO MANIPULADOR DE FERMENTAÇÃO NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES	29
2.4.3 CRINA RUMINANTS.....	34
2.4.4 CRINA RUMINANTS COMO MODULADOR DE FERMENTAÇÃO.....	39
2.4.5 DESEMPENHO DOS ANIMAIS SUPLEMENTADOS COM CRINA RUMINANTS	42
REFERÊNCIAS	44
2. ARTIGO	61

1 INTRODUÇÃO

A suplementação de vacas em lactação com amilase exógena estável no fluido do ruminal (Klingerman et al., 2009) pode aumentar a digestibilidade ruminal de amido (Nozière et al., 2014), mas pode não aumentar a digestibilidade amido no trato total (Gencoglu et al., 2010; Weiss et al., 2011; Andreazzi, 2014; Nozière et al., 2014), devido à digestão intestinal compensatória. A digestibilidade do FDN do trato total também foi melhorada com a suplementação de amilase exógena (Gencoglu et al., 2010; Weiss et al., 2011), supostamente pelo aumento da disponibilidade ruminal de produtos da hidrólise de amido para bactérias que promovem digestão de fibras (Cotta, 1988; Tricarico et al., 2008).

Os efeitos a longo prazo da suplementação com amilase no desempenho da lactação de vacas leiteiras têm sido controversos. A suplementação com amilase reduziu o CMS e aumentou a produção de leite e a eficiência alimentar de vacas em lactação alimentadas com uma dieta de amido de 32 % durante 9 semanas (Andreazzi, 2014). No entanto, a suplementação com amilase em dieta com 21 % de amido durante 10 semanas aumentou a produção de leite, não teve efeito sobre CMS e tendeu a aumentar a proporção entre produção de leite e CMS (Ferraretto et al., 2011). Gencoglu et al. (2010) observaram redução no CMS, nenhum efeito na produção de leite e aumento na eficiência alimentar quando vacas recebendo dieta com 21 % amido foram suplementadas com amilase por 12 semanas. Weiss et al. (2011) avaliaram a resposta de amilase em vacas em lactação alimentadas com dieta contendo 26% de amido durante 14 semanas e não detectaram respostas na produção de leite, CMS e eficiência alimentar.

Monensina tem sido amplamente utilizada na pecuária leiteira como uma ferramenta para manipular a fermentação ruminal (Ellis et al., 2012) e sua eficácia para vacas leiteiras foi publicada em meta-análise (Ipharraguerre e Clark, 2003, Duffield et al., 2008). A suplementação de MON para vacas leiteiras pode promover o aumento da

eficiência alimentar (Duffield et al., 2008), e é ambientalmente desejável, uma vez que pode reduzir o metano (Appuhamy et al., 2013) e a perda urinária de N (Bergen e Bates, 1984). Monensina também é conhecida por inibir o crescimento da bactéria *Streptococcus bovis* (Russell e Strobel, 1989), desejável quando as vacas leiteiras são alimentadas com dietas com alta capacidade acidogênica ruminal.

Embora a suplementação de vacas leiteiras com MON tenha potencial para ser favorável à saúde e à produtividade dos animais, uma ação preventiva da União Européia proibiu o uso de antibióticos como aditivos para alimentação animal para eliminar o risco de reduzir eficiência de medicamento para humanos (Russell e Houlihan, 2003). Os produtos alternativos, como os óleos essenciais (EO), fazem parte de um extenso grupo de compostos orgânicos derivados do metabolismo secundário de plantas e demonstraram ter ação antimicrobiana contra bactérias, protozoários e fungos (Calsamiglia et al., 2007; Klevenhusen et al., 2012). O uso de EO como aditivo alimentar está de acordo com a tendência natural dos consumidores de produtos lácteos. O EO é um amplo grupo de fitoquímicos e podem ocorrer efeitos aditivos e sinérgicos entre os produtos, aumentando a sua eficácia em comparação com os compostos em forma única (Michiels et al., 2007).

As respostas dos animais aos EO são inconsistentes, uma vez que podem ser influenciadas pela composição da dieta basal, a mistura de produtos químicos complementados, dosagem e estágio fisiológico animal (Khiaosa-Ard e Zebeli, 2013; Wall et al., 2014). A variação entre os EO exclui as generalizações do modo de ação e as comparações diretas entre misturas EO para vacas leiteiras. O Crina® Ruminants é uma mistura patenteada de EO thymol, guaiacol, eugenol, vanilina e limoneno revestido com carboidratos (Rossi, 1999). Os dados *in vitro* mostraram que o Crina pode reduzir a degradação de aminoácidos no rúmen (McIntosh et al., 2003). Tassoul e Shaver (2009) alimentaram vacas leiteiras com Crina de 3 semanas antes do parto a 15 semanas após o parto e observaram menor CMS, não observaram diferenças em produção de leite, e tendência para maior eficiência alimentar e um balanço energético mais negativo no início

da lactação de vacas alimentadas com o Crina quando comparado com o grupo controle. Kung Jr. et al. (2008) observaram aumento no CMS e na produção de leite quando o Crina foi adicionado a dieta de vacas leiteiras durante 9 semanas, mas a eficiência alimentar foi semelhante. A resposta animal ao Crina parece ser variável e requer estudos mais aprofundados.

Os objetivos com este experimento foram avaliar o efeito da suplementação de amilase exógena em dieta contendo MON e da substituição de MON por Crina no perfil de fermentação ruminal, digestibilidade, comportamento mastigatório e ingestivo, e desempenho de vacas leiteiras em meio de lactação em 8 semanas. Nossa hipótese foi que a suplementação de amilase e Crina teriam efeitos positivos sobre a fermentação ruminal e a utilização de nutrientes podendo levar a um melhor desempenho na lactação e eficiência alimentar.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DIGESTÃO DO AMIDO EM RUMINANTES

O milho é o cereal mais utilizado na formulação de dietas para vacas leiteiras. O grão de milho é composto, em média, por 72 % de amido, 9,5 % de proteína, 9 % de fibra e 4 % de óleo (PAES, 2006). Além de ser a principal fonte de energia para os animais, o amido participa de mecanismos importantes no metabolismo dos microrganismos ruminais, pois esses dependem de esqueletos de carbono para a síntese de proteínas (OBA; ALLEN, 2003c).

Os grânulos de amido apresentam uma estrutura cristalina compacta. Em sua constituição básica, possui apenas duas moléculas à base de monômeros de glicose, denominadas amilose e amilopectina. A amilose é um polímero que apresenta 99 % de cadeias lineares de D-glicose ligadas em ligações do tipo α -1,4. Enquanto que a molécula de amilopectina é composta por cadeias lineares de D-glicose com ligações α -1,4 e

ramificações de D-glicose com ligações entre α -1-6 a cada 20 a 25 monômeros de glicose (BULÉON et al., 1998).

Segundo Weber et al. (2009) o amido de milho contém aproximadamente 20 % de amilose e 80 % de amilopectina. A proporção desses compostos se altera de acordo com a variedade e maturidade do milho, o que resulta em maior ou menor digestibilidade. Grãos com maior teor de amilopectina apresentam maior digestibilidade (TESTER et al., 2004).

A natureza do endosperma do amido varia conforme o híbrido. O endosperma com alto conteúdo de prolamina é mais vítreo e quanto maior a proporção desse endosperma no grão de milho, mais lenta a sua degradação ruminal. Por ser hidrofóbica, a matriz de prolamina dificulta a digestão por enzimas microbianas no rúmen (CORREA et al., 2002).

A digestibilidade no trato digestivo total do amido pode chegar a 100% (HUNTINGTON; HARMON; RICHARDS, 2006). Entretanto, a digestibilidade ruminal do amido varia de 50 a 90 % de acordo com o híbrido (MOHARRERY; LARSEN; WEISBJERG, 2014), com a maturidade dos grãos à colheita (PHILIPPEAU, MICHALET-DOREAU, 1997) e com o processamento dos grãos (FERRARETTO; CRUMP; SHAVER, 2013).

O processamento dos grãos por moagem, ensilagem ou tratamento térmico aumenta a velocidade de degradação do amido no rúmen. Na moagem, a redução do tamanho das partículas facilita a hidratação e ação enzimática no rúmen. Na ensilagem, as prolaminas são degradadas por ação do baixo pH somada à ação das enzimas bacterianas envolvidas no processo de ensilagem. Hoffman et al. (2011) encontraram degradação de prolamina em milho ensilado por 240 dias. Bitencourt et al. (2012) observaram tendência de aumento da digestibilidade da matéria orgânica no trato total quando milho moído fino foi substituído por milho reidratado ensilado. A ensilagem aumentou a proporção de amido digerido no rúmen, comparado ao milho moído seco.

Durante o processo de digestão do amido, primeiro este é submetido à fermentação microbiana no rúmen, com produção de ácidos graxos voláteis (AGV) e posteriormente à

digestão enzimática no intestino delgado onde é absorvido. O local e a dimensão da digestão do amido no trato gastrointestinal influencia a eficiência com que é utilizado no metabolismo animal. A alta digestão ruminal do amido pode reduzir o pH ruminal (OBA; ALLEN, 2003bc) e a digestibilidade do amido e da FDN no trato total (FERRARETTO; CRUMP; SHAVER, 2013). O perfil fermentativo ruminal também responde à digestão do amido (EKINCI; BRODERICK, 1997) e, conseqüentemente, afeta o desempenho de vacas leiteiras (OBA; ALLEN, 2003a).

A fermentação ruminal do amido ocorre, principalmente, devido à atuação de bactérias amilolíticas. Há adesão das bactérias nas partículas de grão e essas produzem endo e exo-enzimas que hidrolisam as ligações α (1→4) e α (1→6) da amilose e amilopectina (HUNTINGTON, 1997). Segundo Russel e Rychlik (2001), as principais bactérias que participam deste processo são *Streptococcus bovis*, *Ruminobacter fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Butirivibrio fibrisolvens*, *Succinomonas amylolytica*, *Selenomonas ruminantion*, *Eubacterium ruminantion* e *Clostridium* spp.

O processo da fermentação ruminal tem como produtos finais os AGV, gás carbônico, metano, amônia e células microbianas. Dentre os AGV, dietas com alto teor de amido aumentam a produção de propionato, principalmente quando essa dieta resulta em menor pH ruminal. Este AGV é formado por duas vias conhecidas, a primeira envolve a formação de oxaloacetato e succinato e a segunda envolve conversão do piruvato até lactato e acrilato, posteriormente a propionato, sendo a primeira via a mais ativa (LENG, 1970). O aumento na produção ruminal de propionato ocorre em resposta à maior disponibilidade de carboidratos fermentáveis no rúmen, resultante da melhora na digestibilidade ruminal ou do maior teor dietético de amido (OBA; ALLEN, 2003a). Durante a fermentação ocorre perda de energia na forma de metano, em função do H₂ produzido (ZHOU; MENG; YU, 2011). Além do metano, a conversão do AGV em glicose apresenta certa ineficiência, o que causa perda de energia dietética na forma de calor durante o processo de fermentação. Portanto, devido à ineficiência da incorporação de H₂

proveniente do metabolismo ruminal, as eficiências de incorporação, no processo de fermentação de hexose, ao acetato, propionato e butirato são de 62, 109 e 78% respectivamente (MCLEOD et al., 2001). É mais eficiente energeticamente a fermentação a propionato, se comparado a acetato e butirato, em função da produção e utilização do H⁺ (HATEW et al., 2015).

A síntese de proteína microbiana no rúmen responde à mudança na digestão ruminal do amido. Theurer et al. (1999) relatam que o aumento da degradação ruminal do amido foi capaz de aumentar a retenção de amônia no rúmen e o fluxo de proteína microbiana para o intestino. Tanto o aumento do teor de amido na dieta quanto processamento do amido tenderam aumentar a produção de proteína do leite e diminuir o teor de nitrogênio ureico no leite. A maior quantidade de amido degradada no rúmen permitiu maior síntese de proteína microbiana. Esses resultados refletem melhor utilização do nitrogênio no rúmen com maior quantidade e extensão de degradação ruminal do amido (FERRARETTO et al., 2011).

O amido não digerido no rúmen pode ser digerido nos intestinos. A digestibilidade pós-ruminal do amido varia com a quantidade de amido que chega aos intestinos (HARMON et al., 2004). Kreikemeier et al. (1991) encontraram queda na digestibilidade intestinal do amido de 86 para 55 %, quando aumentou a infusão de 480 para 1440 g/d de amido no abomaso. Isso sugere que há um limite, na capacidade enzimática do intestino delgado, em degradar o amido, ou absorver glicose pelo epitélio intestinal (MILLS et al., 2016). Aumento na extensão e velocidade da degradação ruminal do amido, resultante do processamento dos grãos, reduz a quantidade de amido que chega ao intestino e aumenta a digestão pós-ruminal do amido (THEURER et al., 1999).

A digestão de amido no duodeno ocorre por ação de α -amilases pancreáticas, que primeiramente quebram amilose e amilopectina em unidades lineares de duas ou três glicoses. A degradação até a glicose é finalizada por oligossacaridasas de superfície nas microvilosidades do intestino delgado (HUNTINGTON, 1997). A absorção líquida de

glicose pelo trato digestivo de ruminantes é nula ou negativa, ou seja, os órgãos usam a glicose absorvida, oriunda da dieta ou do sangue arterial, para o próprio metabolismo (REYNOLDS et al., 1988). O amido não digerido no intestino delgado sofre fermentação no ceco e gera AGV, contudo a proteína microbiana é perdida nas fezes (NOCEK; TAMMINGA, 1991).

2.2 AMILASE

É postulado que aditivos alimentares, tais como inoculantes para silagens, probióticos, enzimas e ionóforos podem aumentar a eficiência alimentar de vacas em lactação (CASPER, 2008). Enzimas são biocatalisadores de estrutura proteica globular terciária ou quaternária, termolábeis e não dialisáveis, que aceleram a velocidade de uma reação química reduzindo a barreira energética destas reações (HARGER, 1982).

As amilases exógenas são um tipo de aditivo alimentar capaz de melhorar o desempenho animal através do aumento na digestibilidade do amido no rúmen ou intestinos (COWAN, 1999), mas também podendo atuar sobre o glicogênio (HRISTOV; MCALLISTER; CHENG, 1998; FAGUNDES et al., 2008).

Existem três tipos de amilases que são decorrentes do tipo de ligação que elas hidrolisam: as α -amilases rompem as ligações α -1,4 ou α -1,6 no interior do amido; as β -amilases hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do amido e as glicoamilases liberam unidades de glicose do terminal não redutor dos grânulos de amido (MORAES, 2004).

As α -amilases são de grande interesse comercial na indústria alimentícia, de papel e têxtil. Essas enzimas são extraídas do cultivo de microrganismos, principalmente *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Aspergillus oryzae* (GUPTA et al., 2003). Este tipo de amilase é pouco exigente às condições ótimas para atuação, sendo o pH ótimo entre 5 e 9 e a temperatura entre 25 a 100°C (UGURU et al., 1997).

As α -amilases podem ser divididas em quatro grupos: a) endoamilase: quebra ligação α -1,4 entre as moléculas de glicose na amilose resultando em sacarídeos menores, b) exoamilase: quebra α -1,4 ou α -1,6 atuando tanto nas ligações entre as moléculas de glicose da amilose quanto na amilopectina, c) enzima desramificadora: hidrolizam α -1,6 resultando em polissacarídeos lineares uma vez que age nas ramificações da amilopectina, d) transferase: quebra a ligação glicosídica da origem em sacarídeos menores e até mesmo em monômeros de glicose (SIVARAMAKRISHNAN et al., 2006).

O ataque da α -amilase ao substrato ocorre de forma não seletiva (como endoenzima) sobre vários pontos da cadeia simultaneamente, sendo que os primeiros produtos resultantes dessa hidrólise são oligossacarídeos, que possuem de 5 a 7 unidades de glicose (PANDEY et al., 2005). Durante a hidrólise, a α -amilase cliva aleatoriamente o polímero do amido em oligossacarídeos de baixo peso molecular e, eventualmente, produz unidades de maltotriose e maltose a partir da amilose e dextrina-limite, e glicose e maltose à partir de amilopectina (MORAES, 2004).

No estudo da cinética de quebra do amido pela α -amilase, dois estágios de quebra podem ser caracterizados. A primeira fase é identificada com quebra inicial rápida de 10 %/h com duração de 6 a 20 horas. Depois dessa fase, a hidrólise reduz progressivamente até tornar-se nula. O amido isolado de milho foi quebrado totalmente em 30 horas. Ao analisar os subprodutos da hidrólise, a glicose foi o produto predominante e em maior concentração. Em menor concentração, 100 vezes menos que glicose, foram identificadas a maltose e a maltotriose (PLANCHOT et al., 1995).

Há estudos que demonstram que a α -amilase aumenta a disponibilidade maltose, maltotriose e glicose, que são resultantes da hidrólise do amido no rúmen. Com isso, essa enzima altera o processo de fermentação ruminal por meio de fornecimento de substratos mais facilmente hidrolisáveis pelos microrganismos ruminais (DILorenzo et al., 2010). Essa alteração pode levar a quantidades excessivas de ácidos no rúmen oriundos da alta fermentação do amido. Esses ácidos podem levar à acidose ruminal, representando um

risco a inclusão de amilases exógenas na dieta de ruminantes (OWENS et al., 1998). Entretanto, quando não há substrato no rúmen, ou seja quando há pouco amido ruminal, as amilases se solubilizam rapidamente no líquido ruminal e fluem diretamente para o intestino (BEAUCHEMIN et al., 2003).

A ação enzimática na nutrição de ruminantes é estudada em três formas de uso e aplicação. A enzima pode ser aplicada no alimento antes de ser consumido, solubilizando carboidratos ou quebrando estruturas de amido. Outra maneira é ser fornecida na dieta com objetivo de ação ruminal, a enzima pode agir diretamente no alimento ou indiretamente através da ação sinérgica com os microrganismos ruminais e estimular a digestão. Além disso o objetivo pode ser ação na digestão pós ruminal, diretamente na digestão ou indiretamente melhorando a absorção de nutrientes no trato digestivo (DEFRAIN et al., 2005; FERRARETTO et al., 2011; NOZIÈRE et al., 2014).

2.2.1 AMILASES EXÓGENAS NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES

A utilização de enzimas exógenas como aditivo foi iniciada em sistemas de criação de animais monogástricos e é comumente utilizada na nutrição de aves e suínos (BEDFORD; SCHULZE, 1998). No entanto, como a digestão ruminal do amido é um fator impactante para o bom desempenho de ruminantes alimentados com dietas contendo altos teores de concentrado, o uso de suplementação com enzimas, como a amilase, tem ganhado espaço nos sistemas de produção de bovinos de corte e leite (HUNTINGTON, 1997).

De acordo com Hristov; McAllister e Cheng (1998) algumas enzimas são mais resistentes à degradação no rúmen. A suplementação com amilase exógena resistente à degradação ruminal mostra-se eficiente em aumentar a digestibilidade da matéria orgânica em vacas leiteiras (KLINGERMAN et al., 2009; GENCOGLU et al., 2010; GALLO et al., 2016). Esse aumento na digestibilidade da matéria orgânica foi associado ao aumento na digestibilidade da FDN, mas sem efeito sobre a digestibilidade do amido no trato digestivo

total (GENCOGLU et al., 2010) ou na digestibilidade verdadeira da matéria orgânica no rúmen (HRISTOV et al., 2008).

No ambiente ruminal, há sinergismo entre amilases exógenas e microbianas (MORGAVI et al., 2000), uma vez que as enzimas exógenas podem agir diretamente no alimento ou estimular a atividade das enzimas produzidas pelos microrganismos ruminais (MCALLISTER et al., 2001). Além disso, a produção de oligossacarídeos, oriundos da quebra da cadeia de amido pela amilase, estimula o mecanismo de alimentação cruzada de bactérias não amilolíticas no rúmen. Esse substrato viabiliza a fermentação e o crescimento de microrganismos ruminais. Dessa forma, a adição de amilase estimula a proliferação de microrganismos que seriam naturalmente inibidos pelas condições de baixo pH ruminal resultante de dieta rica em amido. (TRICARICO; JOHNSTON; DAWSON, 2007). Um maior número de bactérias e a maior atividade das mesmas pode ser traduzido em digestão mais eficiente da dieta fornecida (OWENS et al., 1998).

Em trabalhos *in vitro*, o desaparecimento do amido foi maior, tanto do milho como do sorgo, com a adição da α -amilase oriunda do *Bacillus licheniformis* (ENMEX, Mexico City, Mexico) (ROJO, 2005). Em estudo *in situ* foi observado maior desaparecimento ruminal da MS (82,6 %) em novilhos de corte suplementados com a amilase exógena (70 μ l/g de MS do conteúdo do saquinho) comparado ao grupo não suplementado (53,2 %) (GUTIERREZ et al., 2005). Entretanto, em trabalhos *in vivo*, os resultados de desempenho não possuem padrão de resposta, desde a ausência (CROSBY et al., 2006) até resultados positivos (ROJO et al., 2005) principalmente observado no aumento da eficiência alimentar (KLINGERMAN et al 2009; GENCOGLU et al., 2010) e melhora na eficiência de aproveitamento de nutrientes (BUENDÍA et al., 2003).

Em trabalhos com cordeiros, a inclusão oriunda do *Bacillus licheniformis* (ENMEX, Mexico City, Mexico) em 0, 0,6, 1,2, 1,8, 2,4 e 3,0 g/kg de MS, não melhorou o ganho de peso diário dos animais, a eficiência alimentar ou a digestibilidade de amido no trato total (CROSBY et al., 2006). Entretanto, em outros trabalhos, apesar da adição de

amilase não ter alterado o desempenho, o consumo de matéria seca foi menor e conseqüentemente houve melhora na eficiência alimentar (MORA et al., 2002; BUENDIA et al., 2003).

Objetivando aumentar a digestibilidade de dietas contendo sorgo, Rojo et al. (2005) utilizaram doses crescentes de α -amilase em dietas para carneiros (0; 1,45 e 2,9 g de enzima/g MS). Os autores observaram que as ingestões de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO) e amido declinaram linearmente e as digestibilidades de MS (68,5; 69,4 e 72,1 %) de MO (70,7; 71,8 e 74,4 %) e do amido (94,8; 95,2 e 97,2 %) no trato total aumentaram de forma linear de acordo com o aumento da dose da enzima. Isso evidencia que a enzima melhorou a eficiência de aproveitamento dos nutrientes.

Gencoglu et al. (2010) avaliaram a adição da α -amilase exógena Rumistar (DSM Nutritional Products, Basel, Suíça) em dieta com teor baixo de amido (21 % MS) com e sem enzima e normal em amido (27 % MS) sem enzima, como tratamento controle. Nos tratamentos com enzima, a dose foi de 300 KNU/kg na dieta total. Os animais alimentados com a enzima melhoraram a eficiência alimentar, diminuindo o consumo em 3 Kg de MS por dia sem alterar a produção de leite quando comparado com as vacas que receberam o mesmo teor de amido (21% MS) e não receberam a amilase exógena. Os autores também encontraram aumento nas digestibilidades no trato total da MS, MO, FDN e PB das vacas que receberam a amilase quando comparada aos tratamentos com baixo e alto amido sem acréscimo de amilase. Essa resposta pode explicar o aumento na eficiência de conversão alimentar ao suplementar com enzima. Em dietas com 21% amido houve aumento no NUL quando comparada com a dieta de 27% amido, porém quando a amilase foi adicionada, essa diferença ficou menos evidenciada, indicando melhorar o aporte energético para o tratamento com amilase.

Avaliando a interação do teor de amido da dieta com suplementação de amilase RumiStar, Weiss; Steinberg e Engstrom (2011), utilizaram a dose de 300 KNU/kg de MS da dieta total, 48 vacas da raça Holandês receberam uma dieta considerada de baixo amido

(26 % na MS) com e sem amilase e outra com alto amido (31 % na MS) sem amilase. Não foram encontradas diferenças no desempenho ou no CMS dos animais. Entretanto, comparando somente as dietas de baixo amido, a enzima aumentou a digestibilidade do FDN. Apesar disso, o efeito da inclusão da amilase na dieta de baixo amido não fez com que se igualasse o valor nutricional à dieta com alto amido. Os pesquisadores estenderam o experimento e as vacas foram alimentadas com o mesmo tratamento por mais 90 dias. Mas não foi observado resposta significativa à enzima.

Entretanto, em estudos conduzidos em novilhos confinados alimentados com dietas de alto amido (55 % da MS) contendo milho moído ou floculado, não houve efeito da α -amilase sobre o desempenho dos animais ou na digestibilidade da fibra. Neste trabalho, utilizou-se dose alta de amilase (600 KNU/kg MS) quando comparada às utilizadas nos trabalhos citados anteriormente (DILorenzo et al., 2010).

Nozière et al. (2014) avaliaram o efeito da enzima RumiStar ao longo do trato gastrointestinal de vacas primíparas da raça Holandês canuladas no rúmen e no duodeno. Os autores verificaram que a inclusão da enzima (300 KNU/kg MS) aumentou a digestibilidade ruminal do amido de 73,9 % para 81,1 % em dieta contendo alto teor de amido (30 %) e de 76,2 % para 82 % na dieta contendo baixo teor de amido (20 %), mas não encontraram diferenças na digestibilidade do trato total. A interação entre a ação da enzima e o teor do amido foi significativa na análise de perfil AGV no rúmen. Na dieta de alto amido, a amilase diminuiu acetato de 64,7 para 60,6 mol/100 mol e aumentou propionato de 16,3 para 21,7 mol/100 mol. Já na dieta com baixo amido, não foi observada diferença nas proporções dos AGV. Os autores verificaram que a adição da enzima na dieta reduziu a população de protozoários e da bactéria *Fibrobacter succinogenes* no rúmen. A atividade da amilase 2,5 horas após a alimentação no líquido ruminal das vacas no tratamento de dieta de alto amido foi 50 % maior com o uso da enzima, comprovando a ação da amilase exógena no rúmen.

A inclusão de α -amilase na dieta de ruminantes, pelo fato de aumentar disponibilidade de produtos de hidrólise de amido, modifica a população microbiana e, conseqüentemente, as concentrações de AGV sintetizado, e assim altera o processo de fermentação ruminal (TRICARICO; JOHNSTON; DAWSON, 2007). Esses mesmos autores avaliaram experimentos sobre os efeitos da suplementação de α -amilase no crescimento de bactérias ruminais em amido. Foram estudadas culturas puras de *Butyrivibrio fibrisolvens*, cepas: D1, 49 e A38, *Streptococcus bovis* S1, *Megasphaera elsdenii* T81 e *Selenomonas ruminantium* GA192 cultivadas anaerobicamente a 37 C° em meio contendo amido solúvel de batata (1,0g/l) como única fonte de carboidrato. O tratamento com enzima foi aplicado imediatamente antes da inoculação bacteriana por adição de 0,1 ml de solução para proporcionar concentração final de 0,06 DU/mL. Cada experimento constou de duas ou três repetições por tratamento. *Streptococcus bovis* S1 e *Butyrivibrio fibrisolvens* 49 cresceram rapidamente em meio contendo amido e alfa amilase e a suplementação não teve nenhum efeito sobre o crescimento. *Butyrivibrio fibrisolvens* D1, *Selenomonas ruminantium* GA192 e *Megasphaera elsdenii* T81 só cresceram pouco ou nada em meio contendo amido. No entanto, estas espécies não amilolíticas cresceram rapidamente quando houve adição de amilase em meio contendo amido.

Defrain et al. (2005) utilizando 24 vacas no período de transição divididas em dois tratamentos: suplementadas com α -amilase em 0,1 % na MS ou sem suplementação com amilase exógena. Os animais receberam o tratamento iniciando aos 21 dias antes da data prevista de parto até 70 dias de lactação. Três dietas foram adotadas com diferentes proporções de amido para suprir a exigência do animal, 23 % pré parto, 25 % no pós parto até 21 dias de lactação e 29 % até o fim do experimento. A inclusão da enzima na dieta não interferiu na ingestão de matéria seca, composição ou produção do leite. Efeito negativo da enzima foi o aumento da concentração sanguínea de ácido graxo não esterificado em 31 % nas vacas que receberam a enzima no pré parto. Da mesma forma, o tratamento com

enzima levou ao aumento de betahidroxibutirato no pré parto de 3,91 para 6,28 mg/dL. No pós parto, houve tendência para aumento de glicose sanguínea. Os autores consideraram favorável a resposta de aumento de glicose pós parto indicando melhora no balanço energético que é um objetivo de nutrição de vacas em transição.

Tricarico et al. (2006) em estudo com bovinos de corte com alimentação à vontade, a suplementação com amilase resultou em aumento na ingestão de MS e no ganho de peso diário quando o caroço de algodão foi utilizado como fonte de fibra. No sistema de fornecimento da dieta restrito não houve diferença da α -amilase no desempenho dos animais e na conversão alimentar.

Andreazzi (2014) em um ensaio com dieta com 32 % de amido na MS, testando a suplementação ou não de α -amilase, observaram que os animais tratados com a enzima aumentaram a produção de leite diária em 0,7 kg/d e reduziram o CMS em 1,0 kg/d, evidenciando aumento na eficiência alimentar nos animais suplementados com a enzima.

2.3 MONENSINA

A monensina é o ionóforo mais utilizado nas dietas de bovinos (DUFFIELD, RABIEE; LEAN, 2008). Nos Estados Unidos ela é utilizada desde 1976, iniciando o uso em confinamento de gado de corte (RICHARDSON et al., 1976). A monensina é produzida a partir de bactérias *Streptomyces cinnamonensis* que por ser tóxico a muitos microrganismos, é uma substância definida como antibiótico (OLIYNYK et al., 2003).

A monensina é largamente empregada em toda pecuária leiteira mundial, sendo utilizada no continente Africano, Oceania, América Latina e do Norte (GANDRA, 2010). A atuação desse aditivo no desempenho dos animais está vinculada ao aumento da eficiência energética, alterando a proporção dos AGV, aumentando a proporção de propionato e diminuindo conseqüentemente a relação entre acetato e propionato e a produção de metano (RUSSELL; STROBEL, 1989; BRODERICK, 2004).

O metabolismo ruminal de nitrogênio e a síntese de proteína microbiana também sofrem ação da monensina, visto que este ionóforo tem a capacidade de diminuir a deaminação da proteína no rúmen, o que sugere maior quantidade de aminoácidos absorvidos no intestino delgado e menor concentração de nitrogênio amoniacal no ambiente ruminal (MOSCARDINI; WRIGHT; LUIMES, 1998; GANDRA, 2010). Além disso, a monensina controla distúrbios resultantes da fermentação anormal no rúmen, como a acidose, uma vez que esse ionóforo reduz a população dos principais microrganismos produtores de lactato no rúmen, como *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus* sp., *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Lachnospira múltiparus* e protozoários do gênero *Holotríqueo* (RUSSELL; HINO, 1985).

A resistência dos microrganismos ao ionóforo é principalmente correlacionada com as diferenças na estrutura do envelope celular dos microrganismos. Ela afeta seletivamente o transporte de íons através das membranas celulares e induzir o uso fútil de energia por microrganismos e subsequente morte celular (RUSSELL; HOULIHAN, 2003).

É comumente postulado que as bactérias gram-positivas são mais sensíveis à monensina quando comparado com as bactérias gram-negativas (MCGUFFEY; RICHARDSON; WILKINSON, 2001). Entretanto, a coloração gram é uma técnica microbiológica para identificação de microrganismos que possuem variações na realização da técnica, considerando os tempos de exposição aos corantes Cristal Violeta e Fucsina de Gram e o emprego ou não de lavagens com água entre as etapas, que podem interferir na visualização das estruturas coradas (FREITAS; PICOLI, 2007). Schären et al. (2017) realizaram um trabalho com a finalidade de avaliar a diversidade bacteriana no rúmen de vacas leiteiras alimentadas com monensina ou óleos essenciais. A monensina diminuiu a diversidade microbiana de 23 unidades taxonômicas e aumentou 10, dentre elas tanto bactérias gram-positivas quanto gram-negativas. Com base nas espécies encontradas, a hipótese que os efeitos são dependentes e da espessura e da porosidade da parede celular podem ser aplicados para a sensibilidade à monensina ao invés de uma diferença clara

entre bactérias gram-negativas e gram-positivas. As bactérias mais resistentes à monensina possuem uma membrana interna com camada fina de peptidoglicano e uma membrana externa formada por proteínas, lipoproteínas, lipopolissacarídeos e porinas, que são proteínas de canais com tamanho limite de 600 Dalton. A maioria dos ionóforos tem tamanho superior a 600 Dalton e não passam por entre as porinas, o que torna a célula impermeável ao ionóforo (NAGARAJA et al., 1997).

2.3.1 MECANISMO DE AÇÃO DA MONENSINA

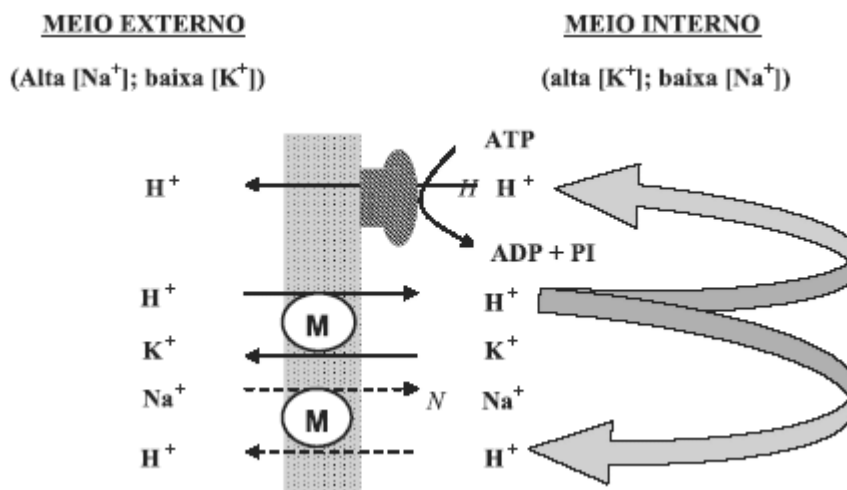
Os ionóforos são geralmente bacteriostáticos e não bactericidas e seus mecanismos de ação são sua habilidade de alterar o fluxo de cátions através da membrana. A monensina, por exemplo, modifica o transporte de sódio/potássio, reduzindo a concentração de potássio celular e o influxo de prótons, resultando no abaixamento do pH intracelular. Uma vez que o pH intracelular fica baixo, a monensina cataliza um fluxo de prótons em mudança com o sódio (RUSSEL, 1987; CHEN; RUSSEL, 1989).

Em condições normais, as bactérias mantêm as concentrações de íons de potássio (K^+) mais altas no interior da célula que no meio externo e expõem íons de sódio (Na^+) para manter a concentração no meio interno. Esse mecanismo é necessário para tamponar o pH intracelular por meio de troca de K^+ e hidrogênio (H^+) (BERGEN; BATES, 1984).

Quando a monensina se liga à membrana celular, a primeira reação que ocorre é a saída de K^+ e a entrada de H^+ na célula, provocada pela mudança do gradiente iônico externo. O H^+ acumulado no interior da célula ocasiona a diminuição do pH. A célula responde a esta queda do pH com uma segunda reação caracterizada pelo transporte de Na^+ para dentro e de H^+ para fora da célula, na tentativa de conservar a osmolaridade, embora esta seja menos eficiente que a primeira reação (Figura 2) (RUSSELL; STROBEL, 1989). Na tentativa de manter o pH e o balanço de íons intracelulares, as células utilizam

grande parte de sua energia, e tornam-se incapazes de manter o metabolismo, diminuindo a capacidade de crescimento e reprodução, ocasionando morte celular.

Figura 1: Efeito da monensina na parede bacteriana



Fonte: Russel; Strobel, (1989).

De acordo com Russel (1987), para a máxima ação da monensina é necessário que os níveis de K^+ no meio externo sejam baixos para que não haja a troca iônica entre Na^+ e K^+ , mas com H^+ . Quando os níveis de Na^+ no meio externo são altos, as trocas iônicas promovidas pela monensina ocorrem entre Na^+ e H^+ e caracterizam a máxima ação do ionóforo. Dietas à base de alfafa possuem relação K^+/Na^+ no fluído ruminal em torno de 0,8 e dietas à base de capins e milho possuem esta relação abaixo de 0,2. Sendo assim, dietas de animais em terminação contendo alfafa possuem relação K^+/Na^+ mais favorável para máximo efeito da monensina (SALMAN; PAZIANI; SOARES, 2006).

Nagaraja et al. (1981) avaliando a sensibilidade das bactérias gram-positivas, produtoras de lactato no rúmen (*Butyvirbio fibrisolvens*, *Eubacterium cellulosolvens*, *E. ruminantium*, *Lachnospira multiparus*, *Lactobacillus ruminis*, *L. vitulinus*, *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens* e *Streptococcus bovis*) e das gram-negativas, fermentadoras de

lactato (*Anaerovibrio*, *Megasphaera*, *Selenomonas*) aos tratamentos com monensina, concluíram que a maioria das bactérias produtoras de lactato foi inibida sendo a mais importante nesse processo a *Streptococcus bovis*, podendo então diminuir os casos de acidose láctica. Contudo, além das bactérias, outros microrganismos como fungos e protozoários também podem ser afetados pela monensina sendo esse um entrave da utilização do ionóforo (ELLIOTT et al., 1987).

Com isso é bem definido que o mecanismo de ação da monensina é primeiramente através das mudanças na população microbiana ruminal. A resposta no animal é um mecanismo secundário do ionóforo (SCHÄREN et al., 2017).

2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

Óleos essenciais são compostos químicos extremamente voláteis presentes nas plantas. Seus componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres e ácidos orgânicos fixos (SIMÕES; SPITZER, 1999). A tecnologia utilizada para extração destes compostos é por destilação a vapor ou por processos mecânicos (YANG et al., 2010; ZHANG et al., 2010).

O termo “óleo” é devido às suas características lipofílicas, e “essencial” da sua propriedade aromatizante. (OETTING et al., 2006). Esses compostos são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas e não possuem cunho energético ou finalidades nutritivas (ARAUJO, 2010). Segundo Schmidt (2010), eles são produzidos pelas plantas para a defesa contra fatores externos como estresses fisiológicos, fatores ambientais e proteção contra patógenos. São produtos naturais que dão cores e odores às plantas (MCINTOSH et al., 2003). A composição dos óleos essenciais pode ser altamente variável dependendo de fatores ligados à planta, tais como: espécies, fase de crescimento e as partes da planta utilizadas para extrair o óleo (HART et al., 2008).

O uso de óleos essenciais e extratos de plantas tem sido o foco da indústria farmacêutica e de cosméticos (EVRENDILEK, 2015). Da mesma forma, o uso desses compostos também vem se expandindo na agricultura e indústrias de nutrição animal como aditivos sintéticos para inativação de microrganismos patogênicos e deteriorantes que causam danos à segurança dos alimentos durante o transporte, armazenamento e embalagens (SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 1998). Estima-se que 3000 tipos de óleos essenciais sejam conhecidos pela ciência, sendo cerca de 300 deles com aplicações comerciais, tais como na preservação e aromatização de alimentos, produção de perfumes, cosméticos, repelentes, produção de antimicrobianos e anti-inflamatórios (CALSAMIGLIA et al., 2007).

Segundo Kim, Eastridge e Yu (2014), esse aditivo é seguro e pode ser usado em ruminantes para reduzir a emissão de metano, uma vez que possui propriedades antimicrobianas, substituindo alguns antibióticos e promotores antimicrobianos (CHAVES et al., 2008; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ; CABO; RODRÍGUEZ-HERRERA, 2014), antifúngicos (VELLUTI et al., 2003) e de proteção celular (LIMA et al., 2004; DURAK et al., 2004). A ação imunoestimulante também foi verificada tanto quando óleos essenciais foram incluídos na dieta de animais e humanos, quanto em situações em que os animais ficaram expostos a ambientes contendo odores provenientes da mistura de diferentes óleos essenciais (BROUGHAN, 2002).

Os óleos essenciais podem atuar no controle de patógenos pela atividade antimicrobiana, além desta, possuem atividade antioxidante, melhoram a digestão através do estímulo das atividades enzimáticas e a absorção de nitrogênio (KLEVENHUSEN et al., 2012). No ambiente ruminal seus componentes influenciam as atividades proteolíticas e metanogênicas das bactérias do rúmen (CASTILLEJOS et al., 2008). De acordo com Wang; Wang e Zhou (2009), os óleos essenciais apresentaram efeitos na redução da metanogênese, diminuindo em 12 % a produção de metano quando comparado com os animais que não foram suplementados.

É fundamental que a composição do óleo essencial seja precisamente conhecida. Como relatado em diversos estudos, sua composição pode variar de acordo com diversos fatores, como o clima, solo, época e forma de plantio, adubação, condições ambientais, técnica de extração, além de variações genéticas intra-específicas da espécie vegetal, entre outros fatores que podem alterar o teor do princípio ativo presente no óleo (ZAGO et al., 2009).

Evrendilek (2015), em ensaio com discos embebidos em carvacrol, timol e limoneno, semelhante a um antibiograma, observaram que os óleos essenciais de carvacrol e timol, encontrados no tomilho, apresentaram poder inibitório de bactérias gram-positivas. O limoneno teve menor efeito inibidor independente do tipo de bactéria.

Como existem muitas substâncias nos óleos essenciais, é natural que haja sinergia entre os modos de ação nos diversos compostos (BAKKALI et al., 2008). Baseado nisso, a recomendação mais encontrada para maximização dos resultados é a administração de óleos essenciais combinados, pois esse efeito aditivo e ou sinérgico é relevante para melhorar a fermentação ruminal e o desempenho animal (LANGHOUT, 2000; CALSAMIGLIA et al., 2007; KLEVENHUSEN et al., 2012). Nesse caso, possivelmente, mais de um mecanismo de ação estaria envolvido para o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais, porém poucas pesquisas comparativas estão disponíveis sobre o efeito potencial individual e sinérgico entre eles (KHIAOSA-ARD; ZEBELI, 2013).

Os resultados dos experimentos com esse aditivo mostram-se variáveis quanto ao modo de ação tornando necessária a realização de mais ensaios para estabelecer níveis adequados de suplementação. Estão sendo realizadas pesquisas com o uso de óleos essenciais em dietas de ruminantes para entender melhor sua atuação sobre o ambiente ruminal, mais precisamente o seu mecanismo de ação sobre a população microbiana ruminal (COBELLIS; TRABALHZA-MARINUCCI; YOU, 2016).

2.4.1 MECANISMOS DE AÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os possíveis mecanismos de atuação dos óleos essenciais estão, em sua maioria, associados com a toxicidade à membrana celular, comprometendo a função da permeabilidade seletiva da mesma (MILLEZI et al., 2012; BURT, 2004). Acredita-se que os óleos essenciais agem na estrutura da parede celular de bactérias, desnaturando e coagulando proteínas, tendo assim o efeito antibacteriano. Devido a sua natureza hidrofóbica, eles rompem a membrana citoplasmática promovendo o extravasamento dos conteúdos do citoplasma. Os processos vitais das células são prejudicados, como transporte de elétrons, translocação de proteínas, fosforilação e outras reações que dependem de enzima (BONA et al., 2012).

Considerando a variada gama de substâncias químicas presentes nos óleos essenciais, é natural que a atividade antimicrobiana não seja mediada por um único mecanismo específico, havendo sinergia entre os modos de ação encontrados nos diversos compostos (ZAGO et al., 2009; BURT, 2004). Óleos essenciais tem capacidade de interagir com lipídios da membrana celular e das mitocôndrias das bactérias. Isto ocorre quando o óleo encontram-se sob forma não dissociada (mais hidrofóbica), o que nas condições ruminais é favorecido pelo baixo pH (CALSAMIGLIA et al., 2007).

A hidrofobicidade está diretamente relacionada à ação antimicrobiana. Mendoza, Wilkens e Urzua (1997) demonstraram que a inclusão de um grupamento metil reduziu drasticamente o potencial antimicrobiano dos óleos essenciais, isso devido ao aumento da interação com a água propiciada pelo grupamento metil. A interação óleo essencial/membrana celular altera a estrutura da mesma, tornando-a mais fluida e permeável, permitindo o extravasamento de íons e outros conteúdos citoplasmáticos. Distorções na estrutura física da membrana causam expansão e desestabilização, aumentando sua fluidez e permeabilidade passiva (CARSON; MEE; RILEY, 2002).

Outro mecanismo possível é aquele que causa extravasamento de íons, semelhante à ação dos ionóforos. Na forma não dissociada os óleos essenciais se difundem pela membrana citoplasmática e atingem o interior da célula, ocorrendo dissociação e liberação de próton. Em seguida, quando dissociado, liga-se ao K^+ retornando ao meio extracelular e carregando consigo este íon ou outro qualquer. No exterior, ocorre nova dissociação, com liberação do K^+ e recuperação de novo H^+ (ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002). A célula bacteriana pode tolerar certa perda de íons do conteúdo celular sem comprometimento de sua viabilidade. Entretanto, o extravasamento exagerado de íons e moléculas vitais pode levar a célula à morte. Mesmo não havendo morte direta, no ambiente ruminal, a perda de conteúdo citoplasmático e o gasto extra de energia fazem com que haja diminuição da população de bactérias sensíveis aos óleos essenciais, já que essas perderiam viabilidade em um ambiente extremamente competitivo como o rúmen (ARAUJO, 2010; CALSAMIGLIA et al., 2007).

A estrutura química dos óleos essenciais é a responsável pelo modo de ação e atividade antimicrobiana de cada óleo essencial (DORMAN; DEANS, 2000). A presença do grupo hidroxila (-OH) nos compostos fenólicos é fundamental para a ação da molécula (ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002). A presença do radical metil (-CH₃) ou do acetato (CH₃COO-), assim como o próprio anel fenólico por si, também afetam as propriedades antibacterianas de cada óleo essencial (BURT, 2004).

2.4.2 UTILIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS COMO MANIPULADOR DE FERMENTAÇÃO NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES

Os óleos essenciais começaram a serem estudados para ruminantes por volta de 1957, verificando que o limoneno e pineno eram capazes de inibir a formação de metano no rúmen (CRANE; NELSON; BROWN, 1957). No entanto, essa linha de pesquisa foi desestimulada por volta da década de 1970 devido ao início do uso de ionóforos. Em 2003,

quando a União Européia anunciou a proibição do uso de antibióticos e promotores de crescimento voltou-se então o interesse de estudar os óleos essenciais (CALSAMIGLIA et al., 2007).

Um grande número de ensaios *in vitro* e estudos *in vivo* foram realizados para testar a capacidade dos óleos essenciais em modular as populações microbianas ruminais e assim aumentar a eficiência de utilização de nutrientes no rúmen (CALSAMIGLIA et al., 2007). Devido à sua atividade antimicrobiana contra microrganismos ruminais indesejáveis, observam-se efeitos positivos sobre o metabolismo de proteínas, concentração de AGV, digestão da fibra e produção de metano (MACHEBOEUF et al., 2008).

Nas bactérias gram-positivas os óleos essenciais atuam eficientemente na parede celular, ao contrário das gram-negativas, pois possuem a membrana celular hidrofílica e com isso, impedem a entrada de substâncias hidrofóbicas (BURT, 2004). Porém, Dorman e Deans (2000) enfatizam que a reação de gram apresenta pequeno impacto sobre a susceptibilidade bacteriana aos compostos secundários.

Calsamiglia et al. (2007) encontraram que o aditivo inibiu a deaminação de proteína e aumentou a concentração de butirato no rúmen. Além disto, os autores concluíram que os efeitos de alguns destes óleos essenciais são dependentes do pH ruminal e da dieta. Sendo assim, dietas ricas em concentrado, mais propensas ao baixo pH ruminal, podem potencializar os efeitos desses produtos. O timol, por exemplo, foi mais efetivo em pH 5,5 do que em 6,5.

Em trabalho para identificar as bactérias resistentes ou não aos óleos essenciais, Wallace et al. (2002) encontraram que dentre as bactérias mais encontradas no rúmen: *Ruminobacter amylophilus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Lachnospira multipara*, *Clostridium aminophilum*, *Escherichia coli*, *Eubacterium ruminantium*, *Megasphaera elsdenii*, *Mitsuokella multiacidus*, *Prevotella albensis*, *Prevotella brevis*, *Prevotella bryantii*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Selenomonas ruminantium*, as mais

sensíveis foram *Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella* spp. e as bactérias hiperprodutoras de amônia, *Peptostreptococcus anaerobius* e *Clostridium sticklandii*. (COBELLIS; TRABALHZA-MARINUCCI; YOU, 2016).

MCIntosh et al. (2003) observaram que a adição de óleos essenciais em concentrações inferiores a 100 ppm em meio de cultura, inibiu o crescimento da maior parte bactérias ruminais. Entretanto, *Streptococcus bovis* foi a bactéria mais resistente enquanto que a *Prevotella ruminicola*, *Clostridium sticklandii* e *Peptostreptococcus anaerobius*, assim como no trabalho anterior foram as mais sensíveis ao uso de óleos essenciais. Já a população de bactérias que fermentam carboidratos estruturais tais como *Fibrobacter succinogens*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*, foi maior em meios contendo óleos essenciais. Além disso, a adição de óleos essenciais foi capaz de diminuir a população de bactérias patogênicas como *Salmonella* sp. e *E. coli*.

Diversos pesquisadores mostraram que os óleos essenciais, devido à sua atividade antimicrobiana, foi capaz de reduzir a emissão de metano em bovinos e ovinos (KHIAOSA-ARD; ZEBELI, 2013; KOLLING, 2016). Segundo Busquet et al. (2005), os óleos essenciais do alho e cinamaldeído aumentam a eficiência energética das dietas utilizadas em ruminantes pois aumentam a concentração de propionato e reduzem a produção de metano. Os autores também observaram menor concentração de acetato em animais suplementados com óleos essenciais e menor produção de lactato. Essa diminuição da produção de lactato pode ser benéfica pois diminui a incidência de acidose láctica nos animais.

Em trabalhos *in vitro*, o composto cinamaldeído na dose (300 mg/L) reduziram a produção de metano em 74 %, enquanto a monensina que é o aditivo mais usado na produção animal reduziu 42 %, também aumentou proporção de propionato e redução de acetato (BUSQUET et al., 2005). Reduzir a relação entre acetato e propionato, torna o rúmen energeticamente mais eficiente e reduz a geração de metano. Ao se produzir

propionato não há produção de H⁺ como observado para as rotas que levam à produção de acetato e butirato (VAN SOEST, 1994; RUSSELL, 2003).

Sugere-se também que, quando existentes, os efeitos de óleos essenciais na redução de metano estejam parcialmente associados à inibição do crescimento de protozoários que produzem H₂ e são colonizados por microrganismos metanogênicos (MCALLISTER et al., 1996). Khiaosa-ard e Zebeli (2013) sumarizaram as respostas in vivo de ruminantes suplementados com óleos essenciais e relataram que o número de protozoário no líquido ruminal diminuiu 30 % em animais suplementados diariamente com doses maiores do que 0,20 g/kg de MS.

As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais podem proporcionar melhor aproveitamento de energia e proteína no rúmen. Ovelhas suplementadas com uma mistura de óleos essenciais composto por timol, guaiacol e limoneno na dose de 110 mg/d tenderam a apresentar uma maior concentração de AGV e maior quantidade de protozoário seis horas após a alimentação quando comparados com animais não suplementados (NEWBOLD et al., 2004). Entretanto, concentração de AGV não foi afetada em dietas contendo óleos essenciais quando comparado ao controle em novilhos suplementados com óleo de canela, cravo e anis em uma concentração de 7,5 mg/kg MS (CARDOZO et al., 2004).

Muitos trabalhos realizados com óleos essenciais, com o objetivo de avaliar a concentração de AGV, são in vitro (CASTILLEJOS et al., 2005; CASTILLEJOS et al., 2008; BUSQUET et al., 2005). Em geral, esses resultados, demonstraram que óleos essenciais podem apresentar efeitos semelhantes aos ionóforos, entretanto, esses estudos sempre apresentam algumas limitações quando comparados com trabalhos in vivo. Os estudos in vivo, evidenciaram que o óleo de anis apresentou efeitos sobre as concentrações de AGV (FANDIÑO et al., 2008). Da mesma forma, uma mistura comercial contendo extratos de cinarina, ginseng e feno-grego apresentou aumento na concentração de

propionato com queda na relação entre acetato e propionato, também com resultados semelhantes ao que ocorre com a monensina (DEVANT; ANGLADA; BACH, 2007).

Outra atividade de alguns compostos de óleos essenciais é a alteração nas rotas da biohidrogenação e isso pode reduzir a produção de gordura no leite. Benchaar et al. (2015) alocaram oito vacas canuladas no rúmen em quadrado latino 4 x 4 para avaliar doses crescentes de eugenol (0, 25, 50 e 75 mg/kg de MS da dieta). Nesse trabalho a produção de leite foi similar entre os tratamentos e sem efeito sobre o CMS. Entretanto, a produção de gordura no leite foi reduzida de forma quadrática com a suplementação com eugenol (1,38, 1,32, 1,31 e 1,33 kd/d) sendo que a menor produção foi dos animais suplementados com 50 mg/kg de MS da dieta. No trabalho de Lourenço et al. (2008), os autores avaliaram quatro compostos secundários de plantas com diferentes grupos químicos sobre a biohidrogenação ruminal em fermentadores de fluxo contínuo. Dentre esses compostos, o eugenol alterou o processo de biohidrogenação uma vez que os autores encontraram aumento no acúmulo de C18: 1 trans-15 e C18: 1 cis-15, produtos finais de uma via de biohidrogenação alternativa de C18: 3n-3.

A inclusão de um produto comercial composto por óleos essenciais de timol, eugenol, vanilina e limoneno também caracteriza-se por reduzir a taxa de deaminação de aminoácidos, a taxa de produção de amônia e o número de bactérias hiperprodutoras de amônia, com aumento na passagem de N para o intestino (MCINTOSH et al., 2003). Wallace et al. (2002) observaram redução nas bactérias hiperprodutoras de amônia o que conseqüentemente diminui a degradação de aminoácido e inibição na produção de amônia em 25 % com uso de óleos essenciais. Como os ruminantes possuem baixa eficiência de utilização de N, alterar o metabolismo ruminal desse composto apresenta-se como alternativa de redução no custo de alimentação desses animais, melhorando o desempenho animal e reduzindo a poluição ambiental causada pela excreção de N (CALSAMIGLIA et al., 2017).

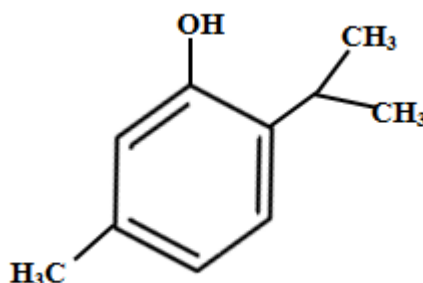
2.4.3 CRINA RUMINANTS

O aditivo CRINA é um produto sintético composto por uma mistura de óleos essenciais de timol, eugenol, vanilina, guaiacol e limoneno (MCINTOSH et al., 2003; NEWBOLD et al., 2004; CASTILLEJOS et al., 2005; VENDRAMINI et al., 2016).

- Timol

O Timol possui nomenclatura química de 5-metil-2-(1-metiletil)-fenol (Figura 3) e é um monoterpene aromático constituinte de algumas plantas utilizadas como especiaria. É principalmente encontrado no *T. vulgaris* (tomilho) e no *O. vulgare* (orégano), possuindo amplo espectro de ação como anti-inflamatório, antioxidante, antibacteriano, antifúngico, anticarcinogênico (BASER; DEMIRCI, 2007).

Figura 2: Fórmula estrutural do timol.



Devido às características físico-químicas da molécula de timol, ele interage com a camada fosfolipídica da membrana plasmática dos microrganismos e também com as proteínas da membrana da bactéria, causando vazamento de ácidos nucleicos e ATP (MILLEZI et al., 2012). Além disso, tem a capacidade de permeabilizar e despolarizar a membrana (HAMMER; HEEL, 2012).

Evans e Martin (2000) em um trabalho *in vitro*, encontraram que com a adição de 400 mg/L o composto modificou o metabolismo das bactérias de *S. bovis* e *S. ruminantium*

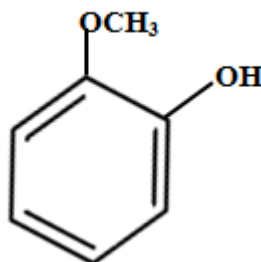
inibindo a fermentação de glicose por esses microrganismos e também modificou o perfil de fermentação ruminal. O timol reduziu as concentrações de metano e lactato e aumentou o pH do conteúdo do fermentador e a relação entre acetato e propionato. Entretanto, nenhum efeito foi relatado em doses mais baixas (50, 100, e 200 mg/L).

Castillejos (2005), avaliou o timol nas doses de 5, 50 e 500 mg/L em experimento *in vitro*. Na dose de 500 mg/L o timol reduziu a digestibilidade da FDN e da FDA, resultando em menor digestibilidade da MS. Comparando a mesma dose com o grupo controle, o timol também reduziu a concentração de AGV, contudo, aumentou a proporção de propionato e butirato em AGV totais. O timol a 50 mg/L não teve efeito no perfil de AGV. No entanto, na dose de 5 mg/L tendeu a reduzir a proporção de acetato e aumentou a proporção de butirato sem afetar a concentração total de AGV.

- Guaiacol

Guaiacol é um composto fenólico oriundo do guaco (*Mikania glomerata*), cuja nomenclatura é 2-methoxyphenol (Figura 4). Possui atividade antimicrobiana através de mudanças na conformação da membrana celular das bactérias tornando-a mais fluida e permeável permitindo que haja extravasamento de íons e conteúdo do citoplasma (NEVES, 2009).

Figura 3: Fórmula estrutural do guaiacol.

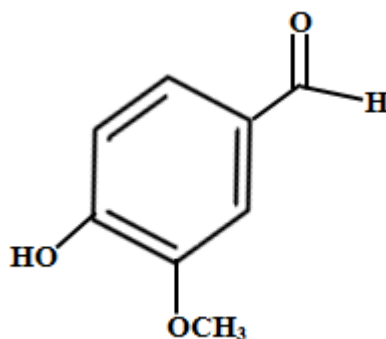


Em experimento *in vitro*, utilizando doses do composto de 5, 50 e 500 mg/L em duas diferentes dietas: uma com a relação entre forragem e concentrado de 60 e 40 % , respectivamente, e outra de 10 e 90 %. Os resultados mostram que nas duas dietas, o guaiacol na dose de 500 mg/L reduziu a proporção de acetato e a concentração de nitrogênio amoniacal e nas doses de 5 e 50 mg/L, diminuiu a concentração total de AGV. Na dieta com a relação entre forragem e concentrado de 60:40, a dose de 500 mg/L de guaiacol não alterou a concentração de AGV. Na dieta com a relação entre forragem e concentrado de 10:90, o guaiacol não teve efeitos sobre as concentrações de AGV total e individual e na dose de 5 mg/L tendeu a aumentar o pH do rúmen (CASTILLEJOS, 2005).

- Vanilina

A vanilina é um composto que possui nomenclatura química de 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído (Figura 5) e é encontrada na vagem da orquídea *Vanilla planifolia* (PACHECO; DAMASIO, 2010). Ela possui efeitos terapêuticos tais como antimicrobianos, antioxidante e anticarcinogênio (TAI et al., 2011).

Figura 4: Fórmula estrutural da vanilina.



Fitzgerald et al. (2004) relataram que o modo de ação da vanilina na inibição de várias bactérias relacionadas com alimentos estava relacionado à atividade de ruptura da membrana. A vanilina possui fenóis que lesionam as células microbianas pela alteração da

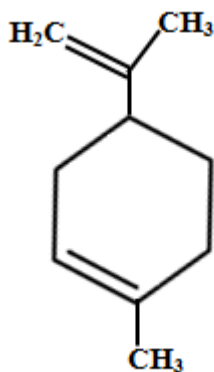
permeabilidade seletiva da membrana citoplasmática, causando uma perda das substâncias intracelulares vitais. Esses compostos também desnaturam proteínas como as enzimas de algumas bactérias menos resistente (ANGELO; JORGE, 2007).

Em experimento *in vitro*, utilizando doses do composto de 5, 50 e 500 mg/L em duas diferentes dietas: um com a relação entre forragem e concentrado de 60 e 40 % , respectivamente, e outra de 10 e 90 %. Na dieta com a relação entre forragem e concentrado de 60:40, a vanilina não modificou a fermentação microbiana do rúmen nas doses de 5 e 50 mg/L, com exceção de 500 mg/L que reduziu a proporção de acetato sem afetar a concentração total de AGV. Entretanto, na dieta com alto concentrado, todas as doses de vanilina reduziram a proporção de propionato e aumentaram a relação entre acetato e propionato. Na dose de 50 mg/L, o composto aumentou a concentração total de AGV e amônia N (CASTILLEJOS, 2005).

- D-limoneno

O D-limoneno é um isômero do limoneno com nomenclatura 4R-1-metil-4-isopropenil-ciclo-hex-1-eno (Figura 6), que é extraído da casca de cítrus por separação, através de centrifugação e por destilação à partir dos citrus principalmente limão e laranja

Figura 5: Fórmula estrutural do D-limoneno.



O mecanismo do D-limoneno baseia-se principalmente em efeitos tóxicos na membrana celular, alterando a direção das cargas elétricas na membrana das bactérias e com isso comprometendo a permeabilidade seletiva, fazendo com que todo conteúdo do meio externo se direcione para o interior da bactéria (DORMAN; DEANS, 2000).

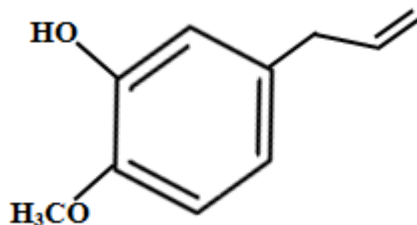
Esse composto foi um dos primeiros a ser estudados, Oh, Nelson e Brown (1967) realizando trabalho *in vitro* verificaram que limoneno foi capazes de inibir a formação de metano. Entretanto, Oh et al. (1967) utilizando fermentadores abastecidos com líquido ruminal de ovelhas e não encontraram o efeito do D-limoneno em microrganismos ruminais.

Samii et al. (2016) realizaram um experimento com sete novilhas canuladas no rúmen e testaram os seguintes tratamentos: 1) controle; 2) limoneno na dose de 10 mg/kg MS da dieta; 3) limoneno na dose de 20 mg/kg MS da dieta; 4) limoneno na dose de 40 mg/kg MS da dieta; 5) limoneno na dose de 80 mg/kg MS da dieta; 6) CRINA na dose de 180 mg/kg MS da dieta, e 7) tilosina na dose de 12 mg/kg MS da dieta. Cada tratamento foi testado no período de 11 dias com 10 dias de adaptação. O limoneno não afetou a taxa de degradação ruminal de aminoácidos, a concentração de amônia, nem a concentração de AGV no fluido do ruminal.

- Eugenol

O eugenol é um fenol que recebe a nomenclatura química de 4-alil-2-metoxifenol (Figura 7). É extraído principalmente do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) e da canela (*Sinnamomum verum*). O eugenol apresenta efeitos antimicrobiano (OLIVEIRA; ABREU FILHO, 2012; RAUT; KARUPPAYIL, 2014), nematicida (TSAO e YU, 2000), inseticida (EL-HAG et al., 1999), antiviral (YUKAWA et al., 1996) e fungicida (DELESPAUL et al., 2000).

Figura 6: Fórmula estrutural do eugenol



O mecanismo de ação do eugenol ocorre na membrana plasmática da bactéria através da inativação de enzimas e extravasamento do material genético celular. A alteração da parede celular é devido a sua estrutura fenólica (CALSAMIGLIA et al., 2007).

Benchaar et al. (2012) avaliaram a suplementação de eugenol em quatro vacas fistuladas na dose de 50 mg de eugenol/kg de MS da dieta em duas dietas sendo uma com 65 % e outra com 35 % de forragem na MS. A adição do eugenol às dietas não afetou o CMS, a produção de leite e a digestibilidade dos nutrientes. Entretanto, aumentou a proporção molar de isobutirato e isovalerato no fluido ruminal.

Benchaar et al. (2015) avaliaram doses crescentes de eugenol (0, 25, 50 e 75 mg/kg de MS da dieta) em oito vacas canuladas no rúmen em quadrado latino 4 x 4. A produção de gordura no leite foi reduzida de forma quadrática com a suplementação com eugenol. E houve tendência de queda linear na proporção no C4:0 e aumento linear de C18:1 t16, C18:1 t9 e C18:2 t9 t12. Em fermentadores de fluxo contínuo, eugenol causou uma alteração na biohidrogenação recorrente de C18:1 trans-15 e C18:1 cis:15 e C18:3 n-3 acumulação de ácidos graxos poliinsaturados, um produto final no rota alternativa de biohidrogenação (LOURENÇO et al., 2008).

2.4.4 CRINA RUMINANTS COMO MODULADOR DE FERMENTAÇÃO

O CRINA quando utilizado em ruminantes, promove inúmeros efeitos no ambiente ruminal. Com a utilização deste suplemento foi possível verificar diminuição na produção de amônia por bactérias ruminais (MOLERO et al., 2004) e emissão de metano (MCINTOSH et al., 2003), mudanças nos perfis de AGV in vitro (CASTILLEJOS et al., 2005) e in vivo (SCHÄREN et al., 2017) e no perfil de AG no leite em vacas leiteiras (BENCHAAR et al., 2007).

Giannenas et al. (2011), em um trabalho com ovelhas suplementadas com doses crescentes de 0, 50, 100 e 150 mg/d kg de CRINA, encontraram que com o aumento da dose, houve aumento da concentração de propionato e tendeu a diminuir a concentração de acetato. No mesmo experimento, os autores verificaram que o total de bactérias e de protozoários no líquido ruminal não foram influenciados com a adição do produto à dieta. No entanto, a população de bactérias celulolíticas foi maior nos grupos suplementados, em comparação ao grupo controle, mas não diferiu entre as doses testadas.

Drong et al. (2016) realizaram um estudo com 60 vacas leiteiras divididas em quatro tratamentos. Os tratamentos foram: baixa condição corporal (BCC = 2,77), alta condição corporal (ACC= 3.95), ACC suplementadas com 335 mg/d de monensina e ACC suplementadas com 1 g/d de óleos essenciais (CRINA Ruminants). O período experimental foi dividido em: 1 (- 42 d pré parto), 2 (1 a 14 DEL) e 3 (15 a 56 d DEL) (n = 15/tratamento) A produção de leite não diferiu entre os tratamentos sendo de 33,5 28,3, 32,7 e 29,8 kg/d, respectivamente. No período dois, monensina aumentou a eficiência alimentar e o teor de ureia no leite.

Dando sequência ao trabalho citado no parágrafo anterior, utilizando as mesmas vacas e o mesmo desenho experimental, Schären et al. (2017) encontraram que os animais que receberam OE reduziu a relação entre acetato e propionato quando comparado com monensina, sendo as médias 3,46 e 2,57, respectivamente. Além desse resultado, os autores encontraram que os OE não tiveram influência sob a população microbiana quando

comparado com o grupo controle. Esses resultados de população microbiana foram obtidos através de duas técnicas moleculares, de RNA ribossomal 16 S e de sequenciamento.

Em um trabalho *in vitro*, o CRINA quando suplementado a uma dose de 5 mg/d, equivalente a uma concentração final de 1,5 mg/L no fluido fermentador, aumentou a concentração total de AGV em 3,8 %, sem afetar outros parâmetros fermentativos. Entretanto, de acordo com os autores, doses elevadas do produto podem ser tóxicas aos microrganismos desejáveis e levar à redução da concentração total de AGV (CASTILLEJOS et al., 2005).

Um dos principais objetivos com CRINA como modulador de fermentação é diminuir a produção de metano. McIntosh et al. (2003) relataram que o crescimento das bactérias metanogênicas (*Methanobrevibacter smithii*) foi inibido, reduzindo consequentemente a produção do gás. Entretanto, Beauchemin e McGinn (2006), fornecendo 1g/dia desse produto para bovinos de corte, consumindo dieta de alta forragem, não observaram respostas sobre a emissão de metano.

Quanto à deaminação dos aa, os resultados encontrados são bem variados. McIntosh et al. (2003) encontraram 9 % de diminuição na taxa de deaminação *in vitro* em cultura de fluido ruminal proveniente de vacas suplementadas com dose de 1 g/d de CRINA. De acordo com Molero et al. (2014) esse resultado é devido à inibição do crescimento de microrganismos proteolíticos. Por outro lado, Castillejos et al. (2005), utilizando culturas *in vitro* durante oito dias de incubação a pH constante, observaram que, a adição de 1,5 mg/L de CRINA não teve efeito sobre a concentração de NH₃, fluxo de N bacteriano e dietético, degradação de proteína bruta, ou eficiência da síntese de proteína microbiana. Benchaar et al. (2007) não observaram mudanças na concentração ruminal de amônia, retenção de N e digestibilidade, quando vacas em lactação foram suplementadas com CRINA®, nas doses de 0,75 e de 2 g/dia.

Quanto à mudança do perfil de AG no leite, Benchaar et al. (2006) e Benchaar et al. (2007), não relataram nenhuma mudança quando as vacas foram suplementadas com 750

mg/dia de CRINA®. No entanto, o aumento da dose para 2 g/dia promoveu aumento da concentração de ácido linoleico conjugado (CLA) na gordura do leite.

2.4.5 DESEMPENHO DOS ANIMAIS SUPLEMENTADOS COM CRINA RUMINANTS

A inclusão do CRINA produto pode ser uma estratégia útil para melhorar a eficiência de utilização dos nutrientes e desempenho em ruminantes além de reduzir os efeitos nocivos sobre o meio ambiente (GIANNENAS et al., 2011). Meyer et al. (2009) observaram resultados promissores com o produto comercial CRINA, verificando eficiência alimentar de 0,153 para os novilhos que receberam o suplemento enquanto que a do grupo controle foi de 0,145.

Resultados positivos sobre o desempenho dos animais que receberam o suplemento já foram observados. Tassoul e Shaver (2009) avaliaram 40 vacas no período de transição suplementadas ou não com 1g/d de CRINA e encontraram redução no CMS em 7 % e não alteraram a produção de leite, encontrando uma tendência em melhorar a eficiência alimentar para os animais suplementados.

Kung Jr et al. (2008) verificaram aumento de 7 % e 8 % no CMS e na produção de leite, respectivamente e ausência de resposta sobre a eficiência alimentar de 30 vacas leiteiras suplementados com 1,2 g/d do CRINA quando comparado ao grupo controle. Com a mesma dose, em um estudo com 170 vacas em lactação, observou-se acréscimo de 1,6 kg/d produção de leite (VARGA et al., 2004).

Segundo Giannenas et al. (2011), a inclusão do CRINA aumentou a produção de leite de acordo com o aumento das doses do suplemento. Os autores utilizaram 80 ovelhas recebendo doses crescentes do suplementos de 0, 50, 100 e 150 mg/d kg MS de concentrado e a produção de leite diária observada foi 1,36; 1,49; 1,74 e 2,05 L/d, respectivamente.

Vendramini et al. (2016), em um trabalho com vacas leiteiras divididas em três tratamentos: suplementadas com CRINA 1 g/d; suplementadas com monensina e um grupo controle não suplementado, não encontraram diferença no CMS, na digestibilidade da MO, da MS e da PB. Entretanto o CRINA®, diminuiu a digestibilidade da PB quando comparado com monensina. Nos animais suplementados com CRINA a excreção de N nas fezes foi maior, o que pode explicar a menor digestibilidade da PB. Contudo, Benchaar et al. (2006) não encontraram diferença na digestibilidade da PB dos animais que receberam 2 g/d do suplemento quando comparado com o grupo controle. No entanto, a relação entre acetato e propionato foi maior para os animais suplementados com os óleos essenciais quando comparados com monensina. Já a concentração total (mmol/L) e a proporção de AGV no rúmen, não foram diferentes entre os tratamentos.

Benchaar et al. (2006) administrando 750 mg/d do aditivo em dietas de vacas leiteiras, não verificaram diferença na produção de leite. Quanto à composição do leite, somente a produção de lactose diferiu, sendo maior para animais suplementados com CRINA®. Entretanto, Benchaar et al. (2007) observaram diferença na lactose em animais suplementados com o mesmo composto de óleos essenciais quando comparados com não suplementado. Esses resultados concordam com relatados por Giannenas et al. (2011) que não encontraram efeito da adição de óleo essencial CRINA sobre a composição do leite. Entretanto, ureia e contagem de células somáticas, foram significativamente menores nos grupos que receberam 100 e 150 mg/kg de concentrado, podendo ser, parcialmente, um efeito de diluição, já que houve aumento na produção total de leite.

REFERÊNCIAS

ANDREAZZI, A. S, **Suplementação de amilase exógena em dietas de vacas leiteiras em lactação**. Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre. Escola de Veterinária Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - Uma breve revisão Phenolic compounds in foods .**A Brief Review**,. v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ARAÚJO R.C. **Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação ruminal *in vitro***. Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, PIRACICABA, 2010.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BASER, K. H. C.; DEMIRCI, F. Chemistry of Essential Oils. In: Berger R. G. **Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprospecting and Sustainability**, p. 43-86, 2007.

BEAUCHEMIN, K. A, et al. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.81, p. 37-47, 2003.

BEAUCHEMIN, K.A.; MCGINN, S.M. Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 6, p. 1489-1496, 2006.

BEDFORD, M. R., SCHULZE, H. Exogenous enzymes for pigs and poultry. **Nutrition Research Reviews**, v. 11, p. 91-114, 1998.

BENCHAAAR, C. et al. Dose-response to eugenol supplementation to dairy cow diets: Methane production, N excretion, ruminal fermentation, nutrient digestibility, milk production, and milk fatty acid profile. **Animal Feed Science and Technology**, v. 209, p. 51–59, 2015.

BENCHAAAR, C. et al. Eugenol for dairy cows fed low or high concentrate diets: Effects on digestion, ruminal fermentation characteristics, rumen microbial populations and milk fatty acid profile. **Animal Feed Science and Technology**, v. 178, p. 139–150, 2012.

BENCHAAAR, C. H. V. 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, p. 4352-4364, 2006.

BENCHAAAR, C., H. V. 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, p. 886-897, 2007.

BERGEN, W. G.; BATES, D. B. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 6, p. 1465-1483, 1984.

BITENCOURT, L. L. **Substituição de milho moido por milho reidratado e ensilado ou melaço de soja em vacas leiteiras**. Universidade Federal de Lavras, 2012.

BONA T. D. et al. Óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta no controle de Salmonella, Eimeria e Clostridium em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 5, p. 411-418, 2012.

BRODERICK, G. A. Effect of low level monensin supplementation on the production of dairy cows fed alfalfa silage. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 359-368, 2004.

BROUGHAN, C. Odours, emotions, and cognition: how odours may affect cognitive performance. **International Journal of Aromatherapy**, v12, n. 2, p. 92-98, 2002.

BUENDIA, G. et al. Effects of glucoamylase from *Aspergillus niger* on *in vitro* digestibility, of maize and sorghum and on lamb performance. **Agronomy Journal**, v.37, p.317-322, 2003.

BULÉON, A. et al. Starch granules: structure and biosynthesis. **International of Biological Macromolecules**, v. 23, n. 2, p. 85-112, 1998.

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. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 7, p. 2508- 2516, 2005.

CALSAMIGLIA, S. et al. Invited Review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2580–2595, 2007.

CARDOZO, P. W. et al. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 3230-3236, 2004.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, 2002.

CASPER, D. P. Factors affecting feed efficiency of dairy cows. **Proceedings Tri-State Dairy Nutrition Conference**, v. 22, n. 23, p. 133-144, 2008.

CASTILLEJOS, L. **Modificacion de la fermentacion microbiana ruminal mediante compuestos de aceites esenciales**. Tese apresentada para obtenção do título de

doutor. departament de ciència animal i dels aliments, Universidad Autónoma de Barcelona, 2005.

CASTILLEJOS, L., S. et al. Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. **Animal Feed Science and Technology**, v. 119, p. 29-41, 2005.

CASTILLEJOS, L.; CALSAMIGLIA, S.; MARTÍN-TERESO, J.; TER WIJLEN, H. *In vitro* evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot type diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, n. 4, p. 259-270, 2008.

CHAVES, A. V. et al. Effects of essential oils on the proteolytic, deaminative and Methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 88, n. 1, p. 117-122, 2008.

CHEN, G.; RUSSEL, J. B. Monensin sensitive, ammonia-producing bacteria from the rumen. **Applied Environ Microbiologic**, v. 55, p. 1052-1057, 1989.

COBELLIS, G.; TRABALZA-MARINUCCI, M.; YOU, Z. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. **Science of the Total Environment**, v. 89, p. 556-568, 2016.

CORREA, C. E. S. et al. Relationship between corn vitreousness and ruminal *in situ* starch degradability. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 11, p. 3008-12. 2002.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

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

CROSBY, M. M.; MENDOZA G. D.; MELGOZA L. M. et al. Effects of *Bacillus licheniformis* amylase on starch digestibility and sheep performance. **Journal of Applied Animal Research**, v.30, p.133-136, 2006.

DEFRAIN, J. M. et al. Effects of dietary alpha-amylase on metabolism and performance of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 12, p. 4405–4413, 2005.

DELESPAUL, Q. et al. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, p. 256-266, 2000.

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, 2007.

DILORENZO, N.; et al. Effects of grain processing and supplementation with exogenous amylase on nutrient digestibility in feedlot diets. **Livestock Science**, v.137, p.178-184, 2010.

DORMAN H. J. D.; DEANS S. G. Antimicrobial agents from plants: anti- bacterial activity of plant volatile oil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308-316, 2000.

DRONG, C. et al. Effect of monensin and essential oils on performance and energy metabolism of transition dairy cows. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 100, p. 537-551, 2016.

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 Dairy Science**, v. 91, p. 1334-1346, 2008.

DURAK, I. et al. Effects of garlic extract consumption on plasma and erythrocyte antioxidant parameters in atherosclerotic patients. **Livestock Science**, v. 75, p. 1959-1966, 2004.

EKINCI, C.; BRODERICK, G. A. Effect of processing high moisture ear corn on ruminal fermentation and milk yield. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 12, p. 3298-3307, 1997.

EL-HAG, E. A. et al, Toxic and growth retarding effects of three plant extracts on *Culex pipiens* larvae. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 388-392, 1999.

ELLIOTT, R.; et al. The influence of anaerobic fungi on rumen volatile fatty acid concentrations in vivo. **Journal of Agricultural Science**, v.109, n.1, p.13-17, 1987.

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

EVRENDILEK, G. A. Empirical prediction and validation of antibacterial inhibitory effects of various plant essential oils on common pathogenic bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 202, p. 35-41, 2015.

FAGUNDES, N. S., et al. Enzimas na alimentação de ruminantes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.5, n. 1, p.498-503, 2008.

FANDIÑO, I.; et al. Anise and capsicum as alternatives to monensin to modify rumen fermentation in beef heifers fed a high concentrate diet. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, n. 4, p. 409-417, 2008.

FERRARETTO, L. F. et al. Effect of feeding a reduced-starch diet with or without amylase addition on lactation performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 3, p. 1490-1499, 2011.

FERRARETTO, L. F.; CRUMP, P. M.; SHAVER, R. D. Effect of cereal grain type and corn grain harvesting and processing methods on intake, digestion, and milk production by dairy cows through a meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 1, p. 533-550, 2013.

FITZGERALD, D. J. M. et al. Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 104-113, 2004.

FREITAS, R.; PICOLI, S. U. A coloração de Gram e as variações na sua execução. **Newslab**, v. 82, n. 1, p. 124-127, 2007.

GALLO A. et al. Short communication: The effect of an exogenous enzyme with amylolytic activity on gas production and *in vitro* rumen starch degradability of small and large particles of corn or barley meals. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 5, p. 3902-06, 2016.

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, p. 1810-1817, 2010.

GENCOGLU, H. et al. Effect of feeding a reduced-starch diet with or without amylase addition on lactation performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 2, p. 723-732, 2010.

GIANNENAS, I et al. Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in Chios dairy ewes. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 5569-5577, 2011.

GUPTA, R. et al. Microbial alfa-amylases: A biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.

GUTIÉRREZ, C. G. D. et al. Effect of exogenous amylase or glucoamylase dose on *in situ* ruminal digestion of corn and sorghum. **Journal of Applied Animal Research**, v. 27, p. 7-10, 2005.

HAMMER K. A.; HEEL K. A. Use of multiparameter flow cytometry to determine the effects of monoterpenoids and phenylpropanoids on membrane polarity and permeability in Staphylococci and Enterococci. **Intetnational Journal Antimicrobiology**, v. 40, p. 239-245, 2012.

HARGER, C; SPRADA, D; HIRATSUKA, E. Amilase Fúngica. **Bioquímica das Fermentações**, 56 p, 1982.

HARMON, D. L., et al. Factors affecting intestinal starch digestion in ruminants: A review. **Canadian Journal of Animal Science**. V. 84, p. 309-318, 2004.

HART, K. J. et al. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 147, p. 8-35, 2008.

HATEW, B. et al. Effects of dietary starch content and rate of fermentation on methane production in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 1, p. 486-499, 2015.

HOFFMAN, P. C. et al. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2465-2474, 2011.

HRISTOV, A. N. et al. Effect of exogenous polysaccharide degrading enzyme preparations on ruminal fermentation and digestibility of nutrients in dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p.182-193, 2008.

HRISTOV, A. N.; MCALLISTER T. A.; CHENG K. J.. Stability of exogenous polysaccharide- degrading enzymes in the rumen. **Animal Feed Science Technology**, v. 76, p. 161-168, 1998.

HUNTINGTON, G. B. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. **Journal of Animal Science**, v. 75, p.852-867, 1997.

HUNTINGTON, G. G. D. et al. Sites, rates, and limits of starch digestion and glucose metabolism in growing cattle. **Journal of Animal Science**, v. 84, p.14-24, 2006.

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, 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 Microbiology**, v. 60, p. 65-71, 2014.

KLEVENHUSEN, F., A. et al. A meta-analysis of effects of chemical composition of incubated diet and bioactive compounds on *in vitro* ruminal fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 61-69, 2012.

KLINGERMAN, C. M. et al. An evaluation of exogenous enzymes with amylolytic activity for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 3, p. 1050–1059, 2009.

KOLLING, G. J. **Extratos de orégano e chá verde como aditivos para bovinos leiteiros**. Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor. Faculdade de Agronomia Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

KREIKEMEIER, K. K., et al. Effect of various levels of abomasal glucose, corn starch and corn dextrin on small intestinal disappearance and net glucose absorption. **Journal of Animal Science**. v.69 p.328, 1991.

KUNG Jr, L. et al. A blend of essential oils used as additive to alter silage fermentation or used as feed additive for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p.4793- 4800, 2008.

LANGHOUT, P. New additives for broiler chickens. **Chickens Feed Mix**, v.18, n.6, p.24-27, 2000.

LEHNINGER, A. L. **Princípio de bioquímica**, 4^a ed. São Paulo, Savier. p.105, 1998.

LENG, R. A. Formation and production of volatile fatty acids in the rumen. In: PHILLIPSON, A. T. (Ed.). **Physiology of digestion and metabolism in the ruminant**, p. 406-421, 1970.

LIMA, C. F. et al. Evaluation of toxic/protective effects of the essential oil of *Salvia officinalis* on freshly isolated rat hepatocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 457-465, 2004.

LOURENÇO, M. et al. Effects of saponins, quercetin, eugenol, and cinnamaldehyde on fatty acid biohydrogenation of forage polyunsaturated fatty acids in dual-flow continuous culture fermenters. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 11, p. 3045-3053, 2008.

MACHEBOEUF, D. Dose–response effects of essential oils on *in vitro* fermentation activity of the rumen microbial population. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 335–350, 2008.

MCALLISTER, T. A. et al, Dietary, environmental and microbial aspects of methane production in ruminants. **Canadian Journal Animal Science**, v. 76, p. 231–243, 1996.

MCALLISTER, T. A. et al. Enzymes in ruminant diets. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Eds.). . **Enzymes in farm animal nutrition**, p. 273–298, 2001.

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, p. 5011–5014, 2003.

MCLEOD, K. R. et al. Influence of ruminal and postruminal starch infusion on energy balance in growing steers. **Energy metabolism of farm animals**, p. 385–388, 2001.

MENDOZA, L.; WILKENS, M.; URZUA, A. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 58, n. 2, p. 85–88, 1997.

MEYER, N. F. et al. Effect of essential oils, tylosin, and monensin on finishing steer performance, carcass characteristics, liver abscesses, ruminal fermentation, and digestibility. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 7, p. 2346–2354, 2009.

MILLEZI, A. F et al. *In vitro* antimicrobial properties of plant essential oils *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus* and *Laurus nobilis* against five important foodborne pathogens. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n.1, p. 167–172, 2012.

MILLS, J. A. N. et al. A mechanistic model of small intestinal starch digestion and glucose uptake in the cow. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 1-21, 2016.

MOHARRERY, A.; LARSEN, M.; WEISBJERG, M. R. Starch digestion in the rumen, small intestine, and hind gut of dairy cows - A meta-analysis. **Animal Feed Science and Technology**, v. 192, p. 1-14, 2014.

MOLERO, R. et al. Effects of a specific blend of essential oil components on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate ratios. **Animal Feed Science and Technology**, v. 114, p. 91-104, 2004.

MORA, J. G. et al. Productive response and ruminal fermentation in sheep fed with sorghum grain treated with amylases. **Agrociencia**, v. 36, p. 31-39, 2002.

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

MORGAVI, D. P. et al. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1310-1321, 2000.

MOSCARDINI, S.; WRIGHT, T. C.; LUIMES, P. H. Effects of rumen undegradable protein and feed intake on purine derivative and urea nitrogen: comparison with predictions from the Cornell Net Carbohydrate and Protein System. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 9, p. 2421-2429, 1998.

NAGARAJA, T. G et al. The rumen microbial ecosystem.. **Blackie Academic and Professional**, p. 523-632, 1997.

Nagaraja, T. G. et al. Prevention of lactic acidosis in cattle by lasalocid or monensin. **Journal of animal science**, v. 53, p. 206-216, 1981.

NEWBOLD, C. J. et al. Effects of a specific blend of essential oil components on rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 114, p. 105-112, 2004.

NOCEK, J. E.; TAMMINGA, S. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3598-3629, 1991.

NOZIÈRE, P. et al. Amylase addition increases starch ruminal digestion in first-lactation cows fed high and low starch diets. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 4, p. 2319–28, 2014.

NOZIERE, P.; MICHALET-DOREAU, B. Effects of amount and availability of starch on amylolytic activity of ruminal solid-associated microorganisms. **Science of Food and Agriculture**, v. 73, p. 417-476, 1997.

OBA, M.; ALLEN M. S. Effects of corn grain conservation method on feeding behavior and productivity of lactating dairy cows at two dietary starch concentrations. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 1, p. 174-183, 2003a.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Effects of corn grain conservation method on ruminal digestion kinetics for lactating dairy cows at two dietary starch concentrations. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 1, p. 184-194, 2003b.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Effects of diet fermentability on efficiency of microbial nitrogen production in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 1, p. 195-207, 2003 c.

OETTING, L. L. et al. Efeito de extratos vegetais e antimicrobianos sobre a digestibilidade aparente, o desempenho, a morfometria dos órgãos e a histologia intestinal de leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1389-1397, 2006.

OH, H. K. et al. Effect of various essential oils isolated from Douglas fir needles upon sheep, deer rumen microbial activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 15, p. 777-784, 1967.

OLIVEIRA, J. G.; ABREU FILHO, B. A. Propriedade antimicrobiana do eugenol frente às amostras de *Alicyclobacillus spp* soladas de suco de laranja Antimicrobial properties of eugenol on *Alicyclobacillus spp* isolated from orange juice. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 2, p. 2-6, 2012.

OLIYNYK, M. et al. Analysis of the biosynthetic gene cluster for the polyether

antibiotic monensin in *Streptomyces cinnamonensis* and evidence for the role of monB and monC genes in oxidative cyclization. **Molecular Microbiology**, v. 49, p. 1179–1190, 2003.

OWENS, F. N. et al. Acidosis in cattle: a review. **Jornal of Animal Science**, v. 76, p. 275-286, 1998.

PACHECO, S. M. V; DAMASIO, F. **Vanilina: Origem, Propriedades e Produção**, v. 32, 2010.

PAES, M. C. D. Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho. **Circular Técnico Embrapa**, v.75, p. 16, 2006.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. Enzyme Technology. **Asiatech Publishers**, v.1, 2005.

PHILIPPEAU, C.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of genotype and ensiling of com grain on *in situ* degradation of starch in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.8, p.2178-2184, 1997.

PLANCHOT, V. et al. Extensive degradation of native starch granules by alpha-amylase from *Aspergillus fumigatus*. **Journal Cereal Science**, v. 21, p. 163-171, 1995.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, n. 1, p. 250-264, 2014.

REYNOLDS, C. K. et al. Net portal-drained visceral and hepatic metabolism of glucose, L- lactate, and nitrogenous compounds in lactating holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 7, p. 1803-1812, 1988.

RICHARDSON, L. F. et al. Effect of monensin on rumen fermentation *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Animal Science**, v. 43, p. 657-664, 1976.

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

RUSSELL, J. B. A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: effects on ion flux and protonmotive force. **Journal of Animal Science**, v. 64, n. 5, p. 1519-1525, 1987.

RUSSELL, J. B.; RYCHLIK, J. L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Journal of Agricultural Science**, v. 292, n. 5519, p. 1119-1122, 2001.

RUSSELL, J. R.; HINO, T. Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*: A spiraling effect that contributes to rumen acidosis. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 7, p. 1712-1721, 1985.

RUSSELL, J.B.; HOULIHAN, A.J. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 1, p. 65-74, 2003.

RUSSELL, J.B.; STROBEL, L.H. Effects of additives on *in vitro* ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another gram-positive antibiotic. **Journal of Animal Science**, v. 66, n.3, p.552-558, 1989.

SALMAN, A.K.; PAZIANI, S.F.; SOARES, J.P.G. Utilização de ionóforos para bovinos de corte. **Porto Velho: Embrapa Rondônia (Documento 101)**, 24p, 2006.

SAMII, S. S. et al. Effects of limonene on ruminal *Fusobacterium necrophorum* concentrations, fermentation, and lysine degradation in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 94, p. 3420–3430, 2016.

SCHÄREN M. et al. Differential effects of monensin and a blend of essential oils on rumen microbiota composition of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 4, p. 2765-2783, 2017.

SCHMIDT, E. Production of essential oils. **Handbook of Essential oil: science, technology, and applications**, ed. 1, p. 83-120, 2010.

SIMÕES C. M. O; SPITZER V. Óleos voláteis, p.387-416. In: SIMÕES C.M.O., et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 1999.

SIVARAMAKRISHNAN, S. et al. alpha-amylases from microbial sources - An overview on recent developments. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 173-184, 2006.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Food Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 118-122, 1998.

TAI, A. et al. Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 181, p. 170-177, 2011.

TASSOUL, M. D.; SHAVER, R. D. Effect of a mixture of supplemental dietary plant essential oils on performance of periparturient and early lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p.1734-1744, 2009.

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

THEURER, C. B. et al. Invited review: summary of steam flaking corn or sorghum grain for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 1950–1959, 1999.

TRICARICO, J. M.; JOHNSTON, J. D.; DAWSON, K. A. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae* alpha amylase. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, n. 4, p. 136–150, 2007.

TRICARICO, J.M. et al. Effects of a dietary *Aspergillus oryzae* extract containing α -amylase activity on performance and carcass characteristics in finishing beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 802-811, 2006.

TSAO, R.; YU, Q. Nematicidal activity of monoterpenoid compounds against economically important nematodes in agriculture. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, p. 350-354, 2000.

UGURU, G. C. et al. Purification, characterization and mutagenic enhancement of a thermoactive alpha-amylase from *Bacillus subtilis*. **Journal Industry Microbiology and Biotechnology**. v. 19, p. 273–279, 1997.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p.1561-1568, 2002.

VAN SOEST, P.J. Nutritional Ecology of the Ruminant. **Cornell University Press**, 476p. 1994.

VARGA, G., et al. Effect of crina ruminants, a mixture of essential oil components, on continuous culture fermentation and milk production of lactating cows. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 1, p. 334- 345, 2004.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; CABO, M. L.; RODRIGUEZ-HERRERA, J. J. Antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus aureus* biofilms. **Animal Feed Science and Technology**, v. 67, p. 157-163, 2014.

VELLUTI, A. et al. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, p. 145-154, 2003.

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.

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

WANG, C. J.; WANG, S. P.; ZHOU, H. Influences of flavomycin, ropadiar, and saponin on nutrient digestibility, rumen fermentation, and methane emission from sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 148, n. 2, p. 157-166, 2009.

WEBER, F. H. et al. Caracterização físico-química, reológica, morfológica e térmica dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 748-753, 2009.

WEISS, W. P.; STEINBERG, W.; ENGSTROM, M. Milk production and nutrient digestibility by dairy cows when fed exogenous amylase with coarsely ground dry corn. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2492–2499, 2011.

YANG, W. Z. et al. Cinnamaldehyde in feedlot cattle diets: Intake, growth performance, carcass characteristics, and blood metabolites. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 3, p. 1082-1092, 2010.

YUKAWA, T. A. et al. Prophylactic treatment of cytomegalovirus infection with traditional herbs. **Antiviral Research**, v. 32, p. 63–70, 1996.

ZAGO, J. A. A. et al. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 828-833, 2009.

ZHANG, W. et al. Improving functional value of meat products. **Meat Science, Barking**, v. 86, n. 1, p. 15-31, 2010.

ZHOU, Z.; MENG, Q.; YU, Z. Effects of methanogenic inhibitors on methane production and abundances of methanogens and cellulolytic bacteria in *in vitro* ruminal cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 8, p. 2634-2639, 2011.

2. ARTIGO

Response of dairy cows to exogenous amylase supplementation of diets containing monensin and the substitution of monensin by essential oils

ABSTRACT

Amylases and essential oils are additives of dairy cows that improve fermentation and ruminal health in dairy cows. The objectives of this study were to evaluate the response of dairy cows to supplementation with an exogenous amylase in a basal diet containing monensin (**MON**) varying in ruminal acidogenic capacity, and to evaluate the substitution of monensin by a blend of essential oils (**EO**, Crina Ruminants, DSM) in a diet containing AM. Thirty Holstein cows (207 ± 100 DIM) were individually fed a standard TMR for two weeks. At the end of the standardization period, cows were blocked based on parity and milk yield and were randomly allocated to one of three treatments in eight weeks of comparison period. Treatments were MON (M 15 mg/kg of DM), MON plus AMY (MA, 15 mg/kg of DM plus Ronozyme RumiStar, 375 KNU/kg of DM), and EO plus amylase (EA, 50 mg/kg of DM plus Ronozyme RumiStar, 375 KNU/kg of DM). Two diets were fed in sequence during the comparison period. A diet containing rehydrated and ensiled finely ground mature corn and finely ground mature corn was fed during weeks one to four (REC) and another diet formulated only with finely ground mature corn was fed during weeks five to eight (FGC). For all variables, two contrasts were tested: M vs. MA and MA vs. EA. Milk production and dry matter intake were not different between treatments. The

substitution to MON by EO reduced milk fat yield (1.208 *vs.* 1.109 kg/d). Did not affect MUN in cows fed MA compared with M in REC diets (18.1 *vs.* 18.2 mg/dL), but decreased in FGC diets (20.3 *vs.* 22.6 mg/dL). The amylase supplementation tended to increase feed efficiency Milk/DMI and ECM/DMI when associated to M (1.59 *vs.* 1.55 and 1.59 *vs.* 1.51), however, the supplementation of amylase associated to EO decreased compared to MA (1.54 *vs.* 1.59 and 1.48 *vs.* 1.59). The treatment EA increased the proportion of butyrate in reticular fluid compared with MA (10.3 *vs.* 9.6 % of total VFA). When MA was fed in REC diets it did not affect rumen pH compared with M alone (6.53 *vs.* 6.49), and decreased in FGC diets (6.57 *vs.* 7.09). The amylase tended to increase the proportion of daily intake in the morning and to reduce the proportion of daily intake in the afternoon. Cows fed EA reduced chewing by 55 min/d compared with MA. The Addition of amylase increased feed efficiency in dairy cows only when fed with MON, the EO eliminated the positive effect of amylase.

Key words: amylase, essential oils, ionophores, feed efficiency, reconstituted corn.

INTRODUCTION

The supplementation of lactating cows with exogenous amylase stable in rumen fluid (Klingerman et al., 2009) can increase ruminal starch digestibility (Nozière et al., 2014), but total tract starch digestibility may not be increased (Gencoglu et al., 2010; Weiss et al., 2011; Andreazzi, 2014; Nozière et al., 2014), due to compensatory intestinal digestion. Total tract NDF digestibility can also be improved by exogenous amylase (Gencoglu et al., 2010; Weiss et al., 2011), supposedly by increased ruminal availability to fiber digesting bacteria of starch hydrolysis products (Cotta, 1988; Tricarico et al., 2008).

Long-term effects of amylase supplementation on lactation performance of dairy cows have been controversial. Amylase supplementation reduced DMI and increased milk yield and feed efficiency of lactating cows fed a 32 % starch diet for 9 weeks (Andreazzi, 2014). However, the supplementation of a 21 % starch diet with amylase for 10 weeks increased milk yield, had no effect on DMI, and tended to increase the milk to DMI ratio (Ferraretto et al., 2011). Gencoglu et al. (2010) observed a reduction in DMI, no effect on milk yield, and an increase in feed efficiency when a 21 % starch diet was supplemented with amylase for 12 weeks. Weiss et al. (2011) supplemented amylase to lactating cows fed a 26 % starch diet for 14 weeks and did not detect responses in milk yield, DMI, and feed efficiency.

Monensin has been extensively used by the dairy industry as a tool to manipulate ruminal fermentation (Ellis et al., 2012) and thoroughly meta-analysis on the efficacy of

MON to dairy cows have been published (Ipharraguerre and Clark, 2003, Duffield et al., 2008). The supplementation of MON to dairy cows can promote gain in feed efficiency usually driven by reduced DMI and increased milk yield (Duffield et al., 2008), being desirable environmentally since it can reduce methane (Appuhamy et al., 2013) and urinary N loss (Bergen and Bates, 1984). Monensin is also known to inhibit the growth of *Streptococcus bovis* bacteria (Russell and Strobel, 1989), desirable when diets with high ruminal acidogenic capacity are fed to lactating dairy cows

Although the supplementation of dairy cows with MON has potential to be favorable to animal health and productivity, a precautionary action of the European Union has banned the use of antibiotics as feed additives for animals to eliminate the risk of reducing their effectiveness as human medicinal products (Directive 1831/2003/ CCE, European Commission, 2003). Alternative rumen modulators, such as essential oils (**EO**), are an extensive group of plant produced organic compounds derived from secondary metabolism and have shown to have antimicrobial action against bacteria, protozoa, and fungi (Calsamiglia et al., 2007; Klevenhusen et al., 2012). The use of EO as feed additive is in agreement with the natural trend of the consumer of dairy products. The EO are a wide group of phytochemicals and additive and synergic effects can occur among chemicals, increasing their efficacy compared to compounds in single form (Michiels et al., 2007; Wang et al., 2016).

Animal responses to EO are inconsistent, since they may be influenced by the the blend of chemicals supplemented, dosage, composition of the basal diet, and animal physiological stage (Khiaosa-Ard and Zebeli, 2013; Wall et al., 2014). The variation among EO products preclude generalizations of the mode of action and direct comparisons among EO blends for dairy cattle. Crina[®] Ruminants is a blend of the EO thymol, guaiacol, eugenol, vanillin, and limonene coated with carbohydrates (Rossi, 1999). In vitro data has shown that Crina can reduce ruminal protein degradation (McIntosh et al., 2003). Tassoul and Shaver (2009) fed Crina from 3 weeks pre-partum to 15 weeks post-partum and observed reduced DMI, similar milk yield, a trend for increased feed efficiency, and a more negative energy balance in early lactation than control. Kung Jr. et al. (2008) observed increased DMI and milk yield when Crina was supplemented to mid-lactation dairy cows for 9 weeks, but feed efficiency was similar. The animal response to Crina seems to be variable and requires further evaluation.

The objectives with this experiment were to evaluate the effect of supplementing a MON containing diet with exogenous amylase and the substitution of MON with Crina on ruminal fermentation profile, digestibility, chewing and feed sorting behavior, and performance of mid-lactation dairy cows over an 8-week period. Our hypothesis was that the supplementation of amylase and Crina would have positive effects on ruminal fermentation and nutrient utilization that may lead to improved animal performance and feed efficiency.

MATERIALS AND METHODS

The protocol was approved by the University of Lavras Bioethics Committee in Utilization of Animals.

Cows and Treatments

The experiment was conducted from August 3th to October 18th 2015, in an open walled sand bedded tie stall barn with fans and high pressure sprinklers at the Better Nature Research Center (<http://www.holandesflamma.com.br>), located at Ijaci, Minas Gerais, Brazil.

Thirty-three Holstein cows (207 ± 100 DIM and 34.6 ± 5.1 kg/d of milk at the beginning of the experiment, 9 primiparous) were individually fed the same TMR for a 3-wk standardization period. On d 18 to 21 of the standardization period, DMI, milk yield, milk solids, feed efficiency, MUN, BW, and BCS were measured and used as covariate in the statistical model. Cows were then blocked in groups of 3 primarily by parity (1 vs. > 1) and secondarily by milk yield. Within a block, each cow received a treatment for 56 d, in a covariate adjusted randomized block design with repeated measures over time. The treatments were: MON (**M.** 15 mg/kg of TMR DM, Elanco Animal Health, São Paulo, Brazil), the same dosage of MON plus amylase (**MA.** Ronozyme RumiStar, 630 mg/kg of TMR DM, patent WO2015128366A2, DSM Nutritional Products, São Paulo, Brazil), or the same dosage of amylase plus a carbohydrate coated blend of essential oils (**EA.** Crina Ruminants, 50 mg/kg of TMR DM, a blend of thymol, guaiacol, eugenol, vanillin, and

limonene, patent US005565211, DSM Nutritional Products, São Paulo, Brazil). The treatments were added to the TMR as factory blends with minerals and vitamins.

Two diets differing in ruminal starch fermentability and with similar nutrient and ingredient densities were fed in sequence during the 8-week comparison period. A diet containing rehydrated and ensiled finely ground mature corn (**REC**) and finely ground mature corn (**FGC**) was fed from d 1 to 28 (faster rumen degradable starch) and another diet with FGC and without REC was fed from d 29 to 56 (slower rumen degradable starch). The composition of the diets in offered ingredients and consumed nutrients are reported in Table 1.

Sample Collection and Analyses

The TMR was mixed twice daily at approximately 0600 and 1300 h in a 1.2 m³ stationary vertical mixer (Unimix 1200, Casale Equipamentos Ltda. São Carlos, Brazil). Cows had access to new feed at 0700 h and 1300 h. Individual cow intake was assessed throughout the experiment by recording the amount of feed offered and orts daily. Feed was offered to obtain between 7 to 10 % daily refusals. Feed ingredients and orts per cow were sampled daily and composite samples were made per week. Weekly composites were dried in a forced-air oven at 55 °C for 72 h and ground through a 1-mm diameter mesh screen in a Willey mill (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ). The DM concentration was determined by drying at 100 °C for 24 h. The CP was determined by micro Kjeldahl analysis and ether extract (**EE**) as in AOAC International (2012). Ash was analyzed by

incineration at 550 °C for 8 h. The NDF was determined by filtration in porous crucibles with heat stable amylase and sodium sulfite (Van Soest et al., 1991). Starch was analyzed enzymatically according to Hall (2009). The NFC fraction was calculated as $100 - (\text{CP} + \text{EE} + \text{ash} + \text{NDF})$. The composition of the offered TMR in ingredients was calculated based on the offered as fed amounts of each feed multiplied by its DM concentration. The composition of the consumed diet in nutrients was the nutrient intake of all cows on a treatment (offered – orts) divided by the total DMI.

Cows were milked 3 x/d starting at 0500 h, 1300 h, and 2000 h in an adjacent herringbone parlor and milk yield was recorded daily. During d 11 to 14 of the standardization period and on d 6 and 7 of each week of the comparison period milk samples were obtained from each milking and a proportional daily milk composite was made per day. Composite milk samples were stored under refrigeration in flasks containing 2-bromo-2-nitropropane-1-3-diol preservative until analysis of solids and MUN concentrations within at most 4 d by mid-infrared analysis (Bentley 2000. Bentley Instruments Inc., Chaska, MN) at the Centralized Laboratory of the Paraná State Holstein Breeders Association (APCBRH, Curitiba, Brazil). Yields (kg/d) of fat, protein, lactose, and total solids were calculated per cow per week. Milk energy secretion (**Milk E**; Mcal/d) was calculated (NRC, 2001): $[(0.0929 \times \% \text{ fat}) + (0.0547 \times \% \text{ protein}) + (0.0395 \times \% \text{ lactose})] \times \text{kg of milk}$. The secretion of ECM (kg/d) was calculated as: $\text{Milk E}/0.70$

(assumes 0.70 Mcal/kg for milk with 3.7 % fat, 3.2 % protein, and 4.6 % lactose). Feed efficiencies were calculated as milk yield/DMI and ECM/DMI.

The BCS (1 to 5. Wildman et al., 1982) was measured by 3 independent evaluators on d 0, 14, 28, 42, and 56. After the morning milking, BW was measured on the same days. The daily BW gain was calculated as the slope of the linear regression of BW over d 0 to 56. The subcutaneous fat thickness (**SFT**, mm) was evaluated on d 28 and 56 by ultrasound (Model Aloka SSD 500 v, linear probe of 18 cm, Aloka, Japan). Images of the pelvic region between the ischium and pubis obtained on the right side of the cows were analyzed with the BioSoft Toolbox II for Beef software (Biotronics Inc., Amyes, Iowa, USA).

The total tract apparent digestibility of DM, OM, NDF, and starch were determined on d 26 to 28 (Diet REC) and 54 to 56 (Diet FGC) by total collection of feces. Feces were collected in buckets concurrent to defecation during three 8-h sampling periods and weighed. The second and third sampling periods were each delayed by 8 h, thus representing a 24-h collection. Fecal aliquots (equal fresh weight basis) were immediately frozen along the collection period and a composite sample was formed per cow. Composite fecal samples were dehydrated for 72 h at 55 °C in a forced air oven. Concentrations of DM, NDF, starch, and ash were determined as previously described. The daily digestible OM intake (DOMI) was calculated. The OM digestibility coefficient determined on week 4

was used to calculate the daily DOMI of d 1 to 28 and the coefficient of week 8 was used for d 29 to 56.

Fecal guanine concentration was determined on the same samples used for the evaluation of total tract digestibility to estimate microbial yield in the large intestine. The assay was based on the procedures described by Zinn and Owens (1986) and Aharoni and Tagari (1991). Acetic acid (0.1 *M*) was used to dilute the sample after hydrolysis with 70 % perchloric acid. Ammonium phosphate monobasic (8 ml, 0.2 *M*) and ammonium phosphate dibasic (1 ml, 0.2 *M*) diluted the filtrate (0.5 ml) and the silver nitrate (0.5 ml, 0.4 *M*). Standards were prepared by serial 1:2 dilution of a 0.0125 *M* guanine solution (Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WI). Absorbance was measured at 254 nm. Guanine excretion (g/d) over DOMI (kg/d) was calculated as an indirect measure of partition of digestion between rumen and intestines.

Total urinary output was collected in buckets, simultaneously to fecal sampling, to estimate the relative ruminal microbial synthesis based on allantoin excretion (mmol/d). A 20 % sulfuric acid solution (200 mL) was added to 20 L buckets and urine was added to it during the collection period. At the end of the 3-d collection period, composite urine samples were diluted 1:5 with 4 % sulfuric acid solution and frozen at - 20 °C. Allantoin was analyzed according to Chen and Gomes (1992). The efficiency of microbial growth was estimated as Allantoin/DOMI.

Chewing activity and nutrient and feed sorting behaviors were measured on d 24 and 52 in which feed availability at 1300 h was increased to obtain daily refusals around 20 % of offered TMR to exacerbate the expression of sorting behavior (Dohme et al., 2008). Ingestion and rumination (min/d) were evaluated by continuous observation of the buccal activity of each cow at 5-min intervals continuously for 24 h. Buccal activities recorded were: water ingestion, feed ingestion, rumination, and idleness. Chewing was defined as ingestion + rumination. Ingestion, rumination, and chewing per unit of DMI were calculated using the intake of the days in which chewing activity was evaluated. A meal was empirically defined by at least two consecutive 5-min ingestion events following at least 10 min of idleness or rumination. To generate the meal pattern data, the minimum 10-min intermeal interval was adopted based on the reasoning of Mullins et al. (2012) for a 12-min interval. Meal duration was the ratio between ingestion time (min/d) and meals/d. The intermeal interval (min) was calculated as total time (1440 min) - ingestion time over the number of meals - 1. The duration of the first daily meal (conditioned meal) was measured with a chronometer. Meal size was the ratio between DMI and number of meal. Five evaluators observed the behavior of all cows after offering feed at 0700 h until the last cow finished its first meal.

The proportion of daily intake in the morning (0700 to 1300 h), afternoon (1300 to 1900 h), and night (1900 to 0700 h) was determined by measuring feed availability per cow at 0700, 1300, and 1900 h and orts at 1300, 1900, and 0700 h on d 24 and 52. Particle

size sorting behavior was evaluated as in Leonardi and Armentano (2003). The proportion of particles above the 19 mm mesh diameter screen and above and below the 8 mm mesh screen of the Penn State Particle Separator (Lammers et al., 1996) was evaluated at 0700 and 1300 h for the offered TMR and at 1300, 1900, and 0700 h for refusals. Feed refusals at 1300 h were mixed with feed offered at 1300 h for measurement of the offered TMR particle size of each cow. The predicted intake (as-fed basis) of particles on each screen was: % TMR retained on screen x kg of TMR consumed. The observed intake of particles was: % TMR retained on screen x kg of TMR offered - % orts retained on screen x kg of orts. For the calculation of starch and NDF sorting behavior the predicted intake of a nutrient was: % of nutrient in offered TMR DM x kg of DMI. The observed intake was: % of nutrient in offered TMR DM x kg of offered TMR DM - % of nutrient in orts DM x kg of orts DM. The selection index was: $100 \times (\text{observed intake}/\text{predicted intake})$. Sorting values below 100 % represent selective refusal, above 100 % represent preferential intake, and equal to 100 % represent no selection. During the days of evaluation of ingestion and sorting behavior the

Blood samples from the coccygeal vessels were obtained on d 25 and 53 to determine the concentration of BUN (Urea 500. Doles Reagentes para Laboratórios Ltda, Goiânia, Brazil). Samples for BUN were obtained immediately before the first daily feeding and at 2, 4, 8, 12, and 20 h after morning feeding. The blood collected in vacutainer tubes containing EDTA was immediately refrigerated, centrifuged at $2,118 \times g$

for 10 min, and the plasma was frozen at - 20 °C. Plasma glucose concentration on d 10, 25, 38, and 53 was analyzed in samples collected 12 ± 0.5 h post-feeding, with vacutainer tubes containing EDTA and potassium fluoride, centrifuged at 2,000 x g for 10 min, and stored at - 20 °C (Glicose Enzimática Líquida. Doles Reagentes para Laboratórios Ltda, Goiânia, Brazil). Plasma D-lactate concentration was evaluated during d 25 and 53 on samples obtained 12 ± 0.5 h post-feeding (D-Lactate Colorimetric Assay Kit, MAK058, Sigma Aldrich, St. Louis, MO).

On d 28 and 56, ruminal fluid samples were obtained with a flexible oro-gastric tube at 12 ± 1.2 h after the morning feeding, at random within block. Ruminal fluid pH was measured immediately (HI 2210, Hanna Instruments Brazil, Barueri, Brazil). The VFA were analyzed by GLC (7890A. Agilent Technologies, Wilmington, DE) equipped with capillary fused silica column (19091F- 112; 25 m, 0,320 mm, 0,50 μ m, J&W Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA). The total chromatographic run time was 16.5 min, divided into three heating cycles, as follows: 80 °C (1 min), 120 °C (20 °C/min for 3 min), and 205 °C (10 °C/min for 2 min).

Ruminal Degradation of Corn Samples

The ruminal in situ DM degradations of composite samples of REC and FGC were evaluated in 4 rumen cannulated cows in mid-lactation (26.3 ± 3.6 kg of milk) fed a corn silage, soybean meal, and REC based TMR. Corn samples were dried at 55 °C for 72 h and 5.52 ± 0.04 g samples were inserted into 10 × 20 cm polyester bags (TNT 100 g/m²,

viivatex Ltda, São Paulo, Brazil). Incubation times were 0, 3, 6, 18, and 48 h (duplicate bags on each time per cow). Bags were soaked for 30 s in warm water before incubations. After removal from the rumen bags were immersed in icy water for 15 min. The 0 h bags were immersed in water at room temperature for 30 min before washing with the incubated bags in 2 washing machine cycles. A 2-pool model was used to describe corn DM degradation kinetics. The fast degradable A fraction (% of DM) was the 0 h bag disappearance and the slowly degradable B fraction was $100 - A$. The fractional degradation rate of B (kd, %/h) was the slope of the linear regression of the natural logarithm of the bag residue as a proportion of the incubated sample size over times 0 to 48. The effective ruminal degradation (ERD) was $A + B \times [kd / (kd + kp)]$, where kp is the fractional passage rate of concentrates (6.8 %/h) estimated with the CNCPS equation for the average experimental cow and diet (Tylutki et al., 2008).

Statistical Analysis

Data was analyzed as repeated measures with the PROC MIXED of SAS (version 9.3, 2011; SAS Institute Inc., Cary, NC). The statistical model contained the continuous covariate effect (measurement of the same variable at the end of the standardization period), the random effect of block (1 to 11), the fixed effects of treatment (M, MA, EA) and time (days 1 to 56, weeks 1 to 8), and the interaction between treatment and time. For variables not measured during the standardization period, the same model was used, but without the covariate adjustment. The mean square for the effect of cow nested within

treatment was the error term to test the treatment effect in all models. The best covariance structure was defined by the Schwarz's Bayesian criteria among first-order autoregressive, compound symmetry, and unstructured. Degrees of freedom were calculated using the Kenward-Roger option. Pre-planned contrasts were: M vs. MA and MA vs. EA. When a treatment by week interaction was detected ($P \leq 0.05$), treatment means on weeks 4 and 8 were compared with the Bonferroni test at $P \leq 0.05$. Statistical significance, trends, and weak trends were considered at $P \leq 0.05$, $0.05 < P \leq 0.10$, and $0.10 < P \leq 0.15$, respectively.

RESULTS

The ruminal in situ incubations of corn showed that REC was more fermentable than FGC. The ruminal degradation of REC and FGC were, respectively (% of DM): 50.7 and 13.0 for time 0 h (Fraction A); 75.4 and 18.8 for time 3 h; 79.8 and 23.4 for time 6 h; 82.3 and 41.5 for time 18 h; and 86.2 and 68.7 for time 48 h. The kd of fraction B was 1.85 %/h for REC and 2.13 %/h for FGC and the ERD was 63.0 and 31.6 % of DM, respectively. Ensiling of finely ground mature corn increased fraction A and ERD and reduced the kd of fraction B. Starch concentration in the diet fed from d 1 to 28 (29.6 % of DM) was similar to the diet fed from d 29 to 56 (30.2 % of DM) (Table 1). The proportion of starch coming from whole plant corn silage was also similar between diets. The goal of obtaining diets differing in ruminal starch fermentability and with similar nutrient density was achieved.

Intake, lactation performance, BW, and BCS during the 56 d comparison period are in Table 2. There were no detectable treatment effects on milk yield, DMI, and BW change ($P \geq 0.18$ for contrasts). The addition of amylase to diet M (Diet MA) tended to increase Milk/DMI ($P = 0.08$) and ECM/DMI ($P = 0.09$). The replacement of monensin in diet MA with essential oils (Diet EA) reduced Milk/DMI ($P = 0.03$). Milk fat yield was lower (- 56 g/d) on EA than on MA ($P = 0.02$). Diet MA reduced MUN relative to M ($P < 0.01$).

Table 3 reports performance data when cows were intensively sampled during weeks 4 and 8. Similarly to the data for the entire experiment in Table 1, treatments had no effect on DMI and milk yield on weeks 4 and 8 ($P \geq 0.49$ for contrasts), although EA tended to reduce ECM relative to MA ($P = 0.10$). Milk fat yield was reduced ($P = 0.04$) and trends were observed for reduced fat % ($P = 0.08$) and increased protein % ($P = 0.08$) on EA compared to MA. Treatment MA tended ($P \leq 0.10$) to increase the three measures of feed efficiency relative to M, and EA reduced ECM/DMI ($P = 0.02$) and ECM/DMI ($P = 0.05$) relative to MA. A significant interaction between treatment and week ($P = 0.04$) was detected for MUN concentration. The MUN was lower on REC than FGC and was reduced by amylase only when FGC was fed

Ruminal fermentation profile is in Table 4. Treatment MA tended ($P = 0.07$) to reduce the molar proportion of butyrate relative to M, and EA increased ($P = 0.05$) the butyrate proportion relative to MA. The acetate to propionate ratio tended ($P = 0.08$) to be increased by EA compared to MA. Weak trends were detected for EA to increase the

acetate ($P = 0.14$) and to reduce the propionate ($P = 0.15$) proportions relative to MA. A weak trend ($P = 0.12$) was also detected for EA to reduce the concentration of D-lactate in plasma relative to MA. A significant interaction between treatment and week was detected for ruminal pH ($P = 0.02$). Ruminal pH was reduced by amylase only when the less fermentable diet was fed.

The total tract apparent digestibility of nutrients, plasma glucose concentration, and indirect measures of ruminal (urinary allantoin) and large intestine (fecal guanine) microbial yields are in Table 5. Treatments had no effect on nutrient digestibility, plasma glucose, and microbial yields ($P \geq 0.16$ for contrasts).

Starch, NDF, and feed particles sorting behaviors are in Table 6. Interactions between treatment and week were detected ($P \leq 0.05$) for particle size sorting behavior in the morning. Treatment EA induced preferential intake of long feed particles (> 19 mm) and no selection in favor of short particles (< 8 mm) relative to M only when the low fermentable diet was fed. In the afternoon, MA reduced the refusal of particles > 19 mm ($P = 0.02$) and induced less sorting in favor of particles < 8 mm ($P = 0.05$) than M. At night, cows on MA did not select against long particles as cows on M ($P < 0.01$) and EA induced rejection of long particles compared to MA ($P < 0.01$). Chewing and ingestion behaviors are in Table 7. Significant interactions between treatment and diet were not detected ($P \geq 0.11$). The number of meals per d was increased ($P = 0.02$) by MA relative to M. Trends were observed for MA to increase the proportion of daily intake in the morning ($P = 0.08$)

and to reduce the proportion of intake in the afternoon ($P = 0.07$). Treatment EA tended ($P = 0.08$) to reduce chewing (ingestion + rumination) per d at similar DMI ($P = 0.32$) relative to MA, but no difference was detected ($P = 0.30$) on chewing per DMI. A weak trend was observed ($P = 0.14$) for EA to reduce meal duration relative to MA.

The concentration of BUN over time is in Table 8. A trend was detected ($P = 0.10$) for BUN immediately before the morning feeding to be reduced by MA relative to M. Treatment EA reduced ($P = 0.02$) BUN at 8 h post-feeding relative to MA and tended to reduce ($P = 0.08$) BUN at 4 h and 12 h post-feeding.

DISCUSSION

Although treatments had no effect on DMI, milk yield, and BW change, amylase supplementation to the MON-containing diet tended to increase feed efficiency and the substitution of MON with Crina in a diet contain α -amylase reduced feed efficiency. The numerical changes induced by amylase supplementation were - 0.6 kg/d in DMI and + 0.5 kg/d in milk yield, and the replacement of MON with Crina induced + 0.8 kg/d in DMI and - 0.4 kg/d in milk yield. The experimental design did not have statistical power to detect such differences in DMI and milk yield, but differences with statistical support were detected for feed efficiency.

The response in feed efficiency was consistent over the duration of the experiment. Increased milk to DMI ratio in response to Ronozyme RumiStar have also been observed in the 9- to 12-week experiments of Gencoglu et al. (2010), Ferraretto et al. (2011), and

Andreazzi (2014). However, Weiss et al. (2011) did not detect an effect of this exogenous amylase product on feed efficiency of dairy cows over a 14-week period. Weiss et al. (2011) argued that the large particle size of the corn used in their experiment may have overwhelmed any effect of amylase on animal performance and intake of the 26 % starch diet. The experiment of Andreazzi (2014), using a blend of ensiled and ground corn grain in a 32 % starch diet, was the only long-term trial that detected a positive response in milk yield to amylase supplementation (+ 0.7 kg/d relative to control. $P = 0.02$). Experiments adopting diets with starch concentrations around 21 % of DM have not detected positive milk yield responses to exogenous amylase (Gencoglu et al., 2010; Ferraretto et al., 2011), suggesting that higher ruminal starch availability or the change in starch source with increased starch concentration in the diet may be involved in the amylase effect on lactation performance. The gain in feed efficiencies in response to amylase supplementation have been obtained by reductions in DMI of - 1.0 kg/d (Andreazzi, 2014), - 1.3 kg/d (Ferraretto et al., 2011), and - 3.2 kg/d (Gencoglu et al., 2010). The gain in feed efficiency due to the supplementation of amylase seems to be more frequently the result of reduction in DMI than to increased milk yield.

High starch diets often dilute the proportion of dietary starch coming from forage corn and increase the proportion coming from concentrates. Variation in starch source, similarly to variation in corn particle size (Knowlton et al., 1998), can affected both ruminal and intestinal starch digestibility and the potential effect of amylase

supplementation on animal performance. Nozière et al. (2014) observed that the gain in ruminal starch digestibility to exogenous amylase supplementation was higher when dietary starch concentration was increased from 20 to 30 % of DM, but total tract starch digestibility did not change in response to amylase and the high starch diet had higher total tract starch digestibility than the low starch diet. In the experiment of Nozière et al. (2014) the calculated intestinal starch digestibility was increased when amylase supplemented the high starch diet (95.8 vs. 93.9 % of the starch entering the duodenum) and was reduced when amylase supplemented the low starch diet (86.7 vs. 89.9 %). Exogenous amylase may be more favorable to cow performance when dietary starch content is high, although Weiss et al. (2011) evaluated that possibility and observed no positive amylase effect on cow performance when 15 or 26 % starch diets were formulated with coarsely ground corn.

The reduction in feed efficiency when Crina substituted MON was the result of numerical increase in DMI and reduction in milk yield. The supplementation of MON to dairy cows has been shown to promote gain in feed efficiency generally driven by increased milk yield and reduced DMI (Duffield et., 2008). Crina reduced early lactation DMI by - 1.8 kg/d, with no effect on milk yield in the experiment of Tassoul and Shaver (2009), and increased + 1.9 kg/d in both DMI and milk yield of mid-lactation cows (Kung Jr. et al., 2008). The response in lactation performance and intake of dairy cows to Crina does not seem to follow a predictable pattern. The various environmental, dietary, and

animal factors determining the lack of a general response pattern to Crina requires further evaluation (Khiaosa-Ard and Zebeli, 2013). The replacement of MON with Crina was not advantageous to animal performance in our experiment.

Ruminal VFA profile was not a plausible explanation for the positive effect of amylase supplementation on feed efficiency. The acetate to propionate ratio was similar in treatments M and MA, suggesting similarity in the energetic efficiency of the ruminal fermentation. Amylase supplementation had no major effect on ruminal VFA profile, except for a trend for reduced butyrate proportion. The reduction in butyrate proportion is in agreement with Nozière et al. (2014), although it was not observed by Andreazzi (2014). Increased butyrate proportion in ruminal fluid is a frequently reported response to other commercial amylase products (Tricarico et al., 2008). The similarity in plasma D-lactate concentration suggests that amylase supplementation had no effect on ruminal acidosis. Nozière et al. (2014) observed that exogenous amylase reduced the acetate to propionate ratio and increased amylase activity in ruminal fluid were a high dietary starch diet are fed, but had no effect on low starch. Therefore, changes in ruminal fermentation profile would be expect in our experiment, since we adopted a relatively high starch diet (30% of DM). However, Andreazzi et al. (2014) also did not detect an effect of amylase supplementation on the ruminal acetate to propionate ratio of a 32 % starch diet. There was no evidence to support that amylase increased the molar proportion of propionate, suggestive of increased net amount absorbed (Bauman et al., 1971), and fluid VFA induced the numerical

reduction in DMI by increased liver oxidation (Allen et al., 2009). Total tract NDF digestibility was not affected by treatments, suggesting that increased ruminal fill would not explain the variation in DMI and feed efficiency. Plasma glucose concentration was also similar across treatments. Andreazzi (2014) observed that amylase supplementation tended to increase plasma glucose concentration, reduced DMI, and increased milk lactose yield compared to control. The mechanism for the increased feed efficiency in response to amylase supplementation could not be elucidated in our experiment.

The reduction in feed efficiency in response to Crina may be explained by the trend for increased acetate to propionate ratio in ruminal fluid when the blend of EO replaced MON in the diet. The increased acetate to propionate ratio with Crina was associated to lowered plasma D-lactate concentration and increased proportion of butyrate in ruminal VFA. Vendramini et al. (2016) also observed higher acetate to propionate ratio and a trend for increased butyrate proportion in cows fed Crina compared to MON. Lowered acetate to propionate ratio, and consequently less methane energy loss per unit of digestible energy, has been associated to the positive effect of MON on feed efficiency of ruminants (Duffield et al., 2008). The calculated intake of forage NDF was close to 0.95 % of BW, suggesting that intake may have been metabolic regulated by the ratio between energy requirement and dietary energy supply, and not by digestive tract filling with fiber (Mertens, 1992). The lower metabolizable energy concentration diet EA than MA may explain the numerical trends for higher DMI and lower milk yield with Crina. Lowered

molar proportion of propionate with Crina may also be related to reduced flow of propionate to the liver for oxidation (Allen et al., 2009), another plausible explanation for the numerically higher DMI on EA than MA.

There was also no evidence for an effect of amylase on microbial yield in the rumen or large intestine. Nozière et al. (2014) observed no effect of amylase supplementation on ruminal microbial synthesis and minor effect on bacterial diversity of dairy cows fed diets with variation in starch concentration. Although positive effects of amylase supplementation on total tract NDF digestibility have been described (Gencoglu et al., 2010; Weiss et al., 2011), amylase did not increase NDF digestibility in our experiment, in agreement with the findings of McCarthy et al. (2013), Andreazzi (2014), and Nozière et al. (2014). Nozière et al. (2014) did not detect increased fibrolytic activity in the rumen of cows supplemented with amylase. Klingerman et al. (2009) observed increased total tract NDF digestibility with a low dosage of amylase, but the response was not sustained at a higher dosage. The reason for the inconsistency in the NDF digestibility response to Ronozyme RumiStar may involve the variation in fiber sources, and enzyme dosage among experiments.

The lack of an effect of amylase supplementation on total tract starch digestibility is in agreement with the results of Klingerman et al. (2009), Gencoglu et al. (2010), Weiss et al. (2011), McCarthy et al. (2013), Andreazzi (2014), and Nozière et al. (2014), in spite of the increased ruminal starch digestibility in response to the enzyme (Nozière et al., 2014).

The compensatory action of the intestine on starch digestion apparently explain this observation (Oba and Allen, 2003). Total tract starch digestibility for the control treatment was 97.2 % of starch intake in Gencoglu et al. (2010), 93.3 % in Klingerman et al. (2009), 99.2 % in McCarthy et al. (2013), 98.0 % in Nozière et al. (2014), 96.1 % in Andreazzi (2014), and 87.7 % in Weiss et al. (2011). Starch digestibility coefficients were high in most experiments, as in ours, except for the experiment of Weiss et al. (2011). The lack of response in total tract digestibility to amylase supplementation may have been the result of already high starch digestibility coefficients in the control treatment. The possibility of increasing total tract starch digestibility of diets containing resistant starch sources have not been sufficiently evaluated. Amylase supplementation reduced ruminal pH and MUN only in week 8, when the less fermentable diet was fed, suggesting that amylase may have acted on ruminal starch fermentation more with more resistant starch than with rapidly degradable starch.

The replacement of MON with Crina did not affect total tract digestibility and microbial yield in the rumen and large intestine. Benchaar et al (2007) did not detect effects of Crina on the population of cellulolytic bacteria and protozoa in the rumen, total tract digestibility of nutrients, and ruminal microbial yield of dairy cows, in agreement with our observation. Vendramini et al. (2016) also did not observe variation in ruminal microbial yield when Crina replaced MON in the diet. Sharen et al. (2017) showed that

MON decreased the ruminal microbial diversity of cows in early lactation, but Crina had no effect on ruminal microbiota.

Crina reduced BUN at 8 h post-morning feeding and tended to reduce BUN at times 4 h and 12 h. Pure culture studies indicated that ammonia-hyperproducing bacteria are sensitive to Crina and the main effect would be inhibition of AA deamination during the final stage of protein catabolism (McIntosh et al., 2003). However, differently from the BUN response, MUN was not reduced by the replacement of MON with Crina. The response of dairy cows in MUN to Crina supplementation have not been consistent. Vendramini et al. (2016) observed no effect of Crina or MON on MUN. Tassoul and Shaver (2009) did not observe reduced BUN and MUN in early lactation cows supplemented with Crina. Crina also did not reduce MUN of cows in mid-lactation (Kung Jr. et al., 2008). Benchaar et al. (2006) observed that MON reduced ruminal ammonia concentration, but Crina had no effect. The reported in vitro effect of Crina on ruminal protein breakdown (McIntosh et al., 2003) does not seem to be consensually reflected in lowered MUN in vivo, although our BUN data suggest that Crina may have reduced ruminal protein deamination more effectively than MON. Amylase reduced MUN and tended to reduce BUN immediately before the morning feeding, both suggestive of increased ruminal starch digestion. Andreazzi (2014) observed lowered BUN throughout the day on cows supplemented with amylase.

About the ingestive behavior, the DMI throughout the day can explain the greater intake in the afternoon for the cows that received the AMY. In the morning, these animals ingested a larger amount of feed, and could accumulate more acids in the rumen. Demand for larger particles in the afternoon and evening was because there was a greater need for saliva, although no response was observed at rumination time (Andreazzi, 2014).

Another action of AMY was to increase the number of meals and reduce the size of meals which is consistent with the theory of hepatic oxidation, indicating that AMY increased satiety which is the short-term regulation of consumption (Allen et al., 2009). It is an indirect evidence that the enzyme increased ruminal degradation of the starch. The tendency of EO to reduce chewing can be explained by DMI on the day of chewing activity. Although there was no significant difference, the animals in this treatment numerically decreased the DMI. Another justification is that EA treatment animals selected more against particles above 19 mm in the evening which may also reduce chewing, while AMY increased ingestion to particles above 19 mm. Results like found Dohme et al. (2008), this authors proposed whereas in diets with greater acidogenic capacity, the animals try to ingest larger particles to try to reverse the rumen acidosis.

CONCLUSION

The substitution of MON with Crina in a diet containing exogenous amylase tended to reduce the acetate to propionate ratio in ruminal fluid and amylase supplementation in a MON contain-diet had minor effect on ruminal fermentation profile. Total tract apparent

digestibility of nutrients was not affected by treatments. Amylase induced particle size sorting behavior favorable to the intake of large feed particles. Exogenous amylase tended to increase feed efficiency and the substitution of MON with Crina reduced feed efficiency, although direct treatment effects on milk yield and DMI were not detected.

REFERENCES

- Aharoni, Y., and H. Tagari. 1991. Use of nitrogen-15 determinations of purine nitrogen fraction of digesta to define nitrogen metabolism traits in the rumen. *J. Dairy Sci.* 74:2540–2547.
- Andreazzi, A.S. Suplementação de amilase exógena em dietas de vacas leiteiras em lactação. 2014. 52 p. Dissertation (Master) – Universidade Federal de Minas Gerais.
- AOAC International. 2012. Official Methods of Analysis 19th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA. 93
- Appuhamy, J. A. D. R. N., A. B. Strathe, S. Jayasundara, C. Wagner-Riddle, J. Dijkstra, J. France, and E. Kebreab. 2013. Anti-methanogenic effects of monensin in dairy and beef cattle: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 96:5161–5173.
- Bauman, D. E., C. L. Davis, and H. F. Buchholtz. 1971. Propionate production in the rumen of cows fed either a control or high-grain, low-fiber diet. *J. Dairy Sci.* 54:1282-1287.
- Benchaar, C., T. A. McAllister, and P. Y. Chouinard. 2008. Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or *Yucca schidigera* saponin extracts. *J. Dairy Sci.* 91:4765–4777.
- Bergen, W. G., and D. B. Bates. 1984. Ionophores : Their effect on production efficiency and mode of action. *J. Anim. Sci.* 58:1465–1483.

- Calsamiglia, S., M. Busquet, P. W. Cardozo, L. Castillejos, and A. Ferret. 2007. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 90:2580–2595.
- Cannon, S. J., G. C. Fahey Jr, M. R. Murphy, C. L. Dikeman, B. L. Miller, and J. K. Drackley. 2010. Inclusion of psyllium in milk replacer for neonatal calves. Effects on growth, digesta viscosity, rate of passage, nutrient digestibilities, and metabolites in blood. *J. Dairy Sci.* 93:3652–3660.
- Chen, X. B., and M. J. Gomes. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: An overview of technical details. *Int. Feed Res. Unit, Occasional Publ. Rowett Research Institute.*
- Cotta, M.A., 1988. Amylolytic activity of selected species of ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 772–776.
- Dehority, B. A. 1984. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:182–185.
- Dohme, F., T. J. DeVries, and K. A. Beauchemin. 2008. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: Ruminal pH. *J. Dairy Sci.* 91:3554–3567.

- Duffield, T. F., A. R. Rabiee, and I. J. Lean. 2008. A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 2. Production effects. *J. Dairy Sci.* 91:1347–1360.
- Ellis, J. L., J. Dijkstra, A. Bannink, E. Kebreab, S. E. Hook, S. Archibeque, and J. France. 2012. Quantifying the effect of monensin dose on the rumen volatile fatty acid profile in high grain fed beef cattle. *J. Anim. Sci.* 90:2717–2726.
- Ferraretto, L.F., R.D.Shaver, M. Espineira, H. Gencoglu, and S.J. Bertics, 2011. Effect of feeding a reduced-starch diet with or without amylase addition on lactation performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:1490–1499.
- Gencoglu, H., Shaver, R.D., Steinberg, W., Ensink, J., Ferraretto, L.F., Bertics, S.J., Lopes, J.C., Akins, M.S., 2010. Effect of feeding a reduced-starch diet with or without amylase addition on lactation performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:723–732.
- Grant, R. J., and D. R. Mertens. 1992. Influence of buffer pH and raw corn starch addition on in vitro fiber digestion kinetics. *J. Dairy Sci.* 75:2762–2768.
- Hall, M. B. 2009. Analysis of starch, including maltooligosaccharides in animal feeds: a comparison of methods and a recommended method for AOAC collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 92:42-49.
- Ipharraguerre, I. R., and J. H. Clark. 2003. Usefulness of ionophores for lactating dairy cows: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 86:1052-1073.

- Khiaosa-ard, R., and Q. Zebeli. 2013. Meta-analysis of the effects of essential oils and their bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in ruminants. *J. Anim. Sci.* 91:1819–1830.
- Klevenhusen, F., A. Muro-Reyes, R. Khiaosa-ard, B. U. Metzler-Zebeli, and Q. Zebeli. 2012. A meta-analysis of effects of chemical composition of incubated diet and bioactive compounds on in vitro ruminal fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 176:61–69.
- Klingerman, C. M., W. Hu, E. E. McDonell, M. C. Der Bedrosian, and L. Kung Jr.. 2009. An evaluation of exogenous enzymes with amylase activity for dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:1050–1059.
- Kung Jr, L., P. Williams, R. J. Schmidt, and W. Hu. 2008. A blend of essential plant oils used as an additive to alter silage fermentation or used as a feed additive for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:4793–800.
- Lammers, B. P., D. R. Buckmaster, and A. J. Heinrichs. 1996. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. *J. Dairy Sci.* 79:922–928.
- McCarthy, M. M., M. A. Engstrom, E. Azem, and T. F. Gressley. 2013. The effect of an exogenous amylase on performance and total-tract digestibility in lactating dairy cows fed a high-byproduct diet. *J. Dairy Sci.* 96:3075–3084.

- McIntosh, F. M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R. J., Beever, D. A. and Newbold, C. J. 2003. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5011–5014.
- Michiels, J., J. Missotten, D. Fremaut, S. De Smet, and N. Dierick, 2007. In vitro dose-response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora. *Livest. Sci.* 109:157–160.
- Mullins, C. R., L. K. Mamedova, M. J. Brouk, C. E. Moore, H. B. Green, K. L. Perfield, J. F. Smith, J. P. Harner, and B. J. Bradford. 2012. Effects of monensin on metabolic parameters, feeding behavior, and productivity of transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:1323–1336.
- Nozière, P., W. Steinberg, M. Silberberg, and D. P. Morgavi. 2014. Amylase addition increases starch ruminal digestion in first-lactation cows fed high and low starch diets. *J. Dairy Sci.* 97:2319–2328.
- NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci.
- Oba, M., and M. S. Allen. 2003. Effects of corn grain conservation method on ruminal digestion kinetics for lactating dairy cows at two dietary starch concentrations. *J. Dairy Sci.* 86:184-194

- Rossi, J. 1999. Additives for animal nutrition and technique for their preparation. European patent EP 0646321 B1.
- Russell, J. B., and H. J. Strobel. 1989. Minireview: effect of ionóforos on ruminal fermentation. *Application Environment Microbiology*. 55:1–6.
- Schären, M., C. Drong, K. Kiri, S. Riede, M. Gardener, U. Meyer, J. Hummel, T. Urich, G. Breves, and S. Dänicke. 2017. Differential effects of monensin and a blend of essential oils on rumen microbiota composition of transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:2765–2783.
- sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: An overview of technical details. *Int. Feed Res. Unit, Occasional Publ. Rowett Research Institute, Aberdeen, United Kingdom.*
- Tassoul, M. D., and R. D. Shaver. 2009. Effect of a mixture of supplemental dietary plant essential oils on performance of periparturient and early lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:1734–1740.
- Tricarico, J. M., J. D. Johnston, and K. A. Dawson. 2008. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae* α -amylase. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145:136–150.
- Tylutki, T. P., D. G. Fox, V. M. Durbal, L. O. Tedeschi, J. B. Russell, M. E. Van Amburgh, T.R. Overton, L. E. Chase, and A. N. Pell. 2008. Cornell Net Carbohydrate and Protein

- System: A model for precision feeding of dairy cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 143:174–202.
- Van Soest, P.J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583–3597.
- Vendramini T.H.A., C.S. Takiya, T.H. Silva, F. Zanferari, M.F. Rentas, J.C.Bertoni, C.E.C. Consentini, R. Gardinal, T.S. Acedo, and F.P. Rennó. 2016. Effects of a blend of essential oils, chitosan or monensin on nutrient intake and digestibility of lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 214:12–21.
- Wall, E. H., P. H. Doane, S. S. Donkin, and D. Bravo. 2014. The effects of supplementation with a blend of cinnamaldehyde and eugenol on feed intake and milk production of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97:5709–5717.
- Warner, A. C. I. 1962. Enumeration of rumen micro-organisms. *Microbiology.* 28:119–28.
- Weiss, W.P., Steinberg, W., Engstrom, M.A., 2011. Milk production and nutrient digestibility by dairy cows when fed exogenous amylase with coarsely ground dry corn. *J. Dairy Sci.* 94:2492–2499.
- Wildman, E. E., G. M. Jones, P. E. Wagner, R. L. Boman, H. F. Troutt, and T. N. Lesch. 1982. A dairy-cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J. Dairy Sci.* 65:495–501. Xu,

Zinn, R. A., and F. N. Owens. 1986. A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating protein synthesis. *Can. J. Anim. Sci.* 66:157–166.

Table 1. Composition and particle size of diets containing rehydrated and ensiled finely ground mature corn fed during weeks 1 to 4 or weeks 5 to 8 on treatments monensin (M), monensin plus amylase (MA), and essential oils plus amylase (EA) (% of DM)

	Week 1 to 4			Weeks 5 to 8		
	M	MA	EA	M	MA	EA
Corn silage		41.4			39.1	
Ryegrass hay		5.2				
Oat hay					6.2	
Soybean meal (46.5 % CP)		17.3			17.2	
Whole cottonseeds		10.1			10.1	
Finely ground corn		12.0			24.4	
Rehydrated and ensiled finely ground corn		11.0				
Limestone		0.5			0.5	
Minerals and vitamins ¹		2.5			2.5	
DM, % of as fed	49.2	49.0	47.9	51.2	50.2	50.4
CP	16.2	16.4	16.1	16.5	16.0	15.9
RDP ²	10.6	10.6	10.6	10.5	10.5	10.5
RUP ²	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7
NDF	32.2	32.1	32.0	33.8	33.5	33.7
Forage NDF	22.3	22.1	21.9	23.5	23.1	23.2
Starch	29.6	28.9	29.4	30.2	30.8	30.2
Starch finely ground corn	9.5	9.3	9.2	18.9	18.3	18.6
Starch rehydrated and ensiled finely ground corn	8.1	8.3	8.4			
Ether extract	5.0	5.9	5.1	5.0	5.3	5.2
Ash	6.8	7.2	6.9	6.3	6.6	6.2
NFC	41.0	40.9	40.7	38.8	39.0	39.1
Feed particles > 19 mm, ³ % of as fed		15.0 ± 3.6			19.5 ± 2.9	
Feed particles 8 - 19 mm, % of as fed		38.8 ± 0.9			35.9 ± 1.3	
Feed particles < 8 mm, % of as fed		46.2 ± 2.1			44.4 ± 1.1	

¹11.0 % Ca, 4.2 % P, 4.5 % Mg, 1.8 % S, 12.3 % Na, 2 % K, 14 ppm Co, 500 ppm Cu, 1,400 ppm Mn, 2,800 ppm Zn, 18 ppm Se, 28 ppm I, 1050 ppm Fe, 200,000 UI/kg Vit.A, 70,000 UI/kg Vit.D, 1,200 UI/kg Vit.E.

²Estimated with NRC (2001) for experimental data.

³Mean and SD of nine samples obtained during three days of weeks 4 (REC) and 8 (FGC). Particles retained on screens of the Penn State Particle Separator.

Table 2. Intake, lactation performance, MUN, feed efficiency, BW, BCS, and subcutaneous fat thickness (SFT) during the 56 d of the comparison period on treatments monensin (M), monensin plus amylase (MA), and essential oils plus amylase (EA)

	M	MA	EA	SEM	<i>P</i> -value ¹				
					Treat	Time	Treat×Time	M vs. MA	MA vs. EA
DMI, kg/d	22.0	21.4	22.2	0.48	0.39	< 0.01	0.73	0.30	0.18
Milk, kg/d	34.1	34.6	34.0	0.68	0.72	< 0.01	0.92	0.74	0.43
ECM, kg/d	34.3	34.5	33.9	0.58	0.66	< 0.01	0.91	0.26	0.38
Fat, kg/d	1.158	1.186	1.130	0.0247	0.06	< 0.01	0.83	0.30	0.02
Fat, %	3.41	3.46	3.34	0.062	0.31	< 0.01	0.45	0.56	0.15
Protein, kg/d	1.052	1.103	1.085	0.0354	0.53	< 0.01	0.95	0.27	0.67
Protein, %	3.16	3.15	3.20	0.023	0.23	< 0.01	0.77	0.61	0.11
Lactose, kg/d	1.523	1.583	1.573	0.0610	0.62	< 0.01	0.71	0.87	0.87
Lactose, %	4.58	4.55	4.55	0.012	0.14	< 0.01	0.48	0.18	0.96
Solids, kg/d	3.998	4.243	4.130	0.0614	0.63	< 0.01	0.53	0.35	0.72
Solids, %	12.13	12.19	12.10	0.060	0.63	< 0.01	0.53	0.35	0.72
MUN, mg/dL	19.9	18.9	18.9	0.22	< 0.01	< 0.01	0.27	< 0.01	0.99
Milk/DMI	1.56	1.62	1.54	0.029	0.08	< 0.01	0.82	0.08	0.03
ECM/DMI	1.46	1.54	1.48	0.032	0.20	< 0.01	0.81	0.09	0.13
BW, kg	666	668	664	3.6	0.57	0.37	0.43	0.68	0.31
BW gain, ² g/d	288	236	215	93.2	0.47			0.44	0.60
BCS, 1 to 5	3.25	3.15	3.17	0.101	0.68	< 0.01	0.41	0.44	0.45
SFT, mm	2.43	2.71	2.94	0.218	0.19	0.41	0.59	0.29	0.35

¹*P*-value for the effect of treatment and time (day or week), their interaction, and the contrasts M vs. MA and MA vs. EA.

²Slope of the linear regression of BW over weeks 0, 2, 4, 6, and 8.

Table 3. Intake, digestible OM intake (DOMI), lactation performance, MUN, feed efficiency, BW, BCS, and subcutaneous fat thickness (SFT) during weeks 4 and 8 on treatments monensin (M), monensin plus amylase (MA), and essential oils plus amylase (EA)

	Week 4			Week 8			SEM	<i>P</i> -value ¹				
	M	MA	EA	M	MA	EA		Treat	Week	Treat×Week	M vs. MA	MA vs. EA
DMI, kg/d	22.4	21.3	21.6	21.9	22.0	22.0	0.53	0.74	0.45	0.36	0.49	0.91
DOMI, kg/d	12.8	13.0	13.3	14.2	14.2	14.5	0.71	0.81	< 0.01	0.98	0.85	0.68
Milk, kg/d	34.9	34.9	34.2	33.6	33.9	33.1	0.69	0.58	< 0.01	0.97	0.84	0.63
ECM, kg/d	33.3	33.1	31.8	31.7	32.9	30.8	0.88	0.22	0.07	0.52	0.66	0.10
Fat, kg/d	1.190	1.199	1.126	1.140	1.218	1.092	0.0394	0.11	0.37	0.50	0.36	0.04
Fat, %	3.44	3.53	3.46	3.47	3.67	3.43	0.055	0.15	0.38	0.44	0.11	0.08
Protein, kg/d	1.089	1.081	1.058	1.047	1.049	1.036	0.0289	0.77	0.05	0.87	0.34	0.58
Protein, %	3.16	3.16	3.22	3.19	3.15	3.23	0.033	0.26	0.73	0.73	0.66	0.08
Lactose, kg/d	1.604	1.548	1.512	1.494	1.509	1.443	0.0372	0.22	< 0.01	0.43	0.65	0.74
Lactose, %	4.64	4.52	4.56	4.53	4.52	4.45	0.024	0.04	< 0.01	0.20	0.07	0.59
Solids, kg/d	4.146	4.183	4.027	4.046	4.099	3.907	0.0923	0.63	< 0.01	0.53	0.35	0.72
Solids, %	12.22	12.27	12.23	12.28	12.32	12.14	0.060	0.48	0.92	0.61	0.66	0.24
MUN, ² mg/dL	18.2 ^c	18.4 ^c	17.7 ^c	22.6 ^a	20.0 ^b	20.6 ^b	0.42	0.06	< 0.01	0.04	0.06	0.91
Milk/DMI	1.57	1.63	1.58	1.53	1.55	1.50	0.049	0.63	0.02	0.41	0.10	0.05
ECM/DMI	1.56	1.58	1.52	1.45	1.59	1.43	0.042	0.06	0.01	0.14	0.07	0.02
ECM/DOMI	2.64	2.62	2.51	2.28	2.35	2.19	0.114	0.45	< 0.01	0.91	0.83	0.25
BW, kg	668	667	664	669	667	662	3.93	0.38	0.96	0.79	0.70	0.36
BCS, 1 to 5	3.2	3.2	3.3	3.2	3.3	3.3	0.12	0.68	0.42	0.47	0.93	0.71
SFT, mm	2.34	2.61	2.98	2.52	2.81	2.91	0.237	0.19	0.41	0.59	0.29	0.35

¹*P*-value for the effect of treatment and diet/week, their interaction, and the contrasts M vs. MA and MA vs. EA.

²Differing superscript in the same row denotes difference at *P* < 0.05 by the Bonferroni test.

Table 4. Ruminal molar proportion of VFA, protozoa concentration, and pH, and plasma D-lactate concentration during weeks 4 and 8 on treatments monensin (M), monensin plus amylase (MA), and essential oils plus amylase (EA)

	Week 4			Week 8			SEM	Treat	Week	Treat×Week	<i>P</i> -value ¹	
	M	MA	EA	M	MA	EA					M vs. MA	MA vs. EA
Acetate, % of VFA	63.7	62.8	65.6	64.2	63.0	66.5	0.94	0.22	0.28	0.89	0.55	0.14
Propionate, % of VFA	21.2	21.5	19.9	21.5	21.2	18.9	0.99	0.23	0.47	0.51	0.98	0.15
Isobutyrate, % of VFA	0.92	0.87	0.81	0.93	0.93	0.93	0.034	0.20	0.02	0.25	0.45	0.44
Butyrate, % of VFA	10.2	9.8	10.2	9.9	9.2	10.4	0.39	0.04	0.98	0.73	0.07	0.05
Isovalerate, % of VFA	2.6	2.3	2.1	2.2	2.1	1.9	1.22	0.01	0.33	0.16	0.41	0.77
Valerate, % of VFA	1.4	1.3	1.3	1.3	2.3	1.2	0.39	0.37	0.44	0.28	0.25	0.19
Acetate:Propionate	3.0	2.9	3.2	3.1	3.0	3.5	0.14	0.14	0.15	0.78	0.72	0.08
Protozoa, x 10 ⁵ /mL	2.1	2.3	2.2	2.2	2.2	2.1	0.13	0.86	0.94	0.80	0.61	0.64
Ruminal pH ²	6.49 ^c	6.53 ^{bc}	6.44 ^c	7.09 ^a	6.57 ^b	6.84 ^{ab}	0.097	0.08	< 0.01	0.02	0.03	0.40
D-lactate, μM	73.7	76.0	68.2	68.4	72.7	61.6	3.91	0.22	0.07	0.99	0.84	0.12

¹*P*-value for the effect of treatment and diet/week, their interaction, and the contrasts M vs. MA and MA vs. EA.

²Differing superscript in the same row denotes difference at *P* < 0.05 by the Bonferroni test.

Table 5. Total tract apparent digestibility of DM DMD, OM, starch, and NDF, plasma glucose concentration, urinary allantoin excretion, allantoin over digestible OM intake (DOMI), and fecal guanine during weeks 4 and 8 on treatments monensin (MO), monensin plus amylase (MA), and essential oils plus amylase (EA)

	Week 4			Week 8			SEM	<i>P</i> -value ¹				
	M	MA	EA	M	MA	EA		Treat	Week	Treat×Week	M vs. MA	MA vs. EA
DM D, %	64.1	64.9	65.4	68.1	69.4	69.2	1.38	0.80	0.01	0.98	0.61	0.52
OM D, %	65.9	66.1	67.2	70.1	71.6	71.0	1.92	0.83	< 0.01	0.89	0.68	0.88
Starch D, %	91.1	92.2	91.8	87.6	88.1	88.2	0.9	0.66	< 0.01	0.91	0.40	0.86
NDF D, %	41.5	44.4	45.2	55.9	54.2	54.3	2.19	0.88	< 0.01	0.43	0.79	0.84
Glucose, mg/dL	55.1	58.7	57.2	58.3	60.6	58.9	2.49	0.70	< 0.01	0.29	0.55	0.86
Allantoin, mmol/d	246	269	277	184	162	180	14.8	0.58	< 0.01	0.29	0.98	0.39
Allantoin/DOMI, mmol/kg	19.9	21.4	20.9	13.0	11.4	12.4	1.37	0.98	< 0.01	0.51	0.94	0.87
Guanine, g/d	7.85	7.93	8.85	9.35	11.76	11.31	1.38	0.35	0.04	0.41	0.29	0.88
Guanine/DOMI, g/kg	0.59	0.62	0.67	0.61	0.81	0.77	0.075	0.23	0.15	0.39	0.16	0.95

¹*P*-value for the effect of treatment and diet/week, their interaction, and the contrasts M vs. MA and MA vs. EA.

Table 6. Starch, NDF, and particle size sorting behaviors (Observed/Predicted. < 100 % is rejection, > 100 % is preferential intake, = 100 % is no selection) and daily refusal as a proportion of feed offered during weeks 4 and 8 on treatments monensin (M), monensin plus amylase (MA), and essential oils plus amylase (EA)

	Week 4			Week 8			SEM	<i>P</i> -value ¹				
	M	MA	EA	M	MA	EA		Treat	Week	Treat×Week	M vs. MA	MA vs. EA
Starch sorting	101	100	100	98	98	99	0.5	0.81	0.02	0.51	0.64	0.77
NDF sorting	96	95	96	92	91	93	0.9	0.37	< 0.01	0.60	0.62	0.17
Particle size sorting ²												
0700 h to 1300 h												
> 19 mm	72 ^{ab}	72 ^{ab}	66 ^a	74 ^{ab}	91 ^{bc}	114 ^c	6.7	0.05	< 0.01	< 0.01	0.24	0.23
> 8 - 19 mm	104 ^{ab}	101 ^{ab}	112 ^a	104 ^{ab}	102 ^{ab}	97 ^b	2.7	0.51	< 0.01	0.01	0.44	0.27
< 8 mm	119 ^a	122 ^a	124 ^a	117 ^a	107 ^{ab}	100 ^b	4.4	0.37	< 0.01	0.05	0.49	0.51
1300 h to 1900 h												
> 19 mm	60	67	65	72	84	84	4.2	0.05	< 0.01	0.67	0.02	0.72
> 8 - 19 mm	108	107	107	99	101	98	1.8	0.43	< 0.01	0.63	0.80	0.24
< 8 mm	129	122	121	127	111	114	5.2	0.10	< 0.01	0.56	0.05	0.82
1900 h to 0700 h												
> 19 mm	96	94	84	96	104	92	6.4	< 0.01	< 0.01	0.29	< 0.01	< 0.01
> 8 - 19 mm	98	100	101	102	97	95	3.1	0.80	< 0.01	0.25	0.59	0.98
< 8 mm	113	124	119	119	112	115	8.4	0.97	< 0.01	0.57	0.83	0.91
Refusal, % of offered	18.3	16.7	19.7	18.4	16.3	18.9	1.61	0.25	0.81	0.93	0.25	0.12

¹*P*-value for the effect of treatment and diet/week, their interaction, and the contrasts M vs. MA and MA vs. EA.

²Particles retained on screens of the Penn State Particle Separator.

Table 7. Chewing activity and proportion of intake during periods of the day during weeks 4 and 8 on treatments monensin (M), monensin plus amylase (MA), and essential oils plus amylase (EA)

	Week 4			Week 8			SEM	Treat	Week	Treat×Week	<i>P</i> -value ¹	
	M	MA	EA	M	MA	EA					M vs. MA	MA vs. EA
DMI	22.4	22.9	22.6	22.6	22.5	22.4	0.47	0.64	0.56	0.29	0.57	0.32
Meals/d	9.2	10.8	10.8	10.3	10.1	10.1	0.58	0.28	0.69	0.17	0.02	0.63
Meal duration, min	32.0	27.3	26.5	30.0	31.0	27.2	1.47	0.03	0.46	0.11	0.25	0.14
First meal duration, min	53.3	53.9	54.4	56.3	53.7	45.9	6.51	0.75	0.53	0.27	0.88	0.59
Intermeal interval, min	122	105	109	112	112	108	8.1	0.55	0.71	0.33	0.36	0.98
Ingestion, min/d	301	293	286	302	310	293	17.9	0.75	0.42	0.79	0.99	0.53
Rumination, min/d	603	576	562	499	539	486	24.7	0.35	< 0.01	0.41	0.80	0.19
Chewing, ² min/d	902	868	848	798	849	779	25.2	0.17	< 0.01	0.26	0.75	0.08
Ingestion, min/kg/DMI	13.4	12.8	12.6	13.2	13.9	13.0	0.89	0.78	0.38	0.57	0.62	0.53
Rumination, min/kg DMI	27.1	25.0	24.7	22.2	24.1	21.2	1.46	0.42	< 0.01	0.53	0.83	0.34
Chewing, ² min/kg DMI	40.4	37.8	37.4	35.7	38.0	34.6	1.91	0.42	0.03	0.19	0.91	0.30
Meal size (kg/meal)	2.4	2.1	2.1	2.2	2.2	2.2	0.11	0.88	0.69	0.36	0.32	0.99
0700 to 1300 h, % of intake	35.2	39.4	42.3	34.2	36.3	36.9	1.60	0.03	< 0.01	0.15	0.08	0.33
1300 to 1900 h, % of intake	49.8	43.7	41.1	45.1	43.4	42.4	1.90	0.02	0.37	0.21	0.07	0.36
1900 to 0700 h, % of intake	15.3	16.8	16.3	21.0	20.2	20.6	2.32	0.99	< 0.01	0.80	0.92	0.95

¹*P*-value for the effect of treatment and diet/week, their interaction, and the contrasts M vs. MA and MA vs. EA.

²Chewing = Ingestion + Rumination.

Table 8. Blood urea-N (BUN) at differing hours post-morning feeding during weeks 4 and 8 on treatments monensin (M), monensin plus amylase (MA), and essential oils plus amylase (EA)

	Week 4			Week 8			SEM	<i>P</i> -value ¹				
	M	MA	EA	M	MA	EA		Treat	Week	Treat×Week	M vs. MA	MA vs. EA
BUN 0 h	18.8	17.9	16.2	21.2	18.9	18.1	0.89	0.01	< 0.01	0.57	0.10	0.18
BUN 2 h	12.8	12.9	12.5	19.0	18.1	17.3	0.70	0.35	< 0.01	0.52	0.58	0.41
BUN 4 h	17.4	17.3	16.0	16.5	16.1	14.7	0.75	0.08	0.02	0.92	0.78	0.08
BUN 8 h	16.2	16.7	16.2	17.4	19.1	15.5	0.86	0.08	0.15	0.19	0.24	0.02
BUN 12 h	15.5	15.3	15.0	20.0	20.1	17.8	0.73	0.11	< 0.01	0.31	0.97	0.08
BUN 20 h	17.7	16.3	16.6	17.8	17.8	15.8	0.69	0.09	0.58	0.25	0.34	0.25

¹*P*-value for the effect of treatment and diet/week, their interaction, and the contrasts M vs. MA and MA vs. EA.