

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**EXTRATOS DE ORÉGANO E CHÁ VERDE COMO ADITIVOS PARA
BOVINOS LEITEIROS**

Giovani Jacob Kolling
Médico Veterinário (UNICRUZ)
Mestre em Ciências Veterinárias (UFRGS)

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de Doutor em
Zootecnia
Área de Concentração Produção Animal
(Nutrição e Alimentação de Ruminantes)

Porto Alegre (RS), Brasil
Janeiro, 2016

CIP - Catalogação na Publicação

Kolling, Giovani Jacob
Extratos de orégano e chá verde como aditivos
para bovinos leiteiros / Giovani Jacob Kolling. --
2016.

133 f.

Orientadora: Vivian Fischer.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. desempenho animal. 2. comportamento. 3.
polifenóis. 4. óleos essenciais. 5. ruminantes. I.
Fischer, Vivian , orient. II. Título.

GIOVANI JACOB KOLLING
Médico Veterinário e
Mestre em Ciências Veterinárias

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOUTOR EM ZOOTECNIA

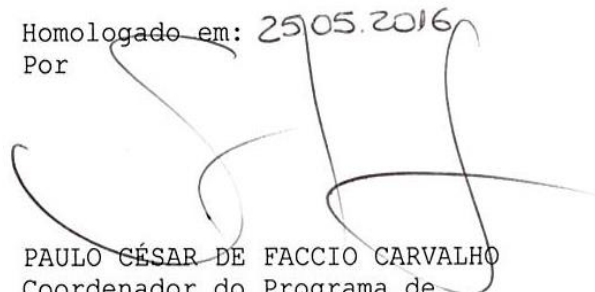
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 29.01.2016
Pela Banca Examinadora



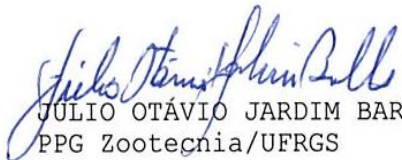
VIVIAN FISCHER
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientadora

Homologado em: 25.05.2016
Por



PAULO CÉSAR DE FACCIO CARVALHO
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia

ANDRÉ THALER NETO
UDESC/CAV



JULIO OTÁVIO JARDIM BARCELLOS
PPG Zootecnia/UFRGS



LUIZ GUSTAVO RIBEIRO PEREIRA
EMBRAPA/CNPGL

PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de Agronomia

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre junto de mim, dando-me força e proteção em todos os momentos.

Aos meus pais, Antonio Valdemar e Irene Kolling, pela educação, conhecimento e caráter que me repassaram. Amo muito vocês!

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRGS, pela oportunidade e por contribuírem com meu crescimento científico. Aos Profs. do PPGZ por me acolher e darem importância às demandas discentes, por mim representada nos últimos anos, na Comissão e no Conselho do Programa.

À Profa. Dra. Vivian Fischer pela orientação, confiança e paciência que teve comigo e por sua amizade. Sua postura profissional e o amor pela pesquisa são um grande exemplo e incentivo para mim.

Ao CNPq, CAPES, Embrapa, Projeto PECUS-RumenGases e Fapemig pelo aporte financeiro para a execução das pesquisas.

À Fazenda Tabuí, em nome da Srta. Marilze Guimarães Cassol e seus colaboradores, pela disponibilidade de nos receberem em sua propriedade e pela amizade conservada.

À Embrapa Gado de Leite, pela oportunidade em desenvolver parte das pesquisas em suas modernas instalações e, aos seus colaboradores, estagiários e bolsistas por todo auxílio durante a execução do experimento.

Ao Dr. Luiz Gustavo Ribeiro Pereira por toda paciência, atenção, disponibilidade e ensinamentos repassados. És um exemplo para mim.

Aos colegas da UFRGS e aos integrantes do NUPLAC pela amizade, troca de experiências e auxílio nos experimentos.

Às Pesquisadoras Maria Edi Rocha Ribeiro e Maira Balbinotti Zanela por todas as conversas, conselhos e apoio. Agradeço de coração por tudo.

Ao Dr. Alexandre Gabbi, idealizador do projeto de pesquisa. Obrigado pela disponibilidade em auxiliar na troca de experiência durante os experimentos.

Ao Ricardo Bourscheid, pelo apoio, compreensão e companheirismo.

À Profa. Cristiane Beck pelo apoio e amizade desde a graduação.

A Ione Borcelli Gonçalves pela amizade e auxílio no PPGZ.

Ao Moisés Leonardi de Almeida pelos anos de amizade e convívio.

EXTRATOS DE ORÉGANO E CHÁ VERDE COMO ADITIVOS PARA BOVINOS LEITEIROS¹

Autor: Giovani Jacob Kolling

Orientadora: Prof. Dra. Vivian Fischer

RESUMO – Esta tese foi dividida em duas pesquisas com o intuito de avaliar o fornecimento de extratos de orégano e chá verde para novilhas e vacas leiteiras. A primeira delas teve como objetivo verificar a inclusão de doses de extrato de orégano (EO) (*Origanum vulgare*) fornecido a novilhas da raça Holandês sobre a aceitabilidade do alimento, consumo, medidas fisiológicas e desenvolvimento corporal. Trinta e quatro novilhas em pastejo da raça Holandês foram agrupadas aleatoriamente em quatro tratamentos: C = controle - sem adição de EO; 2,5 gramas (g); 5,0 g e 7,5 g de EO. Os tratamentos foram ofertados diariamente e individualmente durante 56 dias. O extrato de orégano adicionado em 7,5 g/dia ao concentrado exerce efeitos adversos de pequena magnitude sobre a aceitabilidade do concentrado e seu consumo e a inclusão de até 7,5 g/dia não melhora o consumo total de dieta, o desenvolvimento corporal e medidas fisiológicas. A segunda pesquisa objetivou avaliar os efeitos da inclusão de EO, chá verde (CV) (*Camellia sinensis* L.) e sua associação no concentrado fornecido a vacas das raças Holandês e mestiços Holandês e Gir sobre o comportamento, consumo, produção e composição do leite, perfil hematológico e enzimas de estresse oxidativo. Trinta e duas vacas das raças Holandês e mestiços Holandês e Gir foram distribuídas aleatoriamente em quatro tratamentos: C = controle, EO = com adição de 10 g de extrato de orégano, CV = com adição de 5,0 g de extrato de chá verde e Mix = associação de ambos os tratamentos. Vacas recebendo chá verde apresentaram maior consumo e produziram mais leite em relação aos grupos controle e Mix. Animais do grupo orégano produziram leite com menor concentração de lactose enquanto do grupo Mix produziram leite com menor contagem de células somáticas que as vacas que receberam orégano. Menores valores das enzimas de oxidação da diclorofluoresceína nos eritrócitos (DCFER) e plasma (DCFPLA) e níveis mais elevados de Glutathione peroxidase reduzida (GSH) foram verificados nos animais suplementados com CV. Vacas suplementadas com extrato de chá verde apresentaram maior número de observações de ruminção total e menor número de observações deitada. Conclui-se que o fornecimento de extrato de orégano não alterou expressivamente o desenvolvimento corporal de novilhas, mas a dose mais elevada (7,5 g EO) alterou negativamente a aceitabilidade do alimento. O extrato de chá verde melhora a produção leiteira, altera a composição do leite, modifica o perfil hematológico e enzimas antioxidantes, constituindo-se como opção de aditivo para vacas em lactação.

Palavras-chave: desempenho animal, comportamento, polifenóis, óleos essenciais, ruminantes.

¹ Tese de Doutorado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (133p.) Janeiro, 2016.

OREGANO AND GREEN TEA EXTRACTS AS ADDITIVES TO DAIRY CATTLE²

Author: Giovani Jacob Kolling

Adviser: Prof. Dra. Vivian Fischer

ABSTRACT - Oregano and green tea extracts were supplied for heifers and dairy cows in two trials. The first study aimed to verify effect of the inclusion of doses of oregano extract (*Origanum vulgare*) fed to Holstein heifers on the acceptability of concentrate, physiological measurements and body development. Thirty-four heifers grazing of Holstein were distributed randomly into four treatments: C = control - without adding OE; OE2.5 = 2.5 grams (g); OE5.0 = 5.0 g and OE7.5 = 7.5 g of OE per day. The treatments were offered daily and individually for 56 days, after an adaptation period of 14 days, when heifers received just the basal diet. Heifers fed with 7.5 g of EO into the concentrate spent more time to eat the concentrate, reduced the latency to enter the trough and the concentrate intake. The inclusion of oregano extract did not alter the total dietary intake, body weight gain, body condition score (BCS), respiratory rate, rectal temperature and urinary pH. The second study aimed to evaluate the effects of addin OE, green tea - GT (*Camellia sinensis* L.) and both vegetal extracts into the concentrate fed to Holstein and Holstein and Gir crossbred cows on behavior, intake, milk yield and composition, blood profile and enzymes of oxidative stress. Thirty-two Holstein and Holstein and Gir crossbred cows were randomly distributed into four treatments: C = control, OE = with addition of 10 g of oregano extract, GT = with addition of 5.0 g of green tea extract and with Mix = combination of both treatments. Cows fed GT had higher total intake and produced more milk compared to control groups and Mix; cows receiving GT and control produced more milk, but the body weight or BCS did not differ between treatments. Animals fed with OE produced milk with lower concentration of lactose while the cows fed with the Mix produced milk with lower somatic cell count than cows fed with OE. Smaller values of dichlorofluorescein oxidation enzymes in the erythrocytes and plasma and higher levels of reduced glutathione peroxidase levels were observed in animals supplemented with GT. Cows receiving the control showed higher number of intake activities compared to the other treatments, total number of lying and lying in idleness observations, and, in contrast, fewer observations in standing position, both in idleness as ruminating. Cows supplemented with GT showed a higher number of total rumination observations and Oregano and green tea extracts change the ingestive, postural and social behavior, improves intake, milk yield, altering its composition, the hematological profile and antioxidant status and, thus, the use of oregano and green tea extracts may be use as an option of additive for dairy cows.

Keywords: animal performance, behavior, essential oils, polyphenols, ruminants.

² Doctoral Thesis in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (133p.) January, 2015.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I	
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Fitoquímicos.....	14
2.1.1 Óleos essenciais.....	16
2.1.1.1 Efeito sobre o ambiente ruminal.....	17
2.1.1.2 Efeito sobre o desempenho animal.....	19
2.1.1.3 Efeito sobre a produção de gases.....	20
2.1.1.4 Efeito sobre o perfil hematológico.....	21
2.1.1.5 Efeito sobre os produtos de origem animal.....	22
2.1.2 Polifenóis.....	23
3. HIPÓTESES E OBJETIVOS.....	27
3.1 Hipóteses.....	27
3.2 Objetivos.....	27
CAPÍTULO II	
Extrato de orégano na dieta de novilhas da raça Holandês.....	29
CAPÍTULO III	
Extrato de orégano e de chá verde como aditivos em dietas de vacas leiteiras.....	45
CAPÍTULO IV	
CONCLUSÃO GERAL.....	90
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
APÊNDICES.....	102
VITA.....	132

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO II	
Tabela 1. Composição químico-bromatológica dos alimentos da dieta experimental.....	33
Tabela 2. Médias dos atributos com relação à inclusão de diferentes doses extrato de orégano na alimentação de novilhas da raça Holandês.....	38
CAPITULO III	
Tabela 1. Composição químico-bromatológica dos alimentos da dieta experimental.....	79
Tabela 2. Descrição das atividades comportamentais observadas com vacas leiteiras recebendo dieta sem extrato vegetal e com extratos de orégano, chá verde e a mistura de ambos.....	80
Tabela 3. Médias do consumo e dos coeficientes de digestibilidade total aparente de vacas Holandês e mestiços Holandês e Gir recebendo extratos de orégano, chá verde ou ambos na dieta.....	81
Tabela 4. Médias dos atributos de condição corporal, produção e composição do leite em relação à inclusão de extrato de orégano, chá verde e sua associação na alimentação de vacas da raça Holandês e mestiços Holandês e Gir.....	82
Tabela 5. Concentração de ácidos graxos do leite de vacas da raça Holandês e mestiços Holandês e Gir alimentadas com dieta controle (sem extratos vegetais) e contendo extrato de orégano, chá verde e sua associação.....	84
Tabela 6. Médias dos atributos do hemograma e enzimas de estresse oxidativo de vacas da raça Holandês e mestiços Holandês e Gir alimentadas com dieta controle (sem extratos vegetais) e contendo extrato de orégano, chá verde e sua associação.....	86
Tabela 7. Médias dos atributos comportamentais de vacas da raça Holandês e mestiços Holandês e Gir alimentadas com dieta controle (sem extratos vegetais) e contendo extrato de orégano, chá verde e sua associação.....	87
Tabela 8. Médias de produção de calor metabólico, gases produzidos e AGV de vacas da raça Holandês e mestiços Holandês e Gir alimentadas com dieta controle (sem extratos vegetais) e contendo extrato de orégano, chá verde e sua associação.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AOAC	Official Methods of Analysis
AGV	Ácidos Graxos Voláteis
bat/min	Batimentos por minuto
Ca	Cálcio
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CH ₄	Metano
CO ₂	Dióxido de carbono
CCS	Contagem de Células Somáticas
CCSc	Contagem de Células Somáticas transformada por logaritmo
CLA	Ácido linoleico conjugado
CMI	Concentração mínima inibitória
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Cr ₂ O ₃	Sesquióxido de cromo
CV	Extrato de chá verde
CZ	Cinzas
EB	Energia bruta
EE	Extrato etéreo
ECC	Escore de Condição Corporal
EO	Extrato de orégano
EFSA	Autoridade Européia para Segurança dos Alimentos
ESD	Extrato Seco Desengordurado
et al.	E outros
DIVMS	Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca
DIVMO	Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria orgânica
DCFER	Oxidação diclorofluoresceína nos eritrócitos
DCFPLA	Oxidação da diclorofluoresceína no plasma
CMS	Consumo de matéria seca
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazila
FAME	Ésteres metílico de ácidos graxos
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
GPD	Ganho de peso diário
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
hs	horas
IMS	Ingestão de matéria seca
JDS	Journal of Dairy Science
Lig	Lignina
MAPA	Ministério Agricultura Pecuária e Abastecimento
Máx.	Máximo
Min.	Mínimo

min.	Minuto
MIX	Associação chá verde e orégano
MO	Matéria Orgânica
mov/min	Movimentos por minuto
MG	Minas Gerais
MS	Matéria Seca
n	Número
na	Não analisado
n3	Ômega 3
n6	Ômega 6
NUL	Nitrogênio Ureico no Leite
NRC	National Research Council
NSC	Carboidratos não estruturais
P	Fósforo
PB	Proteína bruta
PMSF	Produção de matéria seca fecal
pH	Potencial de hidrogênio
RS	Rio Grande do Sul
SAS	Statistical Analysis Systems Institute
SOD	Superóxido dismutase
spp.	Várias espécies
TiO ₂	Dióxido de titânio
TR	Temperatura retal
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UI	Unidades internacionais
g	Grama
mg	Miligrama
mm	Milímetro
kg	Quilograma
kcal	Quilocaloria
L	Litro
cm	Centímetro
°C	Graus Celcius
°D	Graus Dornic
°GL	Graus GayLussac
v/v	Volume por volume
%	Por cento
>	Maior que
<	Menor que
®	Marca registrada
μ	Micro
~	Aproximadamente

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da cadeia produtiva do leite faz com que os produtores sejam desafiados e cobrados diariamente pela indústria, havendo um movimento para que o incremento dos índices produtivos dos rebanhos aumente, em virtude da demanda interna e externa. Os consumidores exigem produtos de melhor qualidade, saudáveis, inócuos, que tragam benefícios à saúde humana e com baixo impacto ambiental.

Os atuais investimentos da pesquisa em áreas estratégicas estão focados em alcançar resultados sustentáveis. O desafio da intensificação sustentável refere-se ao aumento da produtividade utilizando o manejo adequado dos recursos naturais com enfoque na diminuição dos prováveis impactos sobre o ambiente, principalmente pelas excessivas emissões globais de gases de efeito estufa como o metano, dióxido de carbono e compostos nitrogenados pelos ruminantes. Assim, os ganhos em produtividade devem estar relacionados à qualidade da matéria-prima, ao aumento da eficiência e redução do impacto ambiental.

A produção leiteira passa constantemente por processos de melhoria, tanto na questão de produção animal quanto na qualidade e composição do leite. A necessidade de intensificação da produção leiteira leva produtores e técnicos a adotarem ferramentas para incrementar a produção. Entre estas ferramentas encontram-se os aditivos naturais, utilizados para melhorar a qualidade das dietas oferecidas e o desempenho de animais de produção.

A utilização de extratos vegetais na alimentação humana e animal estão associados com o conhecimento antigo sobre os efeitos curativos de plantas no tratamento de doenças. Os fitoquímicos, como óleos essenciais e polifenóis, possuem compostos vegetais específicos que podem auxiliar na promoção do bem-estar, da saúde dos animais domésticos, além de poder auxiliar na diminuição dos impactos ambientais pela diminuição da produção de gases de efeito estufa dos ruminantes.

Os extratos de orégano e chá verde são extratos dos grupos de óleos essenciais e polifenóis mais estudados e já possuem alguns benefícios comprovados, principalmente sobre os efeitos na metanogênese *in vitro* quando inseridos na alimentação em ruminantes.

Apesar das informações existentes, há necessidade de mais pesquisas sobre a ação dos princípios ativos do extrato de orégano, chá verde e sua associação *in vivo*, principalmente avaliando o consumo, desempenho na produção e composição do leite, perfil hematológico e de enzimas antioxidantes e comportamento animal, para que os extratos vegetais possam ser adotados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Existe uma demanda crescente por parte dos laticínios, indústrias e dos consumidores por produtos de melhor qualidade. Tomando-se por base o que é preconizado na Instrução Normativa 62 do MAPA (BRASIL, 2011), entre os aspectos mais críticos da qualidade do leite cru citam-se a baixa concentração de sólidos, especialmente de lactose e secundariamente de proteína, especialmente de caseína (GONZALES et al., 2007; MARTINS et al., 2007; ZANELA et al., 2009), além de outros problemas como os elevados valores de contagem de células somáticas, contagem bacteriana total e reduzida estabilidade térmica. Apesar de serem considerados como componentes de pequena variação em relação à gordura, os teores de lactose e proteína (caseína) são importantes na determinação, respectivamente, do volume de leite produzido e do rendimento queijeiro. As concentrações de proteína e lactose dependem, entre outros aspectos, do ajuste do aporte nutricional e adequando funcionamento ruminal (MARQUES et al., 2010 e 2011), e ambos os componentes se beneficiam do aumento da produção e concentração ruminal de propionato, que, no metabolismo intermediário, é o principal precursor da glicose, a qual fornecerá energia para síntese proteica, poderá ter ação poupadora do uso de aminoácidos e síntese da lactose. Outro aspecto considerado é a possibilidade de melhorar a composição do leite pelo incremento de ácidos graxos insaturados, especialmente o ácido linoleico conjugado, ao qual são atribuídas inúmeras propriedades nutracêuticas (GOUVÊA et al. 2012).

No entanto, o estado metabólico das vacas pode influenciar a sua reserva de gordura corporal, produtividade e as características físico-químicas do leite. Vacas com média a alta produtividade, no primeiro terço da lactação, apresentam balanço negativo de energia e mobilizam suas reservas corporais, para compensar o consumo insuficiente de nutrientes. Concomitantemente, o sistema imune está deprimido, o que aumenta a probabilidade de ocorrência de doenças, distúrbios metabólicos e digestivos, além da redução da eficiência reprodutiva (NRC, 2001). Esses distúrbios são apontados como os fatores mais importantes do descarte de vacas leiteiras (REMPPIIS et al., 2011).

Buscam-se alternativas que possam minorar a ocorrência desses problemas, sendo particularmente atraentes aquelas com potencial de minimizar os efeitos ambientais deletérios, como a poluição nitrogenada e a produção dos gases de efeito estufa, e sem apresentar ação biocida, como os antibióticos. Os fitoquímicos são substâncias ativas oriundas dos extratos de plantas, com propriedades específicas e funções terapêuticas. Os componentes isolados podem apresentar efeitos sinérgicos quando misturados (BENKEBLIA, 2004). O interesse pelo uso desses produtos na alimentação e produção animal vem crescendo nos últimos anos (AWIKA & ROONEY, 2004; WINDISCH et al., 2008; VAKILI et al., 2013).

2.1. Fitoquímicos

Como a preocupação crescente da sociedade com aspectos relacionados à segurança alimentar, sustentabilidade dos sistemas de produção e impacto ambiental, pode-se supor que a tendência já observada de redução do uso de produtos antibióticos ou daqueles que deixam resíduos no produto animal final ou no ambiente seja mantida ou mesmo aumentada. Nesse contexto, justifica-se estudar o uso de fitoquímicos com potencial de ação benéfica no rúmen e glândula mamária, e verificar seus efeitos sobre o desenvolvimento e saúde dos animais, produção e composição do leite e produção de gases que afetam o ambiente.

Os extratos vegetais como, por exemplo, os óleos essenciais, saponinas, substâncias picantes, flavonóides, terpenos e polifenóis possuem propriedades terapêuticas e implicações metabólicas nos indivíduos que os consomem. Resultados de pesquisas demonstrando as propriedades nutracêuticas desses fitoquímicos estão amplamente conhecidas em humanos e em animais de laboratório, porém em ruminantes e por sua vez, em bovinos leiteiros, somente nos últimos anos estão sendo realizadas. O enfoque em ruminantes tem sido objetivamente sobre o efeito que os extratos vegetais e seus compostos provocam no ambiente ruminal e na população microbiana do rúmen (HRISTOV et al., 2013; KHIAOSA-ARD & ZEBELI, 2013). As demais implicações que o uso destas substâncias extraídas de plantas no *status* imunológico e bioquímicos dos animais recebendo tais substâncias e a provável influência destes extratos no comportamento ingestivo e social dos animais não estão completamente elucidados, ainda existindo uma carência de trabalhos científicos sobre estes parâmetros (DURMIC & BLACH, 2015).

Nas últimas décadas, o processo de extração de componentes ativos das ervas e o conhecimento de suas propriedades terapêuticas têm sido melhorados com um crescente uso de produtos nutracêuticos e fitoterápicos (ZHOU et al., 2004). Estes produtos naturais encontram aplicação como alternativa aos aditivos que podem representar um risco para a saúde humana com resíduos que permanecem no corpo do animal. A Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos (EFSA) tem tomado algumas decisões legais importantes na produção de carne e em questões relacionadas à saúde humana, proibindo aditivos e antibióticos sintéticos na alimentação animal (BRUFAU, 2007). No entanto, estes regulamentos legislativos abriram oportunidades para a utilização de extratos de plantas que possuem função similar na fisiologia animal (DELAQUIS et al., 2002).

A utilização medicinal e culinária de extratos vegetais começou no Egito e na Mesopotâmia (BURT, 2004), sendo que a primeira descrição de um processo de purificação química de extratos de plantas é creditada ao cientista catalão Villanova, no século XII. Naquela época, ele utilizava óleos essenciais de espécies botânicas nativas da Catalunha (GUENTHER, 1948). Atualmente, o aumento do uso de extratos de plantas segue uma consciência de conservação ambiental ligada a um mundo como modelo de desenvolvimento sustentável, onde os produtos naturais têm um papel fundamental a desempenhar (VAN DE BRAAK & LEIJTEN, 1999; DEDL & ELSENWENGER, 2000; BAUER et al., 2001).

Na alimentação animal, a utilização de extratos de plantas tem o objetivo da dieta mediterrânea humana, na qual diferentes espécies vegetais são usadas como condimentos para cozinhar alimentos e atração através da palatabilidade. Por outro lado, as propriedades medicinais destas plantas condimentares promovem efeitos benéficos para o perfil hematológico, incluindo a desintoxicação do organismo e atuando como antioxidantes (HALVORSEN et al., 2002; DRAGLAND et al., 2003; COBELLIS, TRABALHZA-MARINUCCI & YOU, 2016).

Para compreender os efeitos dos extratos de plantas na fisiologia animal é necessário conhecer as diferentes classes químicas dos componentes ativos e sua função no metabolismo animal. Componentes fitoquímicos ativos de extratos de plantas incluem óleos essenciais, polifenóis, flavonóides, entre outros, presentes em concentrações menores.

Os componentes fitoquímicos ativos dos extratos de plantas incluem estruturas químicas diferentes, com propriedades específicas e funções terapêuticas. Os componentes isolados têm efeitos sinérgicos quando misturados. Misturas com formulações diferentes, com pequena quantidade dos componentes isolados têm geralmente um efeito terapêutico ou nutracêuticos melhor na fisiologia animal, em contraste com os efeitos dos componentes ativos puros utilizados em doses maiores (BENKEBLIA, 2004; BURT, 2004). Wetscherek (2000), Dedl & Elssenwenger (2000) demonstraram em um estudo de dieta suína que os componentes isolados de extratos de plantas resultaram em maiores efeitos fisiológicos quando utilizados com ração e mistura de aditivos do que com componentes ativos puros.

Os componentes ativos de extratos de plantas possuem algumas funções fisiológicas específicas que já estão esclarecidas, porém muitas respostas no organismo animal ainda precisam ser explicadas. Entre os efeitos benéficos fisiológicos promovidos a partir de extratos vegetais podem ser citados, a estimulação do sistema imunológico dos animais (ALEXANDER, 2002; FUJIWARA et al., 2002), o aproveitamento de nutrientes, incremento da produção de sucos digestivos (WETSCHEREK, 2000), uma melhor ação antioxidante (QIAN et al., 2004, DURAK et al., 2004), atividade antibacteriana e antifúngica (LAU, 1989; BURT, 2004).

Existem ainda poucas informações quanto aos efeitos desses aditivos sobre as respostas produtivas, reprodutivas e imunológicas em gado leiteiro. Estudos demonstram que respostas ao uso de fitoquímicos foram variáveis, desde aquelas sem efeitos sobre o consumo, a produção leiteira e eficiência de produção (HOLTSHAUSEN et al., 2009; TASSOU & SHAVER, 2010; TEKIPPE et al., 2011), efeitos muito limitados (BENCHAAR et al., 2006) ou efeitos positivos sobre consumo e produção leiteira (KUNG et al., 2008), apesar de poucas evidências de efeitos sobre a composição do leite, aspectos reprodutivos e sanitários.

Entre os principais fitoquímicos, destacam-se os óleos essenciais e polifenóis.

2.1.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são uma mistura de terpenóides aromáticos, líquidos e lipofílicos (ASBAHANI et al., 2015), obtidos a partir de diferentes partes da planta - tais como, folhas, raízes, caule. A tecnologia utilizada para extração destes óleos essenciais comerciais é a destilação a vapor (destilação simples), embora também existam os processos de fermentação ou extração por solventes (BURT, 2004; YANG et al., 2010; ZHANG et al., 2010). Os óleos essenciais são produzidos pelas plantas para a defesa contra predadores, parasitas, estresse ambiental e doenças (JOUANY & MORGAVI, 2007).

Os óleos essenciais possuem muitas substâncias químicas diferentes (20-60 componentes em cada óleo), tais como álcoois, aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos, ésteres e éteres (BENCHAAR et al., 2007). Destacam-se os óleos do thymol (extraído do tomilho – *Thymus vulgaris*), carvacrol (extraído do orégano *Origanum sativum*), alina e alicina (extraídos do alho – *Allium sativum*), citrol e citronolol (extraídos de diversas plantas cítricas), menthol (extraído da menta *Mentha piperita*) e cinamaldeído (extraído da canela – *Cinnamomum zeylanicum*), todos com efeitos conhecidos e métodos de extração de fácil operação (VELLUTI et al., 2003).

A composição dos óleos essenciais pode ser altamente variável dependendo de muitos fatores, tais como: o tipo de espécies da planta, sua fase de crescimento e as partes da planta utilizadas para extrair o óleo; o ambiente de crescimento da planta, como a composição do solo, temperatura ambiental, luz, umidade e estresse (HART et al., 2008); e os métodos de extração de óleos essenciais (OKOH, SADIMENKO e AFOLAYAN, 2010).

Os óleos essenciais atuam em diversas funções orgânicas, porém seu mecanismo de atuação ainda não é totalmente conhecido. Possuem funções antimicrobianas (BENKEBLIA, 2004; BURT, 2004; KAVANAUGH & RIBBECK, 2012; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, CABO & RODRÍGUEZ-HERRERA, 2015), antifúngicas (VELLUTI et al., 2003; RASOOLI & ABYANEH, 2004;), atividade antioxidante e de proteção celular, principalmente em glóbulos vermelhos e glóbulos brancos (MIRON et al., 2000; ASGARY et al., 2003; LIMA et al., 2004; DURAK et al., 2004). A ação imunoestimulante também foi verificada por Alexander (2002) e Fujiwara et al. (2002), que associaram respostas positivas no número de glóbulos brancos quanto óleos essenciais foram incluídos na dieta de animais e humanos, quanto em situações em que os animais e humanos ficaram expostos em ambientes com presença de odores provenientes da mistura de diferentes óleos essenciais. Os odores oriundos dos óleos essenciais também são parcialmente responsáveis por sua capacidade tranquilizante, agindo diretamente no sistema nervoso central, sobretudo no córtex cerebral e hipotálamo (BROUGHAN, 2002).

Em ruminantes, a primeira utilização de óleos essenciais na dieta foi como uma alternativa de reutilização de subprodutos vegetais (WOHLT et al., 1981). Porém, pesquisas recentes no uso de óleos essenciais em dietas de ruminantes procuram entender melhor sua atuação sobre o ambiente ruminal, mais precisamente o seu mecanismo de ação sobre a microflora ruminal (COBELLIS, TRABALHZA-MARINUCCI & YOU, 2016). Os resultados a seguir descritos permitem hipotetizar que esses aditivos poderiam melhorar a

conversão alimentar, incrementar a produção leiteira e reduzir o impacto ambiental das dietas (excesso de excreção nitrogenada e emissão de metano). Michiels et al. (2008) relataram que o timol, carvacrol, eugenol e cinamaldeído são principalmente, e quase completamente, absorvidos a partir do estômago e do intestino delgado proximal em leitões após a administração oral. Já a degradação substancial dos mesmos compostos ocorre no ceco, apesar da degradação e absorção também poder ocorrer no rúmen. Com base nessas considerações, são necessárias pesquisas adicionais para determinar o quanto dos óleos essenciais que pode ser degradado e/ou metabolizado no trato digestivo de ruminantes.

2.1.1.1 Efeitos sobre o ambiente ruminal

Cobellis, Trabalhza-Marinucci & You (2016) enumeram, em uma extensa revisão, os inúmeros efeitos do uso de óleos essenciais no ambiente ruminal, sendo possível verificar diferenças na diminuição da produção de amônia e emissão de metano, aumentar a concentração de propionato e modificar a quantidade total de ácidos graxos voláteis (AGV). Ando et al. (2003) utilizaram uma combinação de óleos essenciais e observaram uma diminuição na concentração de amônia ruminal e do número de protozoários de novilhos da raça Holandês. Cardozo et al. (2004) trabalharam isoladamente com extratos de canela, orégano, anis e alho e obtiveram modificações nos padrões de fermentação e de população microbiana *in vitro* quando comparados ao grupo controle. Molero et al. (2004) forneceram duas dietas com alto e baixo teor de concentrado para novilhas, e verificaram uma melhor atuação dos óleos essenciais sobre os parâmetros fermentativos e adaptação da flora microbiana somente quando misturados à dieta de baixo teor de concentrado. Newbold et al. (2004) desenvolveram trabalhos com ovinos fistulados, e observaram uma ação antimicrobiana seletiva dos óleos essenciais sobre a flora ruminal, com redução na degradação da proteína e no processo de desaminação no rúmen.

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 para 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, produção de AGV, digestão da fibra e produção de metano (MACHEBOEUF et al., 2008).

A ação antimicrobiana no rúmen é corroborada por diversos pesquisadores, que buscaram encontrar alternativas para a redução da emissão de metano decorrente da fermentação ruminal dos alimentos por bovinos e ovinos. Utilizando quatro óleos essenciais para vacas em lactação e novilhos de corte em terminação, Spanghero et al. (2008) verificaram a redução na população de algumas espécies bacterianas ruminais e a redução na produção de metano para as duas categorias de animais.

Porém, nem todos os óleos essenciais possuem a mesma capacidade de reduzir a população de microrganismos metanogênicos no rúmen, como ocorreu no trabalho conduzido por Beauchemin & McGinn

(2006), os quais utilizaram óleo essencial extraído de pimenta na dieta de novilhos de corte e não verificaram diferenças na emissão de metano entre o grupo controle e o grupo que recebeu óleo essencial.

Outros óleos essenciais como os extraídos da citronela (*Cymbopogon nardus*), da canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e do gengibre (*Zingiber officinale*), são bastante utilizados por serem de fácil extração e apresentarem resultados positivos na interferência do trato ruminal, porém Andrade et al. (2012), avaliando as possíveis atividades antioxidante e antibacteriana destes extratos, citam não constatarem efeito inibitório dos óleos essenciais de *C. nardus*, e *Z. officinale* frente à espécie *Escherichia coli*. Neste mesmo estudo, foi observado o fator atividade antioxidante pelo teste do 2,2-Difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), no qual o óleo de citronela foi significativamente mais ativo, não sendo observada atividade antioxidante para os óleos essenciais de canela e gengibre.

A presença natural ou a inclusão na dieta de óleos essenciais na dieta de ruminantes pode afetar positivamente (NARJISSE et al., 1996), ou negativamente o consumo dos alimentos e mesmo não apresentar efeito (ESTELL et al., 2007).

Cardozo et al. (2004) investigaram a digestibilidade *in vitro* testando dietas individuais com os seguintes tratamentos: extrato de canela, orégano, anis e alho. Os resultados mostraram uma alteração significativa de melhora nos padrões de fermentação ruminal e população microbiana do rúmen, em contraste com o grupo controle de animais. É possível concluir que os óleos essenciais inibiram a produção de amônia no ambiente ruminal e a regulação da atividade de flora microbiana, mas os autores destacam que esses resultados devem ser utilizados com cautela devido à avaliação de curto prazo.

A inclusão de óleos essenciais 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 no escape ruminal de N para o intestino (McINTOSH et al., 2003), resultando em uma melhor eficiência alimentar nos ruminantes, bem como menor taxa de gases de emissão para a atmosfera, trazendo vantagens ambientais. A menor emissão de gases na atmosfera é um assunto de crescente interesse entre os pesquisadores da área de nutrição e produção animal (HODGES, 2003). Ruminantes são os principais contribuintes para a formação de metano biogênico, sendo estimado que a prevenção da formação de metano a partir destes animais ajuda a estabilizar as concentrações de metano atmosférico (GIBBS et al., 1989; JOHNSON & JOHNSON, 1995; HOOK, WRIGHT & McBRIDE, 2010; COBELLIS, TRABALHZA-MARINUCCI & YOU, 2016).

Usando uma mistura comercial de óleos essenciais na alimentação de vacas em pastejo, suplementadas com silagem de milho e concentrado, McIntosh et al. (2003) avaliaram o efeito sobre o metabolismo de proteínas pela flora ruminal e concluíram que os microrganismos mais sensíveis a estes componentes ativos foram bactérias e fungos anaeróbios que produziam altas taxas de amônia.

Nesse sentido, óleos essenciais e ionóforos exercem ações semelhantes na redução da produção de metano e amônia no rúmen. Busquet

et al. (2005) forneceram para novilhas uma dieta de feno de alfafa e concentrado, monensina sódica (1,25 mg/L e 125 mg/L), cinamaldeído (31,2 mg/L e 312 mg/L) e extrato de alho (31,2 mg/L e 312 mg/L). A utilização de cinamaldeído e o nível mais elevado do extrato de alho e a monensina aumentaram a produção de butirato, sugerindo uma diferença no mecanismo de ação destes componentes *in vitro* na fermentação microbiana.

Cardozo et al. (2006), usaram extratos de alfafa, óleo de anis, pimenta e uma mistura de cinamaldeído e eugenol, oferecendo uma dieta com alto nível de concentrado para novilhos de corte. Sugeriram que a utilização desses componentes pode causar diminuição na ingestão de água e na concentração de amônia, sem alterar as proporções de AGV produzidos no rúmen, independentemente da quantidade de cada óleo essencial adicionados nas dietas.

A determinação da concentração inibitória mínima (CMI) de óleos essenciais sobre as bactérias do rúmen ainda parece ser o maior desafio das pesquisas realizadas *in vivo*, pois a maioria dos casos encontrados foi determinada em ensaios *in vitro*. Millezi et al. (2012), utilizaram os óleos essenciais do *Thymus vulgaris* (tomilho), *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e *Laurus nobilis* (louro) que foram quantificados em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS) para determinação da CMI sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* Enteritidis e *Pseudomonas aeruginosa*. O óleo essencial de *C. citratus* apresentou atividade bacteriana em todas as concentrações testadas (de 0,5 a 50%) e contra todas as bactérias testadas, e os extratos de *T. vulgaris* e de *L. nobilis* apresentaram atividade antibacteriana (em concentrações a partir de 0,5%). As bactérias Gram-negativas demonstraram maior resistência ao uso dos óleos essenciais testados neste estudo. *E. coli* foi o menos sensível e foi inibida apenas pelos óleos de *C. citratus* (concentração de 50%) e *L. nobilis* (concentrações a partir de 0,5%).

2.1.1.2 Efeitos sobre o desempenho animal

Os efeitos da suplementação de óleos essenciais na alimentação animal sobre o desempenho ainda é inconclusivo, agravado pelo fato das pesquisas utilizarem combinações muito diversas de produtos, doses, formas de administração e idade dos animais dificultando a comparação direta entre os estudos. Golombeski et al. (2010) ao ofertarem doses crescentes de uma combinação de orégano, tomilho, canela e extratos de frutas cítricas (100, 200 e 400 mg/dia) a bezerras desmamadas, não verificaram diferença entre tratamentos em relação à eficiência alimentar, ao consumo ou ao desempenho. Gabbi et al. (2009b), ao avaliarem o desempenho produtivo de novilhas submetidas a diferentes dietas com aditivo fitogênico também não observaram diferença com relação ao peso e ganho de peso entre o grupo suplementado e grupo controle. Já em bovinos de corte em crescimento, Rivaroli (2014), ao administrar um MIX de óleos essenciais de orégano, alho, limão, alecrim, tomilho, eucalipto e laranja doce em doses de 3,5 e 7,0 g/animal/dia, não encontraram diferenças com relação ao peso vivo final, ganho médio diário, ingestão de nutrientes e conversão alimentar.

Assim como em ruminantes, algumas pesquisas realizadas com monogástricos não evidenciaram diferenças entre tratamentos com o uso de óleos essenciais em relação ao potencial de desenvolvimento desses animais, porém outros resultados positivos também foram encontrados. Ranucci et al. (2015), ao incluírem 0,2% de uma mistura contendo extrato de orégano e extrato da madeira de castanha na dieta de suínos em crescimento não verificaram mudança na taxa de crescimento, indicando que são necessárias mais pesquisas para definir a dose e combinação ideal para melhorar o desempenho dos suínos. Roofchae et al. (2011) suplementaram frangos de corte a partir de 1 dia até 42 dias de idade com doses de 300, 600 e 1200 mg/kg de extrato de orégano na dieta basal, e encontraram maior ganho de peso corporal com 600 mg em comparação ao grupo controle. Com relação à conversão alimentar, os autores observaram melhores resultados com suplementação de 600 e 1200 mg. Em contraponto, Symeon et al. (2010), verificaram que o consumo alimentar e de ingestão de água foram menores em frangos de corte suplementados com extrato de orégano nas doses de 100 e 250 mg/kg na sua ração. Estudos realizados com coelhos em crescimento suplementados com 0,2% de extrato de orégano líquido mostraram efeito positivo sobre o desempenho produtivo e qualidade da carne de coelhos quando comparados com o grupo controle ou grupo suplementado com extrato de alecrim, indicando-se seu uso principalmente em virtude da resposta eficiente no retardamento da oxidação lipídica da carne (CARDINALI et al., 2015).

2.1.1.3 Efeito sobre a produção de gases

Um grande número de fitoquímicos (por exemplo, saponinas, taninos e óleos essenciais) foram recentemente pesquisados por seu potencial de redução de metano, mas ainda não foram obtidos grandes avanços de sua aplicabilidade na prática. Esses componentes podem afetar a metanogênese por inibir o crescimento, desenvolvimento e atividade da população de microrganismos metanogênicos indiretamente (através da redução do número de protozoários associados com metanogênicos). Além disso, podem modificar a produção de propionato, afetando a metanogênese pela redução do aporte de hidrogênio (SZUMACHER-STRABEL & CIEŚLAK, 2012; CIEŚLAK et al, 2013).

Em ruminantes, os óleos essenciais teriam o potencial de melhorar a conversão alimentar, incrementar a produção leiteira e reduzir o impacto ambiental das dietas, devido à redução da excreção nitrogenada e emissão de metano. Ando et al. (2003), Cardozo et al. (2004), Hart et al. (2008) verificaram, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, a redução da concentração de amônia ruminal, do número de protozoários e da produção de metano (SPANGHERO et al., 2008), com melhoria da digestibilidade e adaptação da microbiota.

Benchaar et al. (2011) afirmam que óleos essenciais derivados de tomilho, orégano, canela, alho, rabanete cavalo, ruibarbo e frangula diminuem a produção de CH₄ *in vitro* de acordo com a dose dos óleos ministrados. A inibição da produção de metano ocorre em doses elevadas (> 300mg/L de

fluido de cultura) e, em muitos casos, está associada com a diminuição nas concentrações de AGV. Além disso, muitas das concentrações de óleos essenciais que têm efeito favorável na fermentação no rúmen *in vitro* são excessivas para utilização *in vivo* devido a prováveis efeitos deletérios sobre a eficiência da fermentação ruminal, aceitabilidade e, possivelmente, toxicidade. Nesse sentido, CIESLAK et al (2013) enfatizam que são necessárias investigações *in vivo* para determinar se estes compostos podem ser usados com sucesso para reduzir a metanogênese ruminal. O desafio continua sendo identificar os óleos essenciais que inibem seletivamente a metanogênese ruminal em taxas de alimentação prática, com efeitos duradouros e sem reduzir a ingestão e a digestão de alimentos e a produtividade animal.

2.1.1.4 Efeitos sobre o perfil hematológico

Em relação ao efeito estimulante dos óleos essenciais utilizados na alimentação animal sobre o sistema imunológico, Alexander (2002) e Fujiwara et al. (2002) associaram os efeitos benéficos com o maior número de leucócitos. Óleos essenciais podem ser utilizados na dieta de humanos e animais como aromaterapia. As propriedades aromáticas de alguns óleos essenciais como, por exemplo, do extrato de orégano, atuam diretamente no sistema nervoso central agindo como ansiolítico e antidepressivo em pesquisa realizada com camundongos (MELO et al., 2010).

Estudos sobre o perfil hematológico e parâmetros de comportamento de ruminantes submetidos a dietas com óleos essenciais ainda são incipientes. Gabbi et al. (2009a) analisaram parâmetros hematológicos e comportamento em novilhas Jersey e verificaram um aumento significativo nos leucócitos, linfócitos e monócitos para animais que receberam 1g/dia de uma mistura de óleos essenciais na dieta, quando comparado com os animais não suplementados. No experimento realizado pelos autores, os animais que receberam os óleos essenciais na dieta apresentaram melhor sociabilidade, menor taxa cardíaca e redução no tempo gasto para o consumo de concentrado (GABBI et al., 2009b).

Em ruminantes, supõe-se que os óleos essenciais possuam as mesmas atividades farmacológicas que em outros animais e humanos, desde que sejam protegidos para evitar a mudança da sua conformação estrutural quando da passagem pelo rúmen (ROCHFORD et al., 2008). Experimentos com substâncias de origem vegetal, como os óleos essenciais, demonstraram um efeito antioxidante nas células, principalmente nas células de defesa, Larkins & Wynn (2004) projetam este mesmo efeito em ruminantes, salientando que a proteção ao sistema de defesa de vacas em lactação seria de fundamental importância para atenuação ou supressão dos quadros de mastite.

A atividade antioxidante dos óleos essenciais está relacionada, sobretudo, à presença de compostos fenólicos. No entanto, compostos como os flavonóides e terpenóides também apresentam atividade antioxidante. Essas substâncias podem interceptar e neutralizar radicais livres, impedindo a propagação do processo oxidativo (HUI, 1996). Ressalta-se, entretanto, que, se

ministrados em excesso, os óleos essenciais, podem ter atividade pró-oxidante (BAKKALI et al., 2008).

2.1.1.5 Efeito sobre os produtos de origem animal

Viallon et al. (2000) e Tornambé et al. (2006) citam que há pouca informação disponível sobre a transferência de metabólitos secundários de plantas, tais como óleos essenciais para produtos de origem animal (por exemplo, de carne e leite) e sua possível toxicidade para os seres humanos. Há evidências de que os óleos essenciais podem ser absorvidos a partir de diferentes partes do aparelho digestivo de animais, sendo assim não se pode excluir o potencial de resíduos nos produtos animais.

Hallier et al. (2013) preocupados com a possibilidade de óleos essenciais conferirem um indesejável odor ou sabor ao leite, a produtos derivados ou interferir no processamento e deixar resíduos no leite, suplementaram vacas leiteiras com um composto de óleos essenciais com timol, carvacrol e cinamaldeído ofertado nas doses habituais, contendo 200 g do suplemento na alimentação, o que proporcionou uma dose de 60 mg/dia por vaca de componentes de óleo essencial e, em outro tratamento, 120 mg/vaca por dia. Um método para extração dos compostos voláteis foi desenvolvido para análise em câmara de expansão por microextração em fase sólida com cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Nenhum dos quatro componentes dos óleos essenciais foram encontrados em amostras de leite, independentemente da dose administrada. Por outro lado, Lejonklev et al. (2013), ao investigarem a exposição respiratória, através de uma esponja umedecida com óleos essenciais provenientes de sementes de tomilho e orégano em uma câmara, e infusão gastrointestinal através de uma cânula no duodeno com os mesmos terpenos voláteis, em vacas leiteiras da raça Holandês, concluíram que todos os tratamentos apresentaram detecção no leite dos mesmos compostos do administrado logo após a exposição aos óleos essenciais. Entretanto, pouco ou nenhum efeito foi detectado no leite do dia seguinte. Por outro lado, os terpenos apareceram inalterados na transferência para o leite, independentemente da via de exposição. Óleos essenciais voláteis podem influenciar o sabor do leite uma vez que são transferidos tanto pelo trato gastrointestinal como pela exposição respiratória.

Contudo, a possibilidade de incrementar fitoquímicos em produtos de origem animal como o leite, por exemplo, já vem sendo estudada. Amirdivani & Baba (2015) avaliaram a incorporação de extrato de chá verde em iogurtes, verificando o aumento de bactérias benéficas à fermentação do iogurte (*Lactobacillus* spp. e *S. thermophilus*) e à prevenção de estresse oxidativo, aumentando a atividade antioxidante de iogurte. Os autores consideram a adição de fitoquímicos no iogurte como um novo produto com propriedades funcionais e componentes valiosos. A suplementação de extrato de orégano e extrato da madeira de castanha na dieta de suínos em crescimento pode ser útil para aumentar o estado antioxidante, reduzindo a oxidação de lipídeos e, assim, aumentar o prazo de validade da carne (RANUCCI et al., 2015). Entretanto, pesquisas futuras devem avaliar mais

profundamente a eventual transferência de resíduos de fitoquímicos para produtos de origem animal, como carne e leite (COBELLIS; TRABALHZA-MARINUCCI & YOU, 2016).

2.1.2 Polifenóis

Outros aditivos com potencial de uso são os polifenóis, os quais são formados por dois anéis aromáticos (BEECHER, 2003). Fontes naturais ricas nessas substâncias são chá verde, soja, maçã, casca da uva, cacau, entre outros, atuando diretamente no metabolismo celular (BUSLIG & MANTHEY, 2002), como antioxidantes (QIAN et al., 2004), inclusive nas células mamárias (LAUZON et al., 2005) e apresentando propriedades anticarcinogênicas, antimicrobianas e anti-inflamatórias. Broudisou et al. (2000) relataram aumento do processo fermentativo utilizando polifenóis, inibição da produção de metano e melhor aproveitamento dos nutrientes na digestão.

Os taninos, pertencentes ao grupo dos polifenóis, são divididos em dois grupos: taninos hidrolisáveis, ésteres de um açúcar, que são tóxicos para os ruminantes (MCSWEENEY & MACKIE, 1997) e, taninos condensados, que são derivados de flavonóides (LARKINS & WYNN, 2004). Taninos condensados são os mais abundantes presentes em leguminosas forrageiras, utilizadas em pastagens para ruminantes domésticos (MIN et al., 2003). De acordo Rochfort et al (2008) o nível de taninos nas plantas depende das condições ambientais, assim como apresentado por Barry (1985). Na nutrição de ruminantes, são estudados e avaliados, porque eles têm um papel importante como redutor de metano, devido à inibição da população do rúmen (NASCIMENTO et al., 2000; WAGHORN & CLARK, 2006), e no controle de parasitas (LARKINS & WYNN, 2004; PUCHALA et al., 2005; RAMÍREZ-RESTREPO & BARRY, 2005; BEAUCHEMIN et al., 2007; ROCHFORT et al., 2008). Taninos condensados também são capazes de se ligar e precipitar proteínas (RAMÍREZ-RESTREPO & BARRY, 2005; VASTA et al., 2008), reduzindo a degradação de proteína pelos microrganismos do rúmen e a passagem de mais proteína *by-pass*.

A atividade dos taninos não é completamente conhecida. Inúmeros estudos utilizando a suplementação de taninos sugere uma forte atividade na mitigação da produção de metano, contudo, os efeitos parecem estar ligados principalmente à inibição da degradação de fibras (efeito indireto) (BODAS et al., 2012).

Puchala et al. (2005) forneceram *Sericea lespedeza* (*Lespedeza cuneata*) e uma mistura de capim-colchão (*Digitaria ischaemum*) e festuca Kentucky 31 (*Festuca arundinacea*) para cabras Angorá. As cabras que ingeriram grande quantidade de taninos condensados apresentaram menor taxa de emissão de metano por dia em comparação com cabras que receberam menor quantidade de taninos condensados. Beauchemin et al. (2007) suplementaram novilhas e novilhos da raça Aberdeen angus com extrato de quebracho-colorado (*Schinopsis quebracho colorado*) em níveis de 0,1 e 2% da matéria seca na dieta, não observando diferenças entre os tratamentos para redução do metano, mas o efeito da positivo na

degradabilidade foi verificado no tratamento com 2% de extrato de quebracho-colorado. Ramírez-Restrepo & Barry (2005) citam, em sua revisão, que a menor produção de metano está associada com a alta taxa de carboidratos não estruturais de fibra em detergente neutro e com a presença de taninos condensados na forragem oferecida aos ruminantes domésticos. Em um experimento com vacas leiteiras, foram avaliadas duas forrageiras, com baixa e alta taxa da proporção de carboidratos não estruturais: fibra em detergente neutro (NSC:FDN) e alto nível de taninos condensados (0 e 27/g/kg/MS). A produção de metano foi inferior na associação com alta relação NSC:FDN e alto teor de tanino condensado (24,6 g CH₄ por kg CMS e 19,5 g de CH₄ por kg CMS), respectivamente.

A infusão de casca de pinheiro, considerada como rica em taninos e ácidos fenólicos, na dieta composta por diferentes concentrações de proteína bruta de caprinos demonstrou que um nível moderado de casca de pinheiro (15%) como suplementação pode melhorar o fluxo de nitrogênio gastrointestinal com o objetivo de melhorar o desempenho animal, porém sua inclusão tem impacto negativo sobre a digestibilidade da fibra e proteína (MIN et al., 2015).

Os taninos condensados são bastante conhecidos e representam o grupo mais importante de polifenóis na nutrição animal. Interferem distintamente em monogástricos e ruminantes. Em ruminantes, os taninos podem produzir efeitos positivos, reduzindo a quantidade de proteína degradada no rúmen e aumentando a quantidade de proteína disponível no intestino delgado, além de poder eliminar parasitas e diminuir o timpanismo espumoso (MUELLER-HARVEY, 2006). Já em suínos, aves e peixes, afetam o valor nutricional dos alimentos, como consequência da formação de complexos com as proteínas da dieta, com carboidratos e outros nutrientes, inibindo a atividade de várias enzimas digestivas como a α -amilase e α -glicosidases para carboidratos, lipase pancreática e gástrica para lipídeos e tripsina e proteases diversas para proteínas. Essa diminuição da absorção ocorre através da parede celular, devido à formação de complexos com íons divalentes de metais e à erosão de células epiteliais do intestino (WARREHAM et al., 1994; McDOUGALL et al., 2005).

O controle de parasitas em pastagem de ruminantes domésticos foi verificado em alguns estudos (MIN et al., 2003; RAMÍREZ-RESTREPO & BARRY, 2005; REVELL et al., 2008). Nguyen et al. (2005) destacaram o grande potencial do uso de forrageiras com alto teor de taninos condensados na prevenção de nematódeos gastrintestinais para caprinos e ovinos, com resultados de reinfestação e ovos viáveis comparáveis aos anti-helmínticos sintéticos. Revell et al. (2008) observaram que doses elevadas de taninos condensados têm um efeito deletério na saúde e bem-estar dos ruminantes domésticos, mas pequenas doses podem ser benéficas para o controle de parasitas, especialmente intestinais, nos casos de resistência a nematóides como os anti-helmínticos tradicionais. Min et al. (2003) e Ramírez-Restrepo & Barry (2005) sugerem o uso de leguminosas forrageiras como uma valiosa ferramenta no controle de parasitas para animais em pastejo. Espécies como *Lotus corniculatus*, *Hedysarum coronarium*, *Lotus pedunculatus* e *Chicorium*

intybus podem ser usadas como uma alternativa aos tradicionais anti-helmínticos (NGUYEN et al., 2005).

Recentemente, Kondo et al. (2016) destacaram a importância e os benefícios já estudados da suplementação de plantas contendo taninos na alimentação de ruminantes. Com isso, um estudo foi realizado para investigar a possibilidade de incrementar subprodutos agroindustriais na dieta desses animais. Entre os quinze subprodutos avaliados, quatro mostram capacidade moderada de precipitar proteína, demonstrando potencialidade para ser considerados como alimentos que reduzem a degradação da proteína no rúmen. O chá verde foi considerado preferível como suplemento de proteínas devido ao alto teor de proteína bruta e melhor capacidade de precipitação de proteínas.

Os flavonóides pertencem a uma subclasse de polifenóis e são substâncias formadas por dois anéis aromáticos onde, cada qual contém pelo menos um hidroxilo delimitado por três carbonos (BEECHER, 2003). Os flavonóides presentes em maior quantidade na dieta animal são flavonóis (catequinas mais proantocianidinas) e antocianidinas. Tais substâncias são reconhecidas como importantes tanto para a manutenção do estado metabólico em animais e do no estado fisiológico em humanos (BROWNSON et al., 2002; BEECHER, 2003; QIAN et al., 2004). Os extratos vegetais que contêm flavonóides, tais como chá verde, soja, maçã, uva, entre outros, é recomendado em quantidades diárias na alimentação, a fim de garantir a inclusão adequada de flavonóides dieta. Tedesco et al. (2004) ao ofertarem extrato de silimarina, um flavonóide considerado hepatoprotetor natural, registraram melhor escore corporal, um pico mais persistente de lactação e uma redução em distúrbios metabólicos relacionados ao parto e processo de lactação.

Devido à sua estrutura química, os flavonóides atuam diretamente no metabolismo celular (BUSLIG & MANTHEY, 2002), apresentando função relevante como antioxidante em condições *in vivo*, bem como receptores de elétrons (QIAN et al., 2004). Pesquisas realizadas por Brownson et al. (2002) demonstraram a capacidade do resveratrol e galato de epigallocatequina, dois flavonóides diferentes, que atuam diretamente nas células potencialmente cancerígenas, após os danos causados por processo de oxidação *in vivo*. O efeito antioxidante é demonstrado por Frei & Higdon (2003) em um experimento que avalia o efeito flavonóide do chá verde quando usado para indução oxidativa de células em camundongos. Os autores obtiveram redução relevante nos índices de aterosclerose, bem como nos processos indutores de células cancerosas de DNA oxidados.

Lauzon et al. (2005) demonstraram que a utilização de catequinas protege o tecido epitelial da glândula mamária de danos dos processos oxidativos. Usando silimarina, uma substância rica em flavonóides, Tedesco et al. (2004) verificaram que vacas consumindo catequinas apresentaram um melhor escore de condição corporal, maior produção no pico de lactação e maior persistência da lactação, além de redução de distúrbios metabólicos relacionados ao parto e processo de lactação.

O principal alvo de estudo dos flavonóides em ruminantes é sua ação no ambiente ruminal. Broudiscou et al. (2000) testaram *Lavandula*

officinalis, *Solidago virgaurea*, *Equisetum arvense* e *Salvia officinalis* em experimentos de digestibilidade conduzidos *in vitro*. Os autores relataram aumento do processo fermentativo utilizando flavonóides de *Lavandula officinalis* e *Solidago virgaurea* e inibição da produção de metano, ao isolar os flavonóides de outras espécies mencionadas, com melhor aproveitamento dos nutrientes na digestão. Posteriormente, Broudicou et al. (2002) obtiveram um aumento na produção de AGV, bem como uma maior degradabilidade da proteína utilizando os flavonóides extraídos a partir de 13 extratos de plantas diferentes.

Maciej et al. (2016) pesquisaram os efeitos da suplementação de diferentes doses de flavonóides (10 e 20 mg/kg de peso corporal de quercetina e 10 mg/kg de peso corporal de chá verde) em bezerros machos da raça Holandês recém-nascidos com o intuito de esclarecer os efeitos potenciais de promoção da saúde. As concentrações de proteína total, albumina, ureia, lactato, glicose, ácidos graxos não esterificados, insulina e cortisol no plasma sanguíneo variaram ao longo do tempo, mas não entre os grupos. Os resultados podem concluir que a administração de quercetina e catequinas nas dosagens utilizadas resultou em efeitos fracos na saúde, além de não serem verificados efeitos sobre o metabolismo e status antioxidante desses animais.

Os extratos vegetais e seus componentes ativos puros são uma alternativa para a nutrição e produção de ruminantes, podendo ser usados para substituir as substâncias sintéticas. No entanto, pesquisas mais aprofundadas são necessárias em ruminantes para avaliar diferentes parâmetros ainda dúbios em relação à produtividade e ao comportamento dos animais, reações bioquímicas, imunológicas e dados referentes à reprodução, investigando sua influência no metabolismo do animal como um todo. A inclusão de aditivo fitoquímico, tanto nos sistemas de produção de carne quanto de leite, vai ao encontro das preocupações da sociedade com a segurança alimentar e o meio ambiente, apresentando-se como um dos maiores incentivos ao estudo desses extratos naturais na alimentação de ruminantes.

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

3.1 Hipóteses

- ✓ O uso de extrato de orégano na dieta de novilhas da raça Holandês melhora a aceitabilidade do alimento, o consumo e desenvolvimento corporal.
- ✓ A inclusão de extrato de orégano, chá verde e sua associação na dieta de vacas leiteiras melhoram o consumo, desempenho produtivo, composição do leite, perfil hematológico, comportamento animal e diminuem a produção de metano e CO₂.

3.2 Objetivos

- ✓ Avaliar o consumo de alimentos e o desenvolvimento corporal de novilhas leiteiras não gestantes recebendo doses de extrato de orégano (*Origanum vulgare*) no concentrado e compará-las com o controle.
- ✓ Avaliar a aceitabilidade assim como seus efeitos sobre os comportamentos ingestivo de novilhas leiteiras recebendo diferentes doses de extrato de orégano (*Origanum vulgare*) e comparar com o controle (sem extrato vegetal).
- ✓ Avaliar o consumo de alimentos, a digestibilidade, a evolução do peso e o escore de condição corporal, a produção e composição físico-química, e perfil de ácidos graxos do leite de vacas leiteiras das raças Holandês e mestiços Holandês e Gir no terço inicial da lactação recebendo extrato de orégano (*Origanum vulgare*), chá verde (*Camellia sinensis* L.) e sua associação.
- ✓ Avaliar o perfil hematológico e enzimas antioxidantes de vacas leiteiras das raças Holandês e mestiços Holandês e Gir no terço inicial da lactação recebendo extrato de orégano (*Origanum vulgare*), chá verde (*Camellia sinensis* L.) e sua associação;
- ✓ Avaliar o comportamento social e ingestivo de vacas leiteiras das raças Holandês e mestiços Holandês e Gir no terço inicial da lactação recebendo extrato de orégano (*Origanum vulgare*), chá verde (*Camellia sinensis* L.) e sua associação.
- ✓ Avaliar produção de metano, CO₂ e produção de calor de vacas leiteiras das raças Holandês e mestiços Holandês e Gir no terço inicial da lactação recebendo extrato de orégano (*Origanum vulgare*), chá verde (*Camellia sinensis* L.) e sua associação.

CAPÍTULO II

Extrato de orégano na dieta de novilhas da raça Holandês¹

¹ Artigo escrito de acordo com as normas da Tropical Animal Health and Production

Extrato de orégano na dieta de novilhas da raça Holandês

Oregano extract into the diet of Holstein heifers

Resumo

A suplementação de extrato de orégano (EO) tem mostrado benefícios à saúde e ao desenvolvimento de animais domésticos. Esta pesquisa objetivou avaliar a inclusão de diferentes doses de extrato de orégano (*Origanum vulgare*) fornecidas a novilhas da raça Holandês sobre a aceitabilidade do alimento, consumo, medidas fisiológicas e desenvolvimento corporal. Trinta e quatro novilhas em pastejo da raça Holandês ($18,4 \pm 4,2$ meses e com $424,2 \pm 94,4$ kg de peso corporal) foram agrupadas aleatoriamente em quatro tratamentos: C = controle - sem adição de EO (n = 10 novilhas); EO2.5 = 2,5 g (n = 8); EO5.0 = 5,0 g (n = 8) e EO7.5 = 7,5 g de EO (n = 8). Os tratamentos foram ofertados diariamente e individualmente em 2,5 kg de concentrado durante 56 dias. Foram avaliados peso corporal, escore de condição corporal (ECC), medidas morfológicas, frequência cardíaca e respiratória, pH urinário, aceitabilidade do alimento e consumo. A inclusão de 7,5 g de EO no concentrado aumentou o tempo de ingestão do concentrado, reduziu o tempo de latência para entrar no cocho e a quantidade de concentrado ingerido. Os animais consumindo 5 e 7,5 g de EO apresentaram, respectivamente, a maior e a menor frequência cardíaca. A inclusão de extrato de orégano não alterou o consumo total da dieta, o ganho de peso corporal, altura de cernelha, íleo e ísquio, comprimento do corpo e dorso e profundidade do peito, ECC, frequência respiratória, temperatura retal e o pH urinário. O fornecimento de extrato de orégano não melhora o desempenho de novilhas leiteiras. Dose de 7,5 g/dia reduz a aceitabilidade do alimento.

Palavras-chave: aditivos, bovinos de leite, óleo essencial, pecuária.

Abstract

The supplementation with oregano extract (OE) has shown improvements on health and growth in domestic animals. The lack of results in young ruminants motivated this investigation which aimed to evaluate the inclusion of different doses of oregano extract (*Origanum vulgare*) offered to Holstein heifers, on the acceptability of food, intake, physiological measurements and body development. Thirty-four Holstein breed heifers (18.4 ± 4.2 months and 424.2 ± 94.4 kg body weight) were randomly grouped in four treatment groups: C = control - no addition of OE (n = 10 heifers); OE2.5=2.5 g (n = 8); OE5.0= 5.0 g (n = 8) and OE7.5= 7.5 g (n = 8). The treatments were offered daily and individually in 2.5 kg of concentrate for 56 days. Were assessed body weight, body condition score (BCS), morphological measurements, heart and respiratory rate, urinary pH, intake and acceptability of food consumption. The 7.5 g of OE in the concentrate increased the time of eating the concentrate, reduced the latency to enter the trough and the amount of the concentrate ingested. Animals consuming 5 and 7.5 g of OE presented, respectively, the highest and lowest heart rate. The inclusion of oregano extract did not alter the total diet intake, body weight gain, withers height,

ileum and ischium, body length and back and depth of chest, BSC, respiratory rate, rectal temperature and urinary pH. The supply of oregano extract does not improve the performance of dairy heifers. Daily dose of 7.5 g reduces the acceptability of the food.

Keywords: Additives. Dairy cattle. Essential oil. Livestock.

Introdução

A criação de novilhas com alto potencial produtivo em propriedades de exploração leiteira é um dos principais objetivos para a reposição do rebanho. A produção de animais leiteiros jovens é dispendiosa e exige mão de obra (Lohakare, Südekum e Pattanaik, 2012), e normalmente requer a antecipação da idade ao primeiro parto sem prejuízo e desenvolvimento corporal e da produção leiteira futura (Macdonald et al, 2005; Wathes et al., 2008).

Extratos de plantas, com propriedades específicas e funções terapêuticas como os fitoquímicos, podem melhorar a saúde animal, eficiência ruminal e conseqüentemente o ganho de peso em novilhas leiteiras. Os óleos essenciais fazem parte de um grupo de fitoquímicos que se caracteriza pelos compostos aromáticos com volatilidade elevada e que podem ser extraídos de várias partes de plantas (Broker e Acamovic, 2005; Burt, 2004). Fitoquímicos encontrados no orégano, entre eles, os óleos essenciais, demonstraram significativa atividade antimicrobiana *in vitro* (Benchaar e Greathead, 2011), antifúngica (Daouk et al., 1995) e propriedades antioxidantes (Calsamiglia et al., 2007). Em ruminantes, as pesquisas foram mais focadas em entender sua atuação sobre o ambiente ruminal, precisamente o mecanismo de ação sobre a microflora e principalmente sobre seus efeitos, parâmetros fermentativos e atividades anti-metanogênicas (Tekippe et al., 2011; Hristov et al., 2013). Bampidis et al. (2005)

avaliando a inclusão de diferentes doses de extrato de orégano em cordeiros em crescimento, não observaram efeitos positivos sobre a conversão alimentar, ganho de peso e desenvolvimento corporal, estresse oxidativo e qualidade da carne. A inclusão de extrato de orégano (0,5 e 1,0 g/animal/dia) ou folhas secas (níveis equivalentes a 144 e 288 mg de carvacrol/kg de concentrado, com oferta *ad libitum*) na dieta não afetou o consumo em ovinos em crescimento (Lin et al., 2013; Bampidis et al., 2005). Contudo, respostas sobre aspectos fisiológicos, desempenho e comportamento ingestivo de novilhas leiteiras são escassos.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a inclusão de diferentes doses de extrato de orégano (*Origanum vulgare*) no concentrado fornecido a novilhas da raça Holandês sobre a aceitabilidade do alimento, consumo, desenvolvimento corporal e medidas fisiológicas.

Material e métodos

Local, animais e tratamentos

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS, sob protocolo n. 18.510. O experimento foi conduzido em propriedade leiteira da Mesorregião de Santa Rosa, RS, Brasil, com coordenadas geográficas 27°88' S, 54°18' W e altitude de 372 metros. Foram utilizadas trinta e quatro novilhas da raça Holandês com idade média de $18,4 \pm 4,2$ meses, peso corporal médio de $424,2 \pm 76,8$ kg e escore corporal de $3,85 \pm 0,45$. O período experimental foi de 77 dias, sendo que os primeiros 21 dias foram de adaptação, onde os animais receberam a mesma dieta, sem a

adição do extrato vegetal. Os animais foram agrupados aleatoriamente em quatro tratamentos, sendo: C = controle sem adição de extrato de orégano, e nos demais tratamentos os animais receberam as 2,5, 5 e 7,5 de extrato de orégano (em g/animal/dia). Esses tratamentos foram denominados, respectivamente de EO 2,5, EO 5 e EO 7,5. Utilizou-se o produto comercial Orego Stim® Pó, na concentração mínima de 50 g/kg, contendo 80-82% de Carvacrol, 2,5-3,0% de Timol, 3,5-9,0% de p-Cimeno e 2-5,5,0% de Y-Terpineno, o qual foi incluído no concentrado, no momento de seu fornecimento.

Composição da dieta, coleta e análise dos alimentos

As novilhas permaneceram em pastagem de tifton (*Cynodon dactylon*), e entre 7:30 e 9:30 receberam, de forma individual no cocho, concentrado composto de grão de milho moído (13 kg/100 kg), farelo de soja (36 kg/100 kg), casca de soja (45 kg/100 kg), Multinúcleo Leite Avant® (5 kg/100 kg) e aditivo adsorvente de micotoxinas (1 kg/100 kg) ofertado na quantidade de 2,5 kg por animal por dia com a adição do extrato de orégano de acordo com os tratamentos. O Multinúcleo Leite Avant composto de monensina sódica (1.000 mg), Cálcio (Min. e Máx. 215 -240 mg) e concentrações mínimas de Fósforo (50 mg), Sódio (90 mg), Magnésio (15 mg), Enxofre(15 mg), Ferro (1.000 mg), Zinco (2.600 mg), Cobre (600 mg), Manganês (880 mg), Iodo (32 mg), Cobalto (12 mg), Selênio (16 g) e vitaminas A, D3 e E. Após o consumo do concentrado foi ofertado volumoso no cocho, que consistiu de 16 kg de silagem de milho e 2 kg de feno de gramíneas, sendo misturados em um vagão forrageiro. A dieta

foi formulada para um ganho de 0,7 kg/animal/dia, com consumo estimado de 2,2 a 2,5% do peso vivo (NRC, 2001).

Semanalmente foram coletadas e congeladas amostras de silagem, feno, concentrado e pastagem, as quais foram misturadas para formar uma amostra composta por alimento. As amostras foram encaminhadas para análise bromatológica e de digestibilidade *in vitro* (AOAC, 2011). Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição químico-bromatológica dos alimentos da dieta experimental.

<i>Amostra</i>	<i>MS (%)</i>	<i>FDN (%)</i>	<i>PB (%)</i>	<i>MO (%)</i>	<i>DIVMS (%)</i>	<i>DIVMO (%)</i>
Concentrado	88,73	30,04	25,48	90,75	93,19	95,33
Silagem	93,19	45,99	8,91	96,47	79,37	80,22
Feno	94,88	75,52	5,73	93,67	55,33	56,13
Pastagem	92,89	61,14	20,24	89,56	71,95	72,56

MS = Matéria Seca; FDN = Fibra em detergente neutro; PB = Proteína Bruta; MO = Matéria Orgânica; DIVMS = Digestibilidade *in vitro* da matéria seca; DIVMO = Digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica.

A ingestão do concentrado foi calculada diariamente como a diferença entre as quantidades oferecidas e as sobras.

Aceitabilidade do concentrado, consumo e medidas nos animais

Do dia 1 a 56 do tratamento cada novilha foi contida em canzís para fornecimento individual do concentrado das 07:30 h às 09:30 h. Nesses dias todos os animais foram visualmente e continuamente avaliados por dois observadores previamente treinados que registraram as seguintes atividades comportamentais usadas para estimar a aceitabilidade do concentrado contendo ou não extrato de orégano:

latência ao entrar no cocho (tempo decorrido desde a entrada das novilhas no galpão de alimentação até colocarem a cabeça no canzil, em minutos), latência para começar a ingerir o concentrado (tempo decorrido para começar a ingerir o concentrado após estar presa no canzil, em minutos) e tempo gasto para consumir o concentrado (tempo gasto para ingerir o concentrado, em minutos). Às 09:30 h os animais foram libertados dos canzils e as sobras do concentrado, quando presentes, foram removidas e pesadas separadamente por animal. Os animais receberam posteriormente feno e silagem no cocho e às 11:30 h foram liberados para a pastagem, onde permaneceram até a próxima alimentação da manhã. O consumo de concentrado foi calculado como a diferença entre a quantidade oferecida e a quantidade de sobras.

As avaliações de peso e escore de condição corporal (ECC) foram realizadas semanalmente após o consumo de concentrado, com os animais ainda presos nos canzils. O ECC foi avaliado em uma escala de escores de “1” a “5” pontos, sendo: escore 1 animal extremamente magro e o escore 5 animal extremamente gordo (Wildman et al., 1982). Foi avaliado o ganho de peso semanal com auxílio de fita métrica.

Medidas morfométricas foram mensuradas nos dias 1 e 53 do período experimental após o consumo do concentrado com os animais presos nos canzils avaliando com auxílio de fita métrica com o animal mantido em posição correta de aprumos: altura da cernelha: medindo a distância entre o ponto mais alto da cernelha e o chão; altura de anca: altura do íleo até o chão; comprimento do corpo: distância entre a ponta da escápula até o íleo; comprimento do dorso: distância entre a primeira vértebra dorsal e a última lombar; altura de ísquios: altura do ísquio até o chão e profundidade do peito.

As avaliações fisiológicas foram mensuradas semanalmente, após a ingestão do concentrado, com os animais presos nos canzéis. A temperatura retal (TR) foi obtida com um termômetro clínico veterinário inserido junto à parede do reto do animal, a uma profundidade de aproximadamente 3,5 cm. As frequências respiratórias (FR) e cardíacas (FC) foram medidas com auxílio de estetoscópio e cronômetro, durante 30 segundos, multiplicando-se os valores encontrados por dois para obter-se o número de movimentos respiratórios e batimentos cardíacos por minuto.

Quinzenalmente, a partir do início do período experimental, foi avaliado o potencial hidrogeniônico (pH) em amostras de urina as quais foram coletadas por massagem na vulva após o fornecimento de volumoso e, mensurado através de pHmetro Microprocessado de Bancada Q400MT marca Quimis.

Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi composto de quatro tratamentos: C = controle - sem adição do extrato de orégano; EO 2,5 = 2,5 g/dia; EO 5 = 5,0 g/dia e EO 7,5 = 7,5 g/dia de extrato de orégano. As novilhas foram consideradas unidades experimentais, com 10 repetições no tratamento controle e 8 repetições nos demais tratamentos.

Os dados foram submetidos à análise de variância considerando o delineamento completamente casualizado, com medidas repetidas no tempo utilizando o programa estatístico SAS 9.2 para Windows® (SAS Institute, Cary, Carolina do Norte, EUA, 2008). As médias foram comparadas por LSMEANS. O consumo total diário da dieta e as variáveis do desenvolvimento corporal (exceto peso corporal) foram submetidos à análise de variância, considerando apenas o efeito de tratamento enquanto

mas medidas de peso corporal, ECC, consumo de concentrado, aceitabilidade do concentrado, medidas fisiológicas e pH urinário foram submetidas à análise de variância (PROC MIXED), considerando o efeito de dia, tratamento, interação tratamento e dia e covariável, efeito fixo= tratamento e dia, efeito aleatório= animal e análise de regressão (PROC REG). Foi adotada a probabilidade de 0,05 e entre 0,05 até 0,10 como limites, respectivamente, para significância e tendência. Os valores de cada característica obtidos no dia 1 (prévio ao fornecimento do extrato de orégano) foram usados como covariáveis. Somente serão apresentados os resultados relativos ao efeito das doses de extrato de orégano (tratamento), uma vez que não houve interação significativa entre tratamento e dias de avaliação.

Resultados

A inclusão de EO alterou a aceitabilidade do concentrado, seu consumo, e a frequência cardíaca. A inclusão de 7,5 g/animal/dia de EO no concentrado aumentou o tempo de ingestão do concentrado e reduziu o tempo de latência para entrar no cocho. O consumo foi imediato após o oferecimento do concentrado com os fitoquímicos, não havendo em tratamento algum a latência ao ingerir. O consumo de concentrado foi menor na dose de 7,5 g/animal/dia de EO que o controle e 2,5 g/animal/dia EO. Os animais consumindo 5 e 7,5 g/animal/dia de EO apresentaram, respectivamente, a maior e a menor frequência cardíaca. A inclusão de doses de 2,5, 5 e 7,5 g/animal/dia de extrato de orégano não alterou o consumo total de dieta nem alterou o ganho de peso corporal, ECC, altura de cernelha, íleo e ísquio, comprimento do corpo e dorso e

profundidade do peito, frequência respiratória e temperatura retal nem o pH urinário (Tabela 2).

Tabela 2. Médias dos atributos com relação à inclusão de diferentes doses extrato de orégano na alimentação de novilhas da raça Holandês.

<i>Atributos</i>	<i>Controle</i>	<i>2,5 g</i>	<i>5,0 g</i>	<i>7,5 g</i>	<i>P>F</i>
Latência cocho ¹ (min)	3.7 ± 0,1 ^a	3.5 ± 0,2 ^a	3.6 ± 0,2 ^a	2.5 ± 0,2 ^b	0,0088
Tempo Consumo ² (min)	20.4 ± 0,2 ^b	20.2 ± 0,2 ^b	19.7 ± 0,2 ^c	21.6 ± 0,2 ^a	<0,0001
Consumo de concentrado em MS (kg)	2.2 ^a	2.2 ^a	2.1 ^{ab}	2.0 ^c	<0.01
Peso (kg)	499 ± 1,0	502 ± 1,0	462 ± 1,0	502 ± 1,0	-
GPD (Kg)	0,64 ± 0,07	0,70 ± 0,08	0,65 ± 0,08	0,75 ± 0,084	0,8480
ECC	3,9 ± 0,01	3,9 ± 0,02	3,90 ± 0,02	3,8 ± 0,02	0,6354
Cernelha (cm)	138,8 ± 0,62	139,2 ± 0,69	139,6 ± 0,69	138,4 ± 0,69	0,6752
Anca (cm)	139,9 ± 0,54	139,8 ± 0,61	139,5 ± 0,60	139,3 ± 0,60	0,8719
Corpo (cm)	104,0 ± 0,86	104,8 ± 0,96	104,3 ± 0,96	102,0 ± 0,96	0,1973
Dorso (cm)	175,7 ± 2,70	178, 6 ± 3,62	177,2 ± 3,03	169,8 ± 3,02	0,2112
Ísquio (cm)	139,8 ± 2,27	139,25 ± 2,52	139,15 ± 2,52	143,76 ± 2,53	0,5184
Peito (cm)	76,4 ± 0,51	75,7 ± 0,58	76,2 ± 0,58	74,8 ± 0,58	0,1599
FC (bat/min)	68,1 ± 2,24	72,6 ± 2,48	70,3 ± 2,44	68,4 ± 2,44	0,5592
FR (mov/min)	46,4 ± 1,0	45,0 ± 1,1	45,7 ± 1,1	46,4 ± 1,1	0,5448
TR (°C)	38,6 ± 0,03	38,6 ± 0,04	38,60 ± 0,06	38,6 ± 0,04	0,6418
pH urinário	8,3 ± 0,05	8,0 ± 0,06	8,30 ± 0,06	8,2 ± 0,06	0,4799

Os valores das médias foram ajustados por Lsmeans. Médias seguidas pela mesma letra na linha não são diferentes pela análise de PROC MIXED (P> 0,10)

¹Latência para se aproximar do canzil para consumo do concentrado; ²Tempo de consumo do concentrado.

GPD: Ganho de Peso Diário; ECC: Escora de Condição Corporal; FR: Frequência cardíaca; FR: Frequência respiratória; TR: Temperatura retal.

Discussão

As novilhas apresentaram ganho de peso compatível com a dieta formulada. A ausência de diferenças estatísticas quanto aos valores de peso corporal, ganho de peso, ECC e demais medidas morfométricas entre os grupos de novilhas recebendo 0, 2,5, 5,0 e 7,5 g/dia de extrato de orégano, provavelmente ocorreu pelo consumo total da dieta ser similar e, dessa forma, o consumo de nutrientes provavelmente ser semelhante além, dos animais apresentarem elevado ECC desde o início do tratamento. A diferença de consumo de concentrado foi significativa, porém, de pequena magnitude, 10%, não influenciando o seu desempenho em relação ao peso vivo, ganho médio diário e ECC. Esses resultados estão de acordo com os reportados por Golombeski et al. (2010) que ao ofertarem doses (100, 200 e 400 mg/dia) de uma combinação de orégano, tomilho, canela e extratos de frutas cítricas a bezerras desmamadas também não verificaram diferença entre tratamentos em relação ao consumo ou ganho de peso. Da mesma forma, Santos et al. (2015), ofertaram diferentes doses de composto de óleos essenciais contendo carvacrol, eucaliptol, cinamaldeído e resina de óleo de pimenta em colostro e sucedâneo para bezerras recém nascidas até 10 semanas e verificaram que o peso, medidas corporais, ocorrência de diarreia, bactérias do ácido láctico e enterobactérias, pH, ácidos graxos de cadeia curta, N-amoniacal e contagens de bactérias amilolíticas e celulolíticas, e protozoários do líquido ruminal não foram influenciados pela suplementação de óleos essenciais.

A aceitabilidade do concentrado contendo 7,5 g de EO foi menor comparado com o controle e as doses de 2,5 e 5 g de EO, pois apesar dos animais demorarem menos tempo para entrar no cocho, o consumo do concentrado foi 10% menor, e as

novilhas demoraram entre 5 e 10% mais tempo para ingerir o concentrado, indicando que o EO possa ter um efeito negativo. Esse resultado também foi observado por Launchbaugh e Provenza (1994) com cordeiros. Cobellis, Trabalza-Marinucci e You (2016) também comentam que os compostos aromáticos dos óleos essenciais podem afetar negativamente a aceitação de alimentos, onde o sabor e cheiro reduziram a aceitabilidade e ingestão alimentar, o que provavelmente resultou na menor ingestão nos animais suplementados com a dose mais elevada do EO no presente estudo.

O efeito tranquilizante do odor oriundo dos óleos essenciais agindo diretamente no sistema nervoso central foi reportado por Broughan (2002), mas isso não foi observado no presente estudo, onde inclusive se observou pequeno aumento na frequência cardíaca observado no tratamento 2,5 e 5,0 g EO em relação ao controle. Segundo Du Perez (2000), valores normais de frequência cardíaca para bovinos de leite situam-se entre 55 e 70 bat/min. Além disso, os valores de frequência respiratória e temperatura retal foram semelhantes entre os tratamentos e dentro dos limites fisiológicos para bovinos, ou seja, respectivamente inferiores a 50 movimentos por minuto em temperatura abaixo de 26 °C (Silva et al., 2012) e próximas a 38,5 °C (McDowell et al., 1958). Ao contrário do estudo realizado por Gabbi et al (2009) os quais observaram a diminuição da frequência cardíaca em novilhas suplementadas com aditivo fitogênico comparada com o grupo controle, no presente estudo não foram encontrados os mesmos resultados. Por outro lado, dados encontrados de Aydin et al. (2007), avaliando a infusão de carvacrol (100 ug/kg) em ratos laboratoriais, observaram a redução na frequência cardíaca desses animais.

A ausência de efeito da inclusão de EO sobre o pH urinário pode ser devido à semelhança de consumo total da dieta e pequena magnitude na diferença do consumo de

concentrado. Os valores alcalinos encontrados podem estar relacionados com o tipo de alimentação, com pouco uso de concentrado (Herdt, 2000). Segundo Osbaldiston e Moore (1971), o pH urinário normal dos ruminantes varia de 5,5 a 8,0.

O extrato de orégano adicionado em 7,5 g/dia ao concentrado exerce efeitos adversos de pequena magnitude sobre a aceitabilidade do concentrado e seu consumo. A inclusão diária de extrato de orégano até 7,5 g não melhora o consumo total de dieta, o desenvolvimento corporal e medidas fisiológicas.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fazenda Tambuí em nome da Srta. Marilze Guimarães Cassol pela cedência dos animais e estrutura para a realização do experimento. Ao Sr. Ivan dos Santos e a ADVET Nutrição Animal pelo fornecimento do extrato de orégano e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos recursos disponibilizados para a realização da pesquisa.

Bibliografia

Aydin, Y., Kutlay, O., Ari, S., Duman, S., Uzuner, K. and Aydin, S. 2007. Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats. *Planta Med*, 73, 1365-1371.

Association of Official Analytical Chemists 2011. *Official methods of analysis*. 18 ed. AOAC, Arlington, VA, USA.

Bampidis, V.A., Christodoulou, V., Florou-Paneri, P., Christaki, E., Spais, A.B. and Chatzopoulou, P.S. 2005. Effect of dietary dried oregano leaves supplementation on performance and carcass characteristics of growing lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 121, 285–295.

Benchaar, C. and Greathead, H. 2011. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 166, 338–355.

Broughan, C. 2002. Odours, emotions, and cognition: how odours may affect cognitive performance. *International Journal of Aromatherapy*, 12 (2), 92-98.

Broker, J.D. and Acamovic, T. 2005. Phytochemicals in livestock production systems. *Animal Feed Science and Technology*. 121: 1–4.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- A review. *International Journal of Food Microbiology*. 1,94(3): 223-53.

Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L. and Ferret, A. 2007. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. 90, 2580–2595.

Cobellis, G., Trabalza-Marinucci, M. and You, Z. 2016. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. *Science of the Total Environment*. 545-546, 556-568.

Daouk, R.K., Dagher, S.M. and Sattout, E.J. 1995. Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. *Journal of Food Protection*, 58, 1147–1149.

Du Perez, J.H. 2000. Parameters for the determination and evaluation of heat stress in dairy cattle in South Africa. *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, 67, 263-271.

Gabbi, A.M., Moraes, R. S., Skonieski, F.R. and VIÉGAS, J. 2009. Productive performance and behavior of dairy heifers submitted to diets with phyto-genic additive. *Brazilian Journal of Health and Animal Production*. 10, 949-962.

Golombeski, G., Ziegler, B., Schimek, D., Ziegler, D., Chester-Jones, H., Raeth-Knigh, M. and Linn, J. 2010. Performance of post-weaned Holstein heifer calves fed grain mixes supplemented with essential oils at differing levels. *Journal of Dairy Science (Suppl.)*, 93, (5).

Herdt, T.H. 2000. Metabolic disorders of ruminants. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 16 (2), 215-408.

Hristov, A.N., Lee, C., Cassidy, T., Heyler, K., Tekippe, J.A., Varga, G.A., Corl, B. and Brandt, R.C. 2013. Effect of *Origanum vulgare* L. leaves on rumen fermentation, production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 96 (2), 1189-1202.

Kozloski, G.V., Perez, D., Oliveira, L., Maixner, A.R., Leite, D.T., Maccari, M., Brondani, I.L., Sanchez, L.M.B. and Quadros, L.F. 2006. Chromium oxide use as a marker for measuring fecal production of grazing cattle: estimative variations due to sampling schedule. *Ciência Rural*, 36, 599–603.

Launchbaugh, K.L. and Provenza, F.D. 1994. The Effect of Flavor Concentration and Toxin Dose on the Formation and Generalization of Flavor Aversions in Lambs. *Journal of Animal Science*, 72, 10-13.

Lin, B., Lu, Y., Salem, A.Z.M., Wang, J.H., Liang, Q. and Liu, J.X. 2013. Effects of essential oil combinations on sheep ruminal fermentation and digestibility of a diet with fumarate included. *Animal Feed Science and Technology*, 184 (1-4), 24-32.

Lohakare, J.D., Südekum, K.H. and Pattanaik, A.K. 2012. Nutrition-induced changes of growth from birth to first calving and its impact on mammary development and first-lactation milk yield in dairy heifers: a review. *Asian-Australia Journal of Animal Science*. 25 (9), 1338-1350.

Macdonald, K.A., Penno, J.W., Bryant, A.M. and Roche, J.R. 2005. Effect of feeding level pre- and post-puberty and body weight at first calving on growth, milk production, and fertility in grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 88, 3363-3375.

McDowell, R.E., Lee, D.H.K. and Fohrman, M.H. 1958. The measurement of water evaporation from limited areas of a normal body surface. *Journal of Animal Science*, 17, 405-420.

National Research Council (NRC) 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th edition National Academy Science, Washington, DC, USA.

Osbaldiston, G.W. and Moore, W.E. 1971. Renal function tests in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 159, 292-301.

Santos, F.H.R., De Paula, M.R., Lezier, D., Silva, J.T., Santos, G. and Bittar, C.M. 2015. Essential oils for dairy calves: Effects on performance, scours, rumen fermentation and intestinal fauna. *Animal*, 9 (6), 1-8.

Silva, J.C.P.M., Veloso, C.M., Campos, J.M.S., Oliveira, A.S. and Vitor, A.C.P. 2012. Bem-estar do Gado Leiteiro: A importância do conforto térmico para o alto desempenho do gado. [S.l.]: Editora Aprenda Fácil, p. 125.

Statistical Analysis Systems Institute (SAS). 2008. *Statistical analysis systems*, version 9.2. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Tekippe, E., Hristov, A.N., Heyler, K.S., Cassidy, T.W., Zheljazkov, V.D., Ferreira, J.F.S., Karnati, S.K. and Varga, G.A. 2011. Rumen fermentation and production effects of *Organum vulgare* leaves in lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 94, 5065-5079.

Wathes, D.C., Brickell, J.S., Bourne, N.E., Swalia, A. and Cheng, Z. 2008. Factors influencing heifer survival and fertility on commercial dairy farms. *Animal*. 2 (8):1135-1143.

Wildman, E., Jones, G.M. and Wagner, P.E. 1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *Journal of Dairy Science*, 65 (3), 495-501.

CAPÍTULO III

Extrato de orégano e de chá verde como aditivos em dietas de vacas leiteiras¹

¹ Artigo escrito de acordo com as normas do Journal of Dairy Science (JDS)

Extrato de orégano e de chá verde como aditivos em dietas de vacas leiteiras

Resumo

Objetivou-se avaliar os efeitos da inclusão de extrato de orégano (*Origanum vulgare*), chá verde (*Camellia sinensis* L.) e sua associação no concentrado fornecido a vacas leiteiras sobre o comportamento, consumo, digestibilidade, produção e composição do leite, perfil hematológico, enzimas de estresse oxidativo, produção de calor e gases pelos animais. Trinta e duas vacas da raça Holandês (n=16) e mestiços Holandês e Gir (n=16) com idades de $5,4 \pm 2,3$ anos e peso de $533 \pm 81,63$ kg, 58 ± 20 dias de lactação e $2,5 \pm 1,6$ lactações foram distribuídos aleatoriamente em quatro tratamentos sendo: C = controle sem adição de fitoquímicos, EO = com adição de 10 gramas (g) de extrato de orégano, CV = com adição de 5,0 g de extrato de chá verde e MIX = com adição de ambos fitoquímicos. Vacas recebendo chá verde apresentaram maior consumo e produziram mais leite em relação aos grupos controle e MIX, porém, o peso corporal e o escore de condição corporal não variaram entre os tratamentos. O grupo controle produziu leite com maior concentração de gordura em relação ao tratamento MIX e com maior concentração de ureia em relação aos demais. As concentrações de proteína e alguns ácidos graxos no leite foram maiores em animais suplementados com o tratamento MIX em relação aos demais. Observaram-se maiores valores para os neutrófilos segmentados nos tratamentos controle, orégano e MIX em relação ao chá verde e maiores valores de eosinófilos para o MIX e controle em relação aos tratamentos com extrato de chá verde e orégano. Vacas suplementadas com MIX apresentaram menores valores na oxidação da diclorofluoresceína nos eritrócitos (DCFER) em relação ao controle e aos fitoquímicos isoladamente, mas níveis mais

elevados de Glutathiona reduzida (GSH) no dia 35 com a suplementação extrato de chá verde em relação ao controle, orégano e MIX. A oxidação da diclorofluoresceína no plasma (DCFPLA) tendeu ($P < 0,10$) a ser maior no controle em relação aos fitoquímicos, especialmente com a sua associação. Vacas suplementadas com extrato de chá verde apresentaram maior número de observações de ruminção total e menor número de observações deitada em relação aos demais tratamentos. A produção de metano, CO_2 e calor não foram influenciados com a adição dos extratos na dieta. O fornecimento de extratos vegetais altera o comportamento, o consumo, melhora a produção de leite, altera a sua composição, modifica o perfil hematológico e o status antioxidante.

Palavras-chave: extratos vegetais, mestiços Holandês e Gir, Holandês, polifenóis, óleos essenciais, ruminantes.

Oregano and green tea extracts as additives for dairy cows

Abstract:

This study aimed to evaluate the effects of the inclusion of oregano extract (*Origanum vulgare*), green tea (*Camellia sinensis* L.) and their association in the concentrate fed to Holstein and Holstein x Gir crossbreed cows on behavior, intake, digestibility, production and milk composition, blood profile and enzymes of oxidative stress. Thirty-two cows of Holstein ($n = 16$) and Holstein x Gir crossbreed ($n = 16$) aged of 5.4 ± 2.3 years and weighing 533 ± 81.63 kg, with 58 ± 20 days in milk and 2.5 ± 1.6 lactations were randomly assigned to four treatments (4 Holstein cows and four

Holstein and Gir crossbred cows in each one) where: C = no added phytochemicals control, OE = with addition of 10 grams (g) of oregano extract, GT = with addition of 5.0 g of green tea extract and MIX = with addition of 10 g of oregano extract and 5.0 g of green tea extract. Cows receiving GT had higher intake and produced more milk compared to C and MIX groups; cows receiving GT and C produced more milk corrected to 4% fat, but the BW or BCS did not differ between treatments. The group C produced milk with higher fat concentration in relation to the treatment MIX and higher concentration of urea in relation to others. Cows from the OE group produced milk with the lowest concentration of lactose. Cows from the MIX group produced milk with lower somatic cell count cows than those receiving OE but did not differ from those that received GT or C treatments. Total protein and some fatty acids concentrations in milk were higher in animals supplemented with MIX treatment over the others. For C, OE and MIX groups segmented neutrophils were higher compared to GT group while MIX and C groups showed higher eosinophil values compared with GT and OE. Cows fed MIX showed lower values for oxidation of dichlorofluorescein in erythrocytes (DCFER) than for C, OE and GT, but higher levels of reduced glutathione (GSH) on day 35 with GT than C, OE and MIX. Oxidation of plasma dichlorofluorescein (DCFPLA) tended ($P < 0.10$) higher in C to be compared to the phytochemicals, especially their association. Cows supplemented with GT showed the highest time spent ruminating but the lowest time spent lying Cows supplemented with MIX had higher odds to display social interactions than those supplemented with OE, GT or C. The production of methane, CO₂ and heat were not influenced by the extracts addition in diet. The supply of plant extracts change the behavior, consumption, improves milk

production, changes its composition and modifies the haematological profile and antioxidant status.

Keywords: herbal extracts, crossing Holstein and Gir, Holstein, polyphenols, essential oils, ruminants.

Introdução

A utilização de extrato de orégano e chá verde em bovinos leiteiros tem ganhado ênfase nos últimos anos devido à sua ampla gama de aplicações, especialmente com o seu efeito potencial na diminuição da produção de gases tanto em medições *in vitro* e em menor número de estudos *in vivo* e melhora no desempenho e saúde dos animais (Tekippe et al. 2011; Hallier et al., 2013; Kondo et al., 2014). Os resultados sobre esses atributos são variáveis e mesmo conflitantes e as discrepâncias nos resultados das pesquisas *in vitro*, *in situ* ou *in vivo* podem ser atribuídas a uma série de fatores como a duração do experimento ou incubação, a composição química e as doses dos óleos essenciais e polifenóis, além de uma possível adaptação de microrganismos ruminais aos óleos essenciais relacionadas à produção de gases e melhoria da digestibilidade (Cobellis et al., 2016). Flores et al. (2013) enfatizaram que é necessário cautela ao extrapolar dados obtidos *in vitro* para situações *in vivo*.

Dentre os efeitos positivos observados para animais suplementados com óleos essenciais estão a melhor digestão e eficiência alimentar, manutenção benéfica da microflora intestinal, inibição de microrganismos patogênicos, eliminação de radicais livres e atividades antioxidantes (Durmic e Blanche, 2012; Cobellis et al., 2016).

Resultados semelhantes são encontrados com a adição de polifenóis na dieta, além do aumento na absorção de aminoácidos a partir de intestino delgado, melhora o desempenho dos animais, redução de parasitas internos, pico de lactação mais persistente e uma redução em distúrbios metabólicos relacionados ao parto e processo de lactação (Tedesco et al., 2004; Mueller-Harvey, 2006, Ramdani et al., 2013). A inclusão de extratos vegetais na dieta de vacas leiteiras pode estimular o sistema imune com a inibição da peroxidação de lípidos das membranas e exercer ação direta sobre a atividade das atividades das enzimas antioxidantes (Calsamiglia et al., 2007).

Embora estudos já tenham avaliado a produção e composição do leite de vacas suplementadas com extrato de orégano (Lejonklev et al, 2013; Lacerda et al., 2014) e com extrato de chá verde (Eruden et al., 2005) as doses utilizadas, a associação dos extratos e a avaliação das vacas na fase mais desafiadora da lactação são as contribuições do presente estudo.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a inclusão de extrato de orégano (*Origanum vulgare*), chá verde (*Camellia sinensis* L.) e sua associação no concentrado fornecido a vacas da raça Holandês e mestiços Holandês e Gir sobre o comportamento, consumo, digestibilidade, eficiência alimentar, produção e composição do leite, perfil hematológico, enzimas de estresse oxidativo, produção de calor metabólico e gases pelos animais.

Material e métodos

Local, animais e tratamentos

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS, sob protocolo nº 18.510. Trinta e duas vacas leiteiras (16 da raça Holandês e 16 mestiços Holandês e Gir) foram utilizadas na pesquisa conduzida no Campo Experimental José Henrique Bruschi da Embrapa Gado de Leite, Coronel Pacheco-MG, Brasil nas coordenadas geográficas 21° 35' 16" S, 43° 15' 56" W e altitude de 484 metros. O período experimental foi de 58 dias, sendo que os primeiros 14 dias foram de adaptação, onde todos os animais receberam a mesma dieta basal e sem a adição de extratos vegetais seguidos de 44 dias de mensurações, quando os animais receberam um dos quatro tratamentos. As vacas com idade de $5,4 \pm 2,3$ anos e peso de $533 \pm 81,63$ kg, 58 ± 20 dias de lactação e $2,5 \pm 1,6$ lactações foram distribuídas aleatoriamente em quatro tratamentos, com distribuição equilibrada das raças em cada tratamento (4 vacas da raça Holandês e 4 vacas mestiços Holandês e Gir por tratamento) sendo: C = controle sem adição de fitoquímicos, EO = com adição de 10 gramas (g) por animal por dia de extrato de orégano, CV = com adição de 5,0 g/animal/dia de extrato de chá verde e MIX = com adição de 10 g de extrato de orégano e 5,0 g/animal/dia de extrato de chá verde. Utilizaram os seguintes produtos: Orego Stim® Pó, na concentração mínima de 50 g/kg, contendo 80-82% de Carvacrol, 2,5-3,0% de Timol, 3,5-9,0% de p-Cimeno e 2-5,0% de Y-Terpineno, e extrato de chá verde em pó com concentração aproximada de 56% ($\pm 2,5\%$) de polifenóis. Os extratos vegetais foram homogeneizados em 1 kg de concentrado, o qual foi adicionado sobre a dieta total no momento de seu fornecimento. Os animais foram ordenhados duas vezes ao dia às 06:00 hs e às 14:30 hs.

Composição da dieta basal, coleta e análise dos alimentos

As vacas permaneceram em galpão tipo *free stall* divididas em grupos por tratamento onde receberam uma vez ao dia dieta com relação volumoso: concentrado de 60:40, sendo que o volumoso consistiu de silagem de milho (94%) e feno de tifton (6%) e o concentrado composto de grão de milho moído (43,6 kg/100kg), farelo de soja com 46% PB (47,9 kg/100kg), sal mineral Guabiphos Lactage Gold® (4,3 kg/100kg), bicarbonato de sódio (1,4 kg/100kg) e calcário calcítico (1,1 kg/100kg), óxido de magnésio (0,7 kg/100kg), sulfato de amônio (0,6 kg/100kg) e ureia (0,4 kg/100kg). O sal mineral Guabiphos Lactage Gold apresentou as seguintes concentrações de Cálcio (máx.) 180 g/kg (mín.) 160 g/kg, Enxofre (mín.) 17 g/kg, Magnésio (máx.) 15 g/kg, Cobalto (mín.) 100 mg/kg, Cobre (mín.) 1300 mg/kg, Ferro (mín.) 1500 mg/kg, Sódio 60 g/kg, Fósforo 60 g/kg, Iodo (mín.) 100 mg/kg, Manganês (mín.) 1300 mg/kg, Selênio (mín.) 30 mg/kg, Zinco (mín.) 3000 mg/kg, Flúor (máx.) 600 mg/kg, Fósforo (mín.) 60 mg/kg, Vitamina A (mín.) 220000 UI/kg, Vitamina D3 (mín.) 60000 UI/kg, Vitamina E (mín.) 1000 UI/kg.

A dieta completa previamente misturada em um vagão forrageiro foi fornecida às 8:30 hs permitindo-se 5-10% de sobras. Cerca de 1 kg de concentrado foi colocado sobre a dieta totalmente misturada nos cochos, contendo ou não os extratos vegetais. As sobras da dieta total foram retiradas, pesadas e amostradas no momento que os animais estavam na ordenha matutina. A quantidade da suplementação concentrada e de volumoso em oferta foi calculada para atender as exigências nutricionais considerando produção 30 kg de produção de leite com 3,85% de gordura (NRC, 2001).

Diariamente uma amostra da dieta total foi coletada e congelada. As amostras foram pré-secas a 55°C em estufa de ventilação forçada por 72 horas e moídas. Uma amostra composta foi formada por semana. Os ingredientes da dieta foram amostrados,

congelados e pré-secos individualmente na última semana e, juntamente com as amostras da dieta total, encaminhadas para análise químico-bromatológica para determinar as concentrações de matéria seca, cálcio, energia bruta, extrato etéreo, fibra em detergente ácido, fibra em detergente neutro, lignina, fósforo, proteína bruta, nitrogênio em fibra em detergente ácido e da fibra em detergente neutro (MORAES & RABELO, 1986; AOAC, 1988; ANKOM, 2006, 2010; SILVA, 2006). Os resultados médios da composição da dieta e dos ingredientes estão apresentados na Tabela 1.

Avaliação do consumo e dos coeficientes de digestibilidade total aparente

A dieta foi ofertada individualmente em cochos com portas eletrônicas tipo *calan gates* (American Calan Inc., Northwood, NH, USA) e a avaliação do consumo foi realizada diariamente pelo método direto com a pesagem da quantidade ofertada e da sobra. Amostras da dieta total e das sobras de todos os animais foram coletadas diariamente, congeladas, pré-secas a 55°C em estufa de ventilação forçada por 72 horas, moídas a 1 mm e homogeneizadas em quantidades iguais de cada coleta para formar uma amostra composta por semana/animal e encaminhadas ao laboratório para realização de análise bromatológica.

A produção fecal foi estimada com marcador externo dióxido de titânio (TiO₂). Entre os dias 46 e 58, do início do fornecimento dos extratos vegetais, o marcador foi introduzido na forma de balas diretamente na boca do animal após as duas ordenhas, às 07:00 hs e as 15:00 hs (fornecido na quantidade de 10 g/animal/vez). As balas foram fornecidas durante 12 dias, sendo que, nos últimos 5 dias, amostras de fezes (aproximadamente 500 g) foram coletadas direto do reto dos animais, nos mesmos

horários do fornecimento do dióxido de titânio. As fezes foram identificadas e congeladas. As amostras foram pré-secas a 55°C em estufa de ventilação forçada por 72 horas, moídas a 1 mm e homogeneizadas em quantidades iguais de cada coleta para formar uma amostra composta por animal. A determinação do marcador foi avaliada por espectroscopia de emissão ótica (SILVA et al, 2010) e a produção fecal foi calculada dividindo-se a quantidade fornecida de TiO₂ pela concentração de TiO₂ (mg/kg) nas fezes. A produção de matéria seca fecal (PMSF) foi determinada pela razão entre a quantidade do indicador administrado ao animal e sua concentração nas fezes (Lopes, 2007). A digestibilidade foi calculada através dos dados de consumo de MS diminuído da PMSF de cada animal dividida pelo consumo de MS. Com os dados de consumo medidos diariamente e a produção de matéria seca fecal (PMSF) foi calculado a digestibilidade da dieta.

$$\text{PMSF (g)} = \frac{\text{Indicador ingerido (g)}}{\text{Concentração do indicador nas fezes (g/g)}}$$

$$\text{Digestibilidade (g/kg)} = \frac{\text{Consumo de MS} - \text{PMSF}}{\text{Consumo de MS}}$$

Peso e escore de condição corporal (ECC)

As avaliações de peso corporal e escore de condição corporal (ECC) foram realizadas semanalmente após a ordenha da manhã. Os animais foram pesados individualmente com balança eletrônica (Toledo®, modelo MCR-2000) em jejum de aproximadamente 5 horas e o ECC foi avaliado em uma escala de escores de “1” a “5”

pontos, sendo: escore 1 animal extremamente magro e o escore 5 animal extremamente gordo (Wildman et al., 1982).

Produção, composição físico-química e perfil de ácidos graxos no leite

A produção de leite foi medida diariamente do dia 14 ao 58 nas ordenhas matutinas e vespertinas utilizando medidores automáticos de leite em cada ordenha durante todo período experimental.

Semanalmente entre os dias 14 e 58, uma alíquota do leite proveniente da mistura proporcional das ordenhas matutina e vespertina de cada vaca foi acondicionada em frascos contendo Bronopol (2bromo-2nitropropano-1,3diol) para posterior quantificação das concentrações de gordura, lactose, proteína, sólidos totais e ureia, determinados por meio de espectrofotometria por radiação infravermelha, e contagem de células somáticas (CCS), por contagem eletrônica por citometria de fluxo (Fonseca & Santos, 2000). Juntamente com a amostra para composição química, outra alíquota foi coletada para avaliação da composição física do leite. Os testes avaliados foram: estabilidade no teste do álcool (concentrações de 72 a 86°GL v/v), pH e acidez titulável (°D) segundo Tronco (2013). Os dados de produção de leite foram corrigidos para energia (ECM) = valores corrigidos para 3.5% de gordura e 3.2% proteína verdadeira, utilizando a fórmula $[(0.3246 \times \text{kg de leite}) + (12.86 \times \text{kg de gordura}) + (7.04 \times \text{kg de proteína verdadeira})]$. A proteína verdadeira foi calculada como sendo 95% do valor da proteína bruta do leite (NRC, 2001).

No dia 57 uma amostra composta da produção diária de leite foi coletada e congelada para análise do perfil de ácidos graxos. As amostras de leite foram

descongeladas à temperatura ambiente e um volume de 1 ml foi usado para extração da gordura, utilizando uma mistura de éter dietílico e hexano de acordo com um processo de referência (AOAC Official Method, 1988). A fase orgânica contendo a gordura do leite (~20 mg) foi evaporada até à secagem a 40°C sob atmosfera de livre de oxigênio e nitrogênio. Ésteres metílico de ácidos graxos (FAME) foram obtidos por transmetilação catalisada por base (BALDIN et al., 2013) e foram quantificadas por meio de um cromatógrafo de fase gasosa (modelo 7820-A, Agilent Technologies) equipado com um detector de ionização de chama e equipado com um CP-Sil 88 de sílica fundida coluna capilar (100 mm x 0,25 mm x 0,2 mm de espessura de filme; Varian Inc.). As condições de operação foram as mesmas descritas por Cruz-Hernandez et al. (2007). Os FAME foram identificados por comparação dos tempos de retenção com padrões FAME comerciais; trans/cis C18 menores: 1 isômeros e trans-9 cis-11 CLA foram identificados de acordo com sua ordem de eluição relatado nas mesmas condições cromatografia gasosa (CRUZ-HERNANDEZ et al., 2007). A composição de ácidos graxos do leite foi expressa como uma percentagem em peso de ácidos graxos totais, utilizando fatores de referência conforme Wolff et al. (1995).

Perfil hematológico e enzimas antioxidantes

Nos dias 14, 29, 44 e 58, amostras de sangue foram coletadas em tubos Vacumtainer® com anticoagulante pela veia coccígea de cada animal para realização do leucograma (leucócitos totais, eosinófilos, neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos e plaquetas) (Lopes et al., 2007). As amostras foram identificadas,

armazenadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e encaminhadas a um laboratório veterinário de análises clínicas.

Nos dias 14, 35 e 56 do período experimental, amostras de sangue foram coletadas em tubo heparinizado pela veia coccígea de cada vaca para avaliação das enzimas antioxidantes. Depois de identificadas, as amostras foram armazenadas em caixas isotérmicas contendo gelo e encaminhadas diretamente ao Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite. O sangue foi centrifugado a 1.000 rpm por 10 minutos, à temperatura ambiente, sendo o plasma retirado e armazenado em freezer a -80°C. Os eritrócitos foram lavados dentro de tubos tipo Falcon com solução salina por meio de centrifugação (1.000 g por 10 minutos) por três vezes. Ao final os eritrócitos foram diluídos em solução salina (1:10 v:v) e armazenados também em freezer a -80°C até a realização das análises. As determinações bioquímicas realizadas para verificar o perfil antioxidante sanguíneo dos animais foram: Oxidação da diclorofluoresceína -DCFER (LeBel, Ischiropoulos & Bondy, 1992), Superóxido dismutase - SOD (Misra & Fridovich, 1972), Glutathione peroxidase - GPx (Wendel 1981), Glutathione reduzida -GSH (Browne & Armstrong 1998) e catalase - CAT nos eritrócitos (Aebi 1984), além de Oxidação da diclorofluoresceína - DCFPLA e carbonila no plasma (Reznick & Packer, 1994).

Avaliação comportamental e variáveis observadas

As avaliações comportamentais foram realizadas nos dias 25, 39 e 53 com duração de 24 hs (06:30 às 06:30 do dia seguinte). As avaliações consistiram na observação visual focal das atividades exercidas pelos animais no *free stall* (as

atividades realizadas durante a sua locomoção entre o estábulo e a sala de ordenha e durante as ordenhas não foram avaliados). As variáveis foram correspondentes ao comportamento ingestivo, modificações posturais e comportamento social.

As atividades de ruminação, ócio (ausência de mastigação), estação e decúbito foram registradas a cada 10 minutos (Silva et al., 2008) e seu número foi multiplicado por 10 para estimar os tempos gastos nessas atividades. Por outro lado, as atividades pontuais como ingestão de água, eventos de dominância, submissão e interação entre os animais foram registradas de acordo com a sua ocorrência e expressa como número de eventos. Na Tabela 2 segue a descrição das atividades.

Mensuração da produção de gases na Câmara Respirométrica

Após a realização do ensaio de digestibilidade e término do período experimental, cinco animais de cada grupo experimental que apresentaram maior produção de leite durante o período foram selecionados para mensurações da produção de calor, metano e dióxido de carbono em câmaras respirométricas. Os animais continuaram recebendo o tratamento até a finalização dessa etapa. Cada animal permaneceu por aproximadamente 20 horas por dia, durante dois dias, dentro das câmaras para as avaliações. Os animais foram retirados apenas para a ordenha, realização da limpeza das câmaras e calibração dos equipamentos.

O sistema adotado para mensurações em câmara respirométrica foi o de circuito aberto descrito por Machado et al. (2016), os quais validaram sua utilização para bovinos leiteiros. Este sistema de respiração é composto por 4 câmaras montadas em pares que possuem clima controlado que podem manter a temperatura e umidade

relativa numa faixa de 5 a 45 °C e 30 a 80%, respectivamente, e um conjunto de medidores de vazão e analisadores validados. As câmaras são construídas de aço termo-isolantes com janelas de vidros duplos (150 cm de altura e 150 cm de largura) em ambos os lados permitindo o contato visual entre animais e com um dimensionamento de 3,68 x 2,56 x 2,24 m. Cada câmara está equipada com uma grande porta traseira de acesso para animais e uma porta de entrada menor para acesso do operador e para a alimentação, ambos equipados com vedantes de borracha. Cada câmara é equipada com uma escotilha de emergência, que é fechada por um bloqueio eletroímã. No caso de uma falha de energia, inundações devido a um vazamento no sistema de abastecimento de água, extrema temperaturas, ou uma excesso de CO₂, acima de 10.000 ppm, a escotilha é aberta automaticamente, garantindo segurança aos animais.

Um gerador de fluxo e um medidor de fluxo de massa insere continuamente o ar de cada câmara e uma ligeira pressão negativa no interior da câmara é assegurada. O ar de todas as câmaras e partes do ar ambiente é conduzido por um sistema de análise de gás comum para monitoramento das concentrações de O₂, CO₂, CH₄ em um período cíclico de medição com o tempo definido em 20 minutos. Analisadores foram calibrados diariamente e as câmaras apresentaram valores médios de recuperação de 99,0 e 98,0% para o CO₂ e CH₄, respectivamente. A calibração dos analisadores de CO₂ e CH₄ (zero e extensão) foi realizada sempre antes do início de cada medição. Os analisadores de O₂ e de vapor de água são calibrados uma vez por semana. Para aferir e deixar os equipamentos zerados com relação ao CO₂, os analisadores de CH₄ e O₂ foram limpos utilizando nitrogênio gasoso (99,999%), já que o CO₂ e o CH₄ são medidos por meio de um gás misto (0,5% de CO₂, 0,1% CH₄ em N₂ como transportador).

As câmaras estão equipadas com câmeras infravermelhas e cochos eletrônicos para alimentos e água onde a medição da ingestão, assim como sensores para o monitoramento da posição dos animais e sua frequência cardíaca. Neste sistema, o ar presente no interior da câmara é continuamente renovado pela entrada constante de ar atmosférico. A renovação do ar no interior da câmara é possível em função da pressão negativa criada internamente pela ação de uma bomba que promove a sucção o ar interno, permitindo assim a entrada de ar externo. Como consequência, há renovação da atmosfera interna da câmara e o ar contido em seu interior pode ser destinado para amostragem e posterior avaliação pelos analisadores de gás. O sistema interno de pressão negativa garante segurança na aquisição dos dados, pois impede que haja vazamento do ar presente no interior da câmara, o que poderia constituir uma fonte de erros na análise do gás amostrado. A aquisição de dados e a análise são realizadas por um software Metasys (versão 5.1.3.0400; Johnson Controls Inc., Milwaukee, WI) para calcular a taxa de consumo de O_2 e de produção de CO_2 e CH_4 .

Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi composto de quatro tratamentos: C = controle sem adição de fitoquímicos, EO = com adição de 10 gramas (g) de extrato de orégano, CV = com adição de 5,0 g de extrato de chá verde e MIX = com adição de 10 g de extrato de orégano e 5,0 g de extrato de chá verde. As vacas foram consideradas unidades experimentais com 8 repetições em cada tratamento.

Os dados relativos ao comportamento, produção e composição do leite foram submetidos à análise de variância considerando o delineamento em blocos casualizados

(2 blocos por grupos genéticos: Holandês - mais ou igual a 75% sangue Holandês, mestiços Holandês e Gir - menos que 75% sangue Holandês), com medidas repetidas no tempo utilizando o programa estatístico SAS 9.2 for Windows® (SAS Institute, Cary, Carolina do Norte, EUA, 2008). Os valores dos atributos produção diária de leite, a concentração dos componentes lácteos, peso, escore de condição corporal, hemograma e enzimas de estresse oxidativo obtidos no dia 14 (prévio ao início fornecimento dos tratamentos) foram usados como covariáveis. As médias foram comparadas por LSMEANS. O consumo foi calculado como a média semanal. Os valores dos coeficientes de digestibilidade e perfil de ácidos graxos no leite foram submetidos à análise de variância, considerando o efeito de tratamento e bloco, enquanto a produção diária de leite, a concentração dos componentes lácteos, peso, escore de condição corporal, hemograma e enzimas de estresse oxidativo foram submetidos à análise de variância (PROC MIXED), com medidas repetidas no tempo, considerando o efeito de dia, bloco, tratamento, interação tratamento e dia e covariável, efeito fixo=tratamento e dia, efeito aleatório=animal. O número de eventos de dominância, submissão e interações foi analisado com regressão logística para cálculo da razão de probabilidade da ocorrência desses comportamentos (PROC LOGISTIC). Foram adotados os valores para as probabilidades de 0,05 e entre 0,05 até 0,10 a de como limites, respectivamente, para significância e tendência.

Resultados

As vacas que receberam o extrato de chá verde apresentaram maior consumo de matéria seca em relação aos grupos controle e MIX, não diferindo daquelas que

foram suplementadas com extrato de orégano. O consumo das frações de cinza, energia bruta, fibra em detergente ácido, fibra em detergente neutro, nutrientes digestíveis totais, proteína bruta, proteína bruta da fibra em detergente neutro e da proteína bruta da fibra em detergente ácido também foi maior no tratamento com chá verde, no entanto, diferindo apenas dos animais que receberam o tratamento MIX. A quantidade de lignina consumida foi maior no tratamento chá verde quando comparado ao grupo controle. Não houve interação entre os dias e tratamentos com relação ao consumo da matéria seca total e das frações. O coeficiente de digestibilidade total aparente da energia foi maior enquanto os coeficientes de digestibilidade total aparente da proteína e da matéria seca tenderam a serem maiores com a suplementação de extrato de orégano em relação ao MIX e ao controle. Os coeficientes de digestibilidade total aparente da FDN, FDA e EE não diferiram entre os tratamentos (Tabela 3).

A inclusão de extrato de orégano, chá verde e sua associação na dieta não influenciaram o peso corporal e ECC. Vacas suplementadas com extrato de chá verde produziram mais leite em relação aos demais grupos. O grupo controle produziu maior quantidade de leite corrigido para 4% de gordura, e seu leite apresentou maior concentração de gordura em relação ao tratamento MIX e com maior concentração de ureia em relação aos demais. Já a concentração de proteína foi maior no leite de animais suplementados com o tratamento MIX em relação aos demais. A relação gordura: proteína no leite das vacas controle e suplementadas com chá verde foi maior que a do leite das vacas suplementadas com MIX e extrato de orégano, mas os valores estiveram dentro da faixa normal de variação (1,2 a 1,4). Animais do grupo orégano produziram leite com menor concentração de lactose. A estabilidade ao teste do álcool não diferiu significativamente entre os grupos. Os grupos chá verde e MIX produziram leite com

valores mais elevados de acidez titulável em relação ao leite produzido pelas vacas dos grupos orégano e controle. O leite das vacas suplementadas com extrato de orégano apresentou maior pH comparado aos grupos chá verde, MIX e controle. Vacas do grupo MIX produziram leite com menor CCS que as vacas que receberam orégano, sem diferir daquelas que receberam chá verde ou o tratamento controle (Tabela 4).

Dos 59 ácidos graxos avaliados no leite apenas sete diferiram significativamente entre os tratamentos. Animais do tratamento MIX produziram maiores quantidades (g/100g de ácidos graxos totais) de C6:0, C11:0, C18:1 t4, C18:1 c13, C19:0+C18:1c15 e C18:2 t9t12, enquanto que o grupo controle produziu leite com maior quantidade de C21:0. Dentre os ácidos graxos que apresentaram diferença, animais dos tratamentos chá verde e orégano tiveram as menores concentrações. Uma tendência maior do chá verde e MIX dos ácidos graxos C10:0, C18:1 t5, em relação ao orégano e maior tendência do MIX e controle do C18:2 t9c12 e C20:5n-3 em comparação com orégano e chá verde. As quantidades totais de ácidos graxos de cadeia curta, cadeia longa, saturados, insaturados, CLA total, n6, n3 e C18 insaturado não diferiram entre os tratamentos (Tabela 5). Os efeitos observados nesses ácidos graxos foram de pequena magnitude e que não são de particular interesse para a saúde humana.

Observaram-se maiores valores para os neutrófilos segmentados nos tratamentos controle, orégano e MIX em relação ao chá verde, e maiores valores de eosinófilos para o MIX e controle em relação aos tratamentos com extrato de chá verde e orégano. Os demais parâmetros hematológicos não diferiram entre os tratamentos. Nas análises de enzimas de estresse oxidativo foram observados menores valores na oxidação da DCF nos eritrócitos com a adição da associação dos dois extratos na dieta em relação ao controle e aos fitoquímicos isoladamente, níveis mais elevados de GSH no dia 35 com a

suplementação extrato de chá verde em relação ao controle, orégano e MIX. A oxidação da DCF no plasma tendeu ($P < 0,10$) a ser maior no controle em relação aos fitoquímicos, especialmente com a sua associação. Não houve diferenças entre os tratamentos quanto à concentração das enzimas SOD, CAT, GPx e Carbonila (Tabela 6).

Em relação ao comportamento animal, os tempos gastos em ruminação na posição deitada, ócio total, número de eventos de ingestão de água e o número de manifestações de dominância e submissão não apresentaram diferença entre os tratamentos. As vacas recebendo o tratamento controle apresentaram maior tempo de ingestão em comparação com os demais tratamentos e maior tempo na posição deitada total e deitada em ócio em comparação ao tratamento chá verde. Em contraponto, o tratamento controle apresentou menor tempo na posição em pé total em relação aos demais tratamentos, menor tempo em pé em ócio quando comparado aos tratamentos chá verde e orégano e tempo em pé ruminando menor que o tratamento chá verde. Vacas suplementadas com extrato de chá verde apresentaram maior tempo de ruminação total e menor tempo na posição deitada em relação aos demais tratamentos. Animais que receberam chá verde e mix apresentaram probabilidade interação 2,5 vezes maior que as vacas suplementadas com EO ou controle, não havendo diferenças entre as vacas recebendo as dietas com e sem extratos vegetais quanto à probabilidade de apresentarem comportamentos de dominância e submissão (Tabela 7).

As mensurações de volume total de CH_4 , volume de CH_4 produzido por Kg de matéria seca ingerida, volume de CH_4 por peso metabólico, volume de CO_2 por peso metabólico e produção de calor por peso metabólico, avaliados pelas câmaras respirométricas, não diferiram entre os tratamentos (Tabela 8).

Discussão

O maior consumo de matéria seca total observado nos grupos de vacas suplementadas com o chá verde em relação ao MIX e o controle foram de certa forma à alteração do sabor e do odor provocadas pela inclusão dos extratos, mas que não foram potencializados uma vez que a mistura dos dois extratos reduziu o consumo. O consumo intermediário de extrato de orégano pode indicar uma menor aceitabilidade do mesmo em relação ao do chá verde, provavelmente em função do odor e sabor mais pronunciados. O fato de dos extratos vegetais misturados a uma pequena quantidade de concentrado (1 kg) terem sido colocados em cima da dieta totalmente misturados provavelmente fez com que os animais percebessem o odor e o sabor dos extratos.

O efeito modulador do consumo é dependente do extrato vegetal, da forma como foi processado e da quantidade utilizada (Cobellis et al., 2016). Esse pequeno decréscimo do consumo de dieta contendo extrato de orégano está parcialmente concordância com os observados por Panazzolo (2015), que forneceu 0, 2,5, 5,0 e 7,5 g de extrato de orégano a novilhas leiteiras. O autor observou menor consumo de concentrado contendo extrato de orégano na dose de 7,5 g/animal/dia em relação aos animais não suplementados. Resultados semelhantes foram verificados em vacas leiteiras alimentadas com níveis crescentes de folhas de orégano (250, 500 e 750 g de folhas por dia), que diminuíram linearmente o consumo de matéria seca com o aumento da taxa de inclusão, no entanto, sem afetar a produção de leite e aumentando a eficiência alimentar de forma linear com a taxa de inclusão de folhas de orégano na dieta (Hristov et al., 2013). Em contraponto, Benchaar et al. (2006) não encontraram diferença entre os tratamentos com suplementação de extrato de orégano (0 e 2 g/dia) e

monensina (0 e 350 g/dia) em relação ao consumo de matéria seca em vacas em lactação da raça Holandês.

Os maiores coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca e da energia bruta encontrados em vacas suplementadas com extrato de orégano em relação aos grupos controle e ao suplementado com o MIX pode ser devido à sua ação sobre a flora ruminal em um provável melhor aproveitamento dos carboidratos não estruturais e da proteína presente na dieta. No estudo realizado por Benchaar et al. (2006), a digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica, fibra em detergente ácido e amido não foram alteradas com a inclusão do extrato de orégano, apenas a digestibilidade da FDN aumentou. Hristov et al. (2013) também não observaram mudanças na digestibilidade aparente total em vacas suplementadas com doses de 250, 500 e 750 gramas por dia de folhas de *Origanum vulgare* L., exceto para a FDN, a qual foi reduzida pelas doses de orégano comparada com o controle. Xu et al. (2007) ao oferecerem para vacas leiteiras um tratamento com alta quantidade de resíduos de extratos de chá verde na silagem (150 g/kg) em comparação com níveis inferiores (50 g/kg), verificaram que a digestibilidade da MS, matéria orgânica, proteína e energia bruta foram ligeiramente inferiores ($P < 0,05$) no tratamento com altos níveis. Já Dschaak et al. (2011), ao ofertar extrato de quebracho (3% da MS), outro fonte de tanino condensado, para vacas leiteiras com dietas de baixa e alta proporção de concentrado, verificou que a inclusão desse extrato diminuiu o consumo de MS e nutrientes, independentemente do nível de forragem, no entanto, a digestibilidade da MS e dos nutrientes não foram afetadas pela suplementação.

Apesar da diferença de consumo entre os grupos de vacas consumindo ou não extratos vegetais, a ausência de efeitos significativos sobre o peso corporal e ECC pode

ser devido à partição de nutrientes aumentando a produção de leite, sem modificar a quantidade de nutrientes depositada nos tecidos corporais. Vacas no terço inicial de lactação costumam direcionar a maior parte dos nutrientes absorvidos para a produção leiteira (Vilela, et al., 2002; Gross et al., 2011). Ausência de efeitos com relação ao peso vivo, ganho médio diário, ingestão de nutrientes e conversão alimentar foram encontrados por Rivaroli (2014) ao administrar um MIX de óleos essenciais composto por orégano, alho, limão, alecrim, tomilho, eucalipto e laranja doce em doses de 3,5 e 7,0 g/novilhos/dia. Entretanto, Tedesco et al. (2004) ao administrarem silimarina (10 g/dia), um flavonoide semelhante ao chá verde, para vacas leiteiras desde o pré-parto, registraram melhor escore corporal em relação ao grupo controle.

A maior produção de leite no grupo suplementando com extrato de chá verde pode ser parcialmente explicada pelo maior consumo de matéria seca digestível, NDT e proteína em relação aos grupos controle e MIX. A produção de leite dos animais suplementados com extrato de orégano (equivalente a 400 mg de carvacrol/vaca/dia) não diferiu do controle nem do chá verde e MIX, corroborando com Flores et al. (2013) que, ao avaliarem a produção do leite de vacas da raça Holandês suplementadas com 3 diferentes doses de extrato de orégano (200, 400 e 600 mg/dia), não observaram diferença significativa entre os grupos em relação ao controle. Da mesma forma, Benchaar et al. (2006), suplementaram vacas com 2 g/dia de extrato de orégano (2 g/d) e não encontraram diferenças na produção de leite corrigida a 4% de gordura em comparação com vacas do grupo controle.

As diferenças nas concentrações de gordura, com maiores valores no grupo controle, podem ser explicadas, pelo menos em parte, pelo efeito da diluição: em menores produções de leite, aumenta a concentração da gordura (Philpot & Nickerson,

2002). Em geral, com exceção da gordura, o grupo de vacas suplementado com o MIX apresentou maiores teores de proteína, lactose e sólidos desengordurados. Os maiores valores de proteína podem ser parcialmente explicados pela menor produção leiteira das vacas do grupo MIX. E o maior teor de lactose no leite produzido pelo grupo MIX pode estar relacionado à menor CCS, uma vez que valores mais elevados de CCS estão relacionados com menor síntese de lactose, maior degradação da mesma ou passagem para o plasma (Schäellibaum, 2001). Entretanto, Lacerda et al. (2014) avaliaram o fornecimento de 0,84, 1,69 e 2,54% de extrato de orégano de matéria seca na dieta de vacas leiteiras, e não encontraram diferenças nas concentrações de gordura, extrato seco total e proteína em relação ao grupo controle, já a proteína e o extrato seco desengordurado foram influenciados positivamente com a adição de extrato de orégano na dieta.

De modo geral, a associação dos fitoquímicos na dieta de vacas no terço inicial da lactação foi benéfica para a saúde da glândula mamária, pois observamos menores valores de CCS e concentração de extrato seco desengordurado mais elevado, ainda que os grupos de vacas suplementados com os extratos de orégano e de chá verde separadamente tenham apresentado valores intermediários, indicando sinergismo da adição dos dois extratos. Lauzon et al. (2005) citam que a utilização de catequinas pode proteger o tecido epitelial da glândula mamária de danos dos processos oxidativo auxiliando no controle e prevenção de mastite.

As concentrações de ureia no leite apresentaram resultados mais elevados no grupo controle em relação aos grupos recebendo chá verde e orégano separadamente, podendo estar relacionado à ação desses extratos reduzindo a proteólise ruminal, apesar de não se ter mensurado esse atributo no presente estudo. Dschaak et al. (2011) e

Hristov et al. (2013) encontraram concentração de ureia no leite inferior nos animais suplementados com diferentes doses de extrato de orégano (250, 500 e 750 g/dia/vaca) comparados aos animais sem suplementação sugerindo que a formação de complexos proteína via ruminal, diminuiu a degradação de proteínas e produção de N-NH₃ no rúmen. Os maiores valores de acidez titulável encontrados nos tratamentos chá verde e MIX foram provavelmente associados com os maiores valores de proteína total do leite. Sabe-se que os grupos fosfatos presentes nas proteínas aumentam os valores de acidez natural do leite (Horne & Muir, 1990). O maior valor de pH observado no tratamento com extrato de orégano foi provavelmente devido ao maior valor da CCS, e seus efeitos como a redução da concentração de caseínas e aumento dos cloretos e sódio, consequentemente deixando o leite mais alcalino (Fernandes et al., 2007). No entanto o valores das características físicas estão de acordo com os considerados normais (Tronco, 2013). Em geral, embora a comparação entre os estudos que forneceram óleos essenciais e polifenóis seja difícil em função das diferentes formas de apresentação do produto e doses, parece que os mesmos exercem efeitos limitados sobre a produção e composição do leite (Flores et al., 2013; Dschaak et al., 2011). Entretanto, nesta pesquisa foi possível verificar um aumento na produção de leite com a inclusão do chá verde e a alteração nas concentrações dos componentes químicos com a associação de ambos os extratos.

Os animais suplementados com a associação de extrato de orégano e chá verde produziram maiores quantidades de ácidos graxos, na sua maioria de cadeia curta e saturados, enquanto que o grupo controle produziu leite com maior proporção de C21:0. Os extratos de óleos essenciais e polifenóis possuem comprovada atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro* (Burt et al., 2004; Singh, et al., 2001) o que poderia

auxiliar no incremento desses ácidos graxos em comparação ao grupo controle. No entanto, Hristov et al. (2013) e Benchaar e Chouinard (2009) ao suplementar extrato de orégano e canela, respectivamente, não verificaram nenhuma alteração nas concentrações de ácidos graxos no leite de vacas leiteiras.

Benchaar et al. (2006) comentam que a inclusão de extrato de orégano na dieta de ruminantes influencia minimamente a composição dos ácidos graxos no leite, corroborando com os resultados aqui encontrados onde os as diferenças significativas e tendências foram encontradas em ácidos graxos de menor importância e sua magnitude foi pequena.

A variação de neutrófilos segmentados nos tratamentos controle, orégano e MIX, mesmo estando um pouco acima dos valores considerados normais (600 e 4000 neutrófilos/ μL) podem estar relacionados com alguns casos de mastite clínica aguda em animais de todos os tratamentos durante o período experimental, onde pode ter ocorrido maior fluxo de neutrófilos para a glândula mamária e assim corroborando para o aumento da CCS conjuntamente (Lopes et al., 2007; Lauzon et al., 2005). Mesmo havendo controle de ectoparasitas e endoparasitas nos animais estudados, existe a possibilidade dos animais do grupo controle e MIX estarem mais parasitados que os demais durante o período experimental. A eosinofilia está associada ao parasitismo e a processos alérgicos e/ou inflamatórios. Mesmo observando-se diferença estatística em relação às médias, de acordo com a literatura, todos estão dentro dos limites considerados fisiologicamente normais (abaixo de 2.400/ μL). Estudos sobre o perfil hematológico de ruminantes submetidos a dietas com óleos essenciais e polifenóis ainda são incipientes. Entretanto, Gabbi et al. (2009), ao analisarem os parâmetros hematológicos de novilhas Jersey, verificaram um aumento significativo nos leucócitos,

linfócitos e monócitos para animais que receberam 1 g/dia de uma mistura de óleos essenciais na dieta, quando comparado com os animais não suplementados, sugerindo um efeito de imunoestimulação decorrente da liberação aromática do uso de óleos essenciais na dieta dos animais.

Menor oxidação da diclorofluoresceína tanto nos eritrócitos quanto no plasma das vacas suplementadas com MIX demonstram o possível efeito da ação sinérgica dos extratos que quando fornecidos individualmente. O aumento da concentração da enzima GSH resultante da inclusão do extrato de chá verde é um dos grandes pontos a ser destacado por ser considerada uma das enzimas mais importantes do sistema de defesa antioxidante das células, protegendo-a das lesões resultantes da exposição a agentes, além de participar da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação. A GSH habitualmente possui uma reserva intracelular alta, porém, quando sofre exposição a um agente oxidante, ocorre sua oxidação causando diminuição dos níveis e prejuízos a sua função (Lúcio, 2012). Essas alterações demonstram que os efeitos das duas enzimas estão estritamente pareados a nível celular, pois na medida em que se observa o aumento da GSH, também se verifica a diminuição de espécies reativas como a DCF.

Apesar da escassez de resultados publicados quanto ao comportamento ingestivo e social de ruminantes suplementados com extrato de orégano e chá verde, na literatura científica, se observam a variabilidade nos resultados, desde ausência de efeito, aumento e diminuição de consumo. As vacas suplementadas com extrato de chá verde apresentaram maior tempo de ruminação total, provavelmente em resposta ao maior consumo de FDN. Esses resultados contrariam os apresentados por Santos (2015), com novilhas da raça Holandês suplementadas com doses de 0, 1, 2 e 3 g/novilha/dia de chá

verde, a qual não verificou modificação no consumo total nem nos tempos diários gastos com ruminção possivelmente em relação as doses ofertadas. Os animais do grupo controle, mesmo apresentando maior tempo em visita ao cocho para ingestão, consumiram menor quantidade de MS, ou seja, sua taxa de ingestão foi inferior à do chá verde. Pode-se inferir que a inclusão de chá verde não prejudicou a aceitabilidade da dieta. O fato das observações diárias de comportamento ter sido realizada a partir de 25º dia de fornecimento pode ter influenciado esses resultados. Porém Strider (*comunicação pessoal*) não observou diferenças quanto ao tempo de latência para ingerir o concentrado (zero), mas redução de 3% no tempo de ingestão do concentrado entre as novilhas leiteiras suplementadas com 1, 2 e 3 g de extrato de chá verde/dia comparadas com as novilhas do tratamento controle.

Entretanto, Santos (2015) e Panazzolo (2015) ao avaliarem o comportamento de novilhas suplementadas com extrato de chá verde (0, 1, 2 e 3 g/animal/dia) e orégano (0, 2,5, 5 e 7,5 g/animal/dia), respectivamente, não verificaram diferenças expressivas quanto aos tempo de ruminções na posição deitada, ócio total e número de eventos de ingestão de água.

As maiores chances de interação entre os animais suplementados com extrato de chá verde não condiz com os resultados opostos encontrados por Santos (2015) que demonstram uma redução de 30% do número de interações entre os animais na medida em que a suplementação da dose de extrato de chá verde foi maior.

A ausência de efeito em relação aos comportamentos de dominância e submissão entre os tratamentos e o grupo controle é contrária ao apresentado por Panazzolo (2015) que verificou um aumento no número de observações de dominância à medida que doses crescentes de extrato de orégano foram suplementadas, justificada pela

capacidade que o carvacrol possui em agir sobre o sistema nervoso central devido a sua alta permeabilidade na membrana celular que faz com que haja comunicação entre neurotransmissores no cérebro, como a serotonina, que afeta o controle de agressão (Zotti et al., 2013).

Alguns metabolitos secundários de plantas, tais como saponinas, taninos, e óleos essenciais, demonstraram ser promissores na redução de emissão de metano em ruminantes com base em seus efeitos diretos sobre metanogênese, protozoários, digestão de alimentos e processos de fermentação ruminal (Patra, 2010; Cobellis, Trabalhza-Marinucci & You, 2016). Resultados de tal afirmação já foram comprovados com o incremento de orégano (McIntosh et al., 2003) e chá verde (Becker et al., 2014) em pesquisas *in vitro*. No entanto, no presente estudo, a inclusão desses fitoquímicos *in vivo* não foi alterou a produção de gases como metano e CO₂, produção de calor e a produção de ácidos graxos voláteis: acético, propiônico e butírico. Mesmo as avaliações terem acontecido apenas no período final do experimento e o número de repetições ser reduzido (cinco animais por grupo experimental), os resultados nos trazem informações relevantes e dados inéditos referentes a esse assunto. Pesquisas recentes no uso de óleos essenciais em dietas de ruminantes procuram entender melhor sua atuação sobre o ambiente ruminal, mais precisamente o seu mecanismo de ação sobre a microflora ruminal (Cobellis, Trabalhza-Marinucci & You, 2016), entretanto, até o momento não foi possível entender qual o processo que diminui as concentrações de dióxido de carbono e metano *in vitro* e não se observa tais alterações *in vivo*.

Conclusões

O fornecimento de extratos de orégano e chá verde na dieta de vacas da raça Holandês e mestiços Holandês e Gir no terço inicial da lactação influencia o comportamento social e ingestivo, o consumo, melhora a produção de leite, modifica a sua composição, perfil hematológico e o status antioxidante sugerindo sua utilização como suplementação para bovinos leiteiros.

Agradecimento

Os autores agradecem a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Gado de Leite pela cedência dos animais, estrutura e colaboradores para a realização do experimento. Ao Sr. Ivan dos Santos e a ADVET Nutrição Animal pelo fornecimento do extrato de orégano e ao CNPq pelos recursos disponibilizados para a realização da pesquisa.

Referências

AOAC, Official Method 989.05. 1988. Fat in milk. JAOAC 71, 898.

Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. Methods Enzymol, 105, 121-126.

ANKOM Thechnology. Method for determining acid detergent lignin in beakers. Macedon, 2010. Disponível em: <http://www.ankom.com/media/documents/ADL_beakers.pdf>. Acesso em: 10 mai. 2016.

ANKOM Thechnology. Method 5: acid detergent fiber in feeds filter bag technique. Macedon, 2006. Disponível em: <<http://www.ankom.com/procedures.aspx>>. Acesso em: 10 mai. 2016.

Baldin, M., Gama, M.A.S., Dresch, R., Harvatine, K.J., Oliveira, D.E. 2013. A rumen unprotected conjugated linoleic acid supplement inhibits milk fat synthesis and improves energy balance in lactating goats. J. Anim. Sci., 91: 3305-3314.

- Becker, P. M., Van Wikselaar, P. G., Franssen, M. C. R., Vos, R. C. H., Hall, R. D., Beekwilder, J. 2014. Evidence for a hydrogen-sink mechanism of (+)catechin-mediated emission reduction of the ruminant greenhouse gas methane. *Metabolomics*. 10:179–189.
- Benchaar, C., Chouinard, P.Y. 2009. Short communication: Assessment of the potential of cinnamaldehyde, condensed tannins, and saponins to modify milk fatty acid composition of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:3392–3396.
- Benchaar, C., Petit, H.V., Berthiaume, R., Whyte, T.D., Chouinard, P.Y. 2006. 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*, 89: 4352-4364,
- BURT, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253,
- Browne, R.W., Armstrong, D. 1998. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol*, 108: 347-52.
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L. and Ferret, A. 2007. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. 90: 2580–2595.
- COBELLIS, G., TRABALZA-MARINUCCI, M., YOU, Z. 2016. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. *Science of the Total Environment*. 545-546: 556-568.
- Cruz-Hernandez, C., Kramer, J.K.G., Kennelly, J.J., Glimm, D.R., Sorensen, B.M., Okine, E.K., Goonewardene, L.A., Weselake, R.J. 2007. Evaluating the conjugated linoleic acid and trans 18:1 isomers in milk fat of dairy cows fed increasing amounts of sunflower oil and a constant level of fish oil. *J Dairy Sci.* 90: 3786-3801.
- Durmic, Z., Blache, D. 2012. Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. *Animal Feed Science and Technology*. 176: 150-162.
- Dschaak, C.M., Williams, C.M., Holt, M.S., Eun, J.S., Young, A.J., Min, B.R. 2011. Effects of supplementing condensed tannin extract on intake, digestion, ruminal fermentation, and milk production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94: 2508-2519.
- Eruden, B., Nishida, T., Matsuyama, H., Hosoda, K., Shioya, S. 2005. Effect of the addition of various levels of green tea grounds silage at on the feed intake and milk production in lactating dairy cows. *Anim Sci J*, 76: 295-301.
- Fernandes, A.M., Oliveira, C.A.F, Lima, C.G. 2007. Effects of somatic cell counts in milk on physical and chemical characteristics of yogurt. *International of Dairy Science*. 76 (11): 3445-3452.

- Fonseca, L.F.L., Santos, M.V. 2000. Qualidade do leite e controle da mastite. São Paulo: Lemos Editorial, 175p.
- Flores, A.J., Garcarena, A.D., Vieyra, J.M.H., Beauchemin, K.A., Colombatto, D. 2013. Effects of specific essential oil compounds on the ruminal environment, milk production and milk composition of lactating dairy cows at pasture. *Animal Feed Science and Technology*, 186: 20-26.
- Gabbi, A.M., Viégas, J., Skonieski, F.R., Moraes, R.S. 2009. Hematological parameters of dairy heifers submitted to diets with phyto-genic additives. *Brazilian Journal of Health and Animal Production*. 10: 917-928.
- Gross, J., Van Dorland, H.A., Bruckmaier, R.M., Schwarz, F.J., 2011. Performance and metabolic profile of dairy cows during a lactational and deliberately induced negative energy balance with subsequent realimentation, *Journal of Dairy Science*, 94: 1820-1830.
- Hallier, A., Noiroto, V., Medina, B., Leboeuf, L., Cavret, S. 2013. Development of a method to determine essential oil residues in cow milk. *Journal of Dairy Science*. 96:1447–1454.
- Hristov, A.N., Lee, C., Cassidy, T., Heyler, K., Tekippe, J.A., Varga, G.A., Corl, B. and Brandt, R.C. 2013. Effect of *Origanum vulgare* L. leaves on rumen fermentation, production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 96 (2): 1189-1202.
- HORNE, D.S and MUIR, D.D. 1990. Alcohol and heat stability of Milk protein. *Journal of Dairy Research*. 46(3): 433-439.
- Kondo, M., Hirano, H., Kita, K., Jayanegara, A., Yokota, H. 2014. Fermentation characteristics, tannin contents and *in vitro* ruminal degradation of green tea and black -tea by-products ensiled at different temperatures. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 27 (7): 937-945.
- Lacerda, E.C.Q., Bauer, L.C., Oliveira, J.S., Silva, F.F., Carvalho, S.A., Macedo, M.S., Souza, N.E., Simionato, J.I. 2014. Effect of the dietary inclusion of dried oregano (*Origanum vulgare* L.) on the characteristics of milk from Holstein x Zebu cows. *Animal Feed Science and Technology*, 192: 101–105.
- Lauzon, K., Zhao, X., Bouetard, A., Delbecchi, L., Paquette, B., Lacasse, P. 2005. Antioxidants to prevent bovine neutrophil-induced mammary epithelial cell damage. *Journal of Dairy Science*. 88: 4295-4303.
- LeBel, C.P., Ischiropoulos, H., Bondy, S. C. 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol*, 5:227-231.
- Lejonklev, J., Lokke, M.M., Larsen, M.K., Mortensen, G., Petersen, M.A., Weisbjerg, M.R. 2013. Transfer of terpenes from essential oils into cow milk. *Journal of Dairy Science*. 96: 4235-4241.

- Lopes, F.C.F. 2007. Determinação do consumo de forrageiras tropicais por vacas em lactação em condição de pastejo. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, 52: 1-116.
- Lopes, S.T.A., Biondo, A.W., Santos, A.P. 2007. *Manual de Patologia Clínica Veterinária*. Departamento de Clínica de Pequenos Animais. Universidade de Santa Maria, 3. ed.
- Lúcio, C.F. 2012. Efeito da glutatona reduzida (GSH) na criopreservação de espermatozoides da espécie canina: avaliação *in vitro* e *in vivo*. Tese. Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal - Universidade de São Paulo. 116 p.
- Machado, F.S., Tomich, T.R., Ferreira, A.L., Cavalcanti, L.F.L., Campos, M.M., Paiva, C.A.V., Ribas, M.N., Pereira, L.G.R. 2016. A facility for respiration measurements in cattle. *Journal of Dairy Science*. 99:1-8.
- McIntosh, F. M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R. J., Beever, D. A., Newbold, C. J. 2003. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied Environment Microbiology*. 69: 5011-5014.
- Misra, H.P., Fridovich, I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 247: 3170-5.
- MORAES, J. F. V.; RABELO, N. A.. Um método simples para a digestão de amostras de plantas. Brasília, DF: EMBRAPA-DDT/EMBRAPA-CNPAF, 1986. 12p. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 12).
- Mueller-Harvey, I. 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13): 2010-2037.
- National Research Council. 2001. Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition. Nutrient requirements of dairy cattle. Washington, DC: National Academy Press. 381 p.
- Panazzolo, D.M. 2015. Inclusão de extrato de orégano (*Origanum vulgare*) na dieta e o comportamento ingestivo e social de novilhas. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 83 p.
- Patra, A. K. 2010. Meta-analyses of effects of phytochemicals on digestibility and rumen fermentation characteristics associated with methanogenesis. *J. Sci. Food. Agric*. 90: 2700-2708.
- Philpot, N., Nickerson, S.C. 2002. *Vencendo a luta contra a mastite*. São Paulo: Milkbuzz, 188 p.
- Ramdani, D., Chaudhry, A.S., Seal, C.J. 2013. Chemical composition, plant secondary metabolites, and minerals of green and black teas and the effect of different tea-to-water ratios during their extraction on the composition of their spent leaves as potential additives for ruminants. *J. Agric. Food Chem*. 61: 4961-4967

- Reznick, A.Z., Packer, L. 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*, 233: 357-63.
- Santos, C.S. 2015. Comportamento ingestivo e social de novilhas leiteiras suplementadas com extrato de chá verde (*Camellia sinensis* L.). Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 83 p.
- Santos, F.H.R., De Paula, M.R., Lezoer, D., Silva, J.T., Santos, G., Bittar, C.M.M. 2015. Essential oils for dairy calves: effects on performance, scours, rumen fermentation and intestinal fauna. *Animal*. 9 (6): 958–965.
- Statistical Analysis Systems Institute (SAS). 2008. Statistical analysis systems, version 9.2. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- SILVA, D.J. *Análise de alimentos : métodos químicos e biológicos*. Viçosa, UFV, 2006.
- Silva, R.R., Prado, I.N., Carvalho, G.G.P., Santana Jr., H.A., Silva, F.F., Dias, D.L.S 2008. Efeito da utilização de três intervalos de observações sobre a precisão dos resultados obtidos no estudo do comportamento ingestivo de vacas leiteiras em pastejo. *Ciência Animal Brasileira*, 9(2): 319-326.
- Silva, J.J., Saliba, E.O.S., Borges, I., Gonçalves, L.C., Rodríguez, N.M., Aroeira, L.J.M., Silva, A.G.M., Costa, F.J.N. 2010. Indicadores para estimativa de consumo total por novilhas holandês x zebu mantidas em confinamento. *Revista Brasileira de Saúde e Produção. Animal*, 11(3): 838-848.
- Singh, B., Bhat, T.K., Sharma, O.P. 2001. Biodegradation of tannic acid in an in vitro ruminal system. *Livestock Production Science*, 68 (2): 259-262.
- Schäellibaum, M. 2001. Impact of SCC on the quality of fluid milk and cheese. In: Annual Meeting –National Mastitis Council, 40, 2001, Reno. Proceedings... Madison: National Mastitis Council, p. 39.
- Tronco, V. M. 2013. Manual para inspeção da qualidade do leite. 5. ed. Santa Maria: UFSM. 208 p.
- Tedesco, D., Tava, A., Galletti, S., Tameni, M., Varisco, G., Costa, A., Steidler, S. 2004. Effects of Silymarin, a natural hepatoprotector, in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 87: 2239-2247.
- Tekippe, E., Hristov, A.N., Heyler, K.S., Cassidy, T.W., Zheljzakov, V.D., Ferreira, J.F.S., Karnati, S.K. and Varga, G.A. 2011. Rumen fermentation and production effects of *Organum vulgare* leaves in lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 94: 5065-5079.
- Vilela, D., Alvim, M.J, Matos, L.L., Matiulli, J.B. 2002. Utilização de gordura protegida durante o terço inicial da lactação de vacas leiteiras em pastagem de coast-cross. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 37 (10): 1503-1509.

- Wendel, A. 1981. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 77: 325-33.
- Wildman, E., Jones, G.M., Wagner, P.E. 1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *Journal of Dairy Science*, 65(3): 495-501.
- Wolff, R.L., Bayard, C.C., Fabien, R. J. 1995. Evaluation of sequential methods for the determination of butterfat fatty acid composition with emphasis on trans-18:1 acids. Application to the study of seasonal variations in French butters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72:1471-1483.
- Xu, C., Cai, Y., Moriya, N., Ogawa, M. 2007. Nutritive value for ruminants of green tea grounds as a replacement of brewers' grains in totally mixed ration silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 138(3): 228-238.
- Zotti, M., Colaianna, M., Morgese, M.G., Tucci, P., Schiavone, S., Avato, P., Trabace, L. 2013. Carvacrol: from ancient flavoring to neuromodulatory agent. *Molecules*, 18: 6161–6172.

Tabela 1. Composição químico-bromatológica dos alimentos da dieta experimental.

Amostra	MS	CZ (%)	Ca (%)	EB (kcal/kg)	EE (%)	FDA (%)	FDN (%)	Lig (%)	NDT (%)	P (%)	PB (%)	PB-FDA (%)	PB_FDN (%)
Dieta total	44,43	8,02	1,04	3983	2,85	19,69	43,00	1,97	72,04	0,50	16,78	0,61	3,43
Concentrado	87,75	12,71	2,25	3863	4,2	5,76	11,91	0,56	79,82	0,74	27,56	0,38	0,99
Silagem	32,23	5,19	0,21	3918	2,91	25,88	55,67	2,76	68,91	0,19	7,37	0,99	1,78
Feno	81,77	7,72	0,71	4088	2,55	30,17	67,91	3,27	63,06	0,35	13,03	0,97	6,45
Chá verde	90,64	8,25	na	na	0,56	12,23	17,94	7,70	na	na	8,99	na	na
Orégano	96,31	4,44	na	na	1,11	na	na	na	na	na	1,70	na	na

MS = Matéria seca absoluta; CZ = Cinza; Ca = Cálcio; EB = Energia bruta; EE = Extrato etéreo; FDA = Fibra em detergente ácido; FDN = Fibra em detergente neutro; Lig = Lignina; NDT = Nutrientes digestíveis totais; P = Fósforo; PB = Proteína bruta; na = não analisado.

Tabela 2. Descrição das atividades comportamentais observadas com vacas leiteiras recebendo dieta sem extrato vegetal e com extratos de orégano, chá verde e a mistura de ambos.

Classificação	Atividade	Descrição da atividade observada
Comportamento Ingestivo	Atividade de ingestão	Tempo despendido pelo animal no cocho ingerindo a dieta.
	Ócio	Tempo despendido pelo animal sem mastigar (em descanso).
	Ruminação	Tempo despendido pelo animal em ruminação.
	Ingestão de água	Número de vezes em que o animal ingeriu água.
Mudanças Posturais	Estação	Tempo despendido pelo animal em pé, em ruminação ou ócio.
	Decúbito Total	Tempo despendido pelo animal deitado em decúbito em ruminação ou ócio.
Comportamento social	Comportamento Dominante	Número de vezes em que fez investidas provocativas ou manifestou comportamento agressor ao disputar recursos como: cocho de água e tentativa de alimentação em outro cocho.
	Comportamento Submisso	Número de vezes que sofreu a ação da dominante e retirou-se do local, desistindo da disputa.
	Interação	Número de vezes em que os animais lambiam ou coçavam uns aos outros

Tabela 3. Médias do consumo e dos coeficientes de digestibilidade total aparente de vacas Holandês e mestiços Holandês e Gir recebendo extratos de orégano, chá verde ou ambos na dieta.

Atributo	Chá verde	Orégano	MIX	Controle	P>F Tratamentos
Consumo (kg MS/dia)	18,08 ± 0,30 ^a	17,71 ± 0,32 ^{ab}	16,20 ± 0,34 ^{bc}	18,08 ± 0,32 ^b	0,0005
Coefficientes de digestibilidade total aparente					
Energia bruta	0,49 ^{ab}	0,53 ^a	0,42 ^b	0,43 ^b	0,0467
Extrato etéreo	0,72	0,70	0,73	0,65	0,4860
Matéria seca	0,51 ^{cd}	0,54 ^c	0,45 ^{cd}	0,45 ^d	0,0831
FDA	0,17	0,16	0,11	0,01	0,1109
FDN	0,31	0,34	0,26	0,22	0,1638
Proteína bruta	0,56 ^{cd}	0,60 ^c	0,53 ^d	0,52 ^d	0,0959
Consumo diário por frações					
CZ (kg/dia)	1,40 ± 0,03 ^a	1,37 ± 0,03 ^a	1,26 ± 0,03 ^b	1,33 ± 0,03 ^a	0,0020
EB (Mcal/dia)	81,77 ± 1,07 ^a	80,75 ± 1,08 ^a	77,12 ± 1,07 ^b	79,08 ± 1,07 ^a	0,0145
EE (kg/dia)	0,51 ± 0,01	0,50 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,0947
FDA (kg/dia)	3,46 ± 0,07 ^a	3,38 ± 0,07 ^a	3,17 ± 0,07 ^b	3,30 ± 0,07 ^a	0,0157
FDN (kg/dia)	7,57 ± 0,14 ^a	7,43 ± 0,15 ^a	6,91 ± 0,14 ^b	7,17 ± 0,15 ^a	0,0085
LIG (kg/dia)	0,34 ± 0,01 ^a	0,33 ± 0,01 ^a	0,32 ± 0,01 ^a	0,30 ± 0,01 ^b	0,0027
NDT (kg/dia)	12,94 ± 0,23 ^a	12,63 ± 0,24 ^a	11,77 ± 0,23 ^b	12,39 ± 0,23 ^a	0,0049
PB (kg/dia)	2,92 ± 0,06 ^a	2,85 ± 0,06 ^a	2,66 ± 0,06 ^b	2,79 ± 0,06 ^a	0,0114
PB-FDA (kg/dia)	0,09 ± 0,01 ^a	0,09 ± 0,01 ^a	0,07 ± 0,01 ^b	0,08 ± 0,01 ^a	0,0198
PB-FDN (kg/dia)	0,57 ± 0,01 ^a	0,56 ± 0,01 ^a	0,50 ± 0,01 ^b	0,54 ± 0,01 ^a	0,0015

* a,b Médias seguidas por letras distintas na linha são diferentes (P<0,05), c,d Médias seguidas por letras distintas na linha tendem a ser diferentes (P<0,10)

** CZ: cinzas; EB: energia bruta; EE: extrato etéreo; FDA: Fibra em detergente ácido; FDN: Fibra em detergente neutro; LIG: lignina; NDT: nutrientes digestíveis totais; PB: proteína bruta.

Tabela 4. Médias dos atributos de condição corporal, produção e composição do leite em relação à inclusão de extrato de orégano, chá verde e sua associação na alimentação de vacas da raça Holandês e mestiços Holandês e Gir.

Avaliação	Chá verde	Orégano	MIX	Controle	P > F Tratamento	P > F Interação
Atributos de condição corporal						
Peso (kg)	527,36 ± 3,14	526,13 ± 3,19	523,85 ± 3,19	532,61 ± 3,17	0,2572	0,9593
ECC (1 a 5)	3,26 ± 0,05	3,27 ± 0,05	3,19 ± 0,05	3,28 ± 0,05	0,5089	0,9968
Produção e composição do leite						
PL (L/dia)	27,61 ± 0,30 ^a	26,48 ± 0,38 ^b	26,49 ± 0,25 ^b	25,67 ± 0,25 ^b	<0,0001	1,0000
PLc (L/dia)	28,66 ± 0,82 ^a	26,03 ± 0,87 ^b	25,65 ± 0,79 ^b	28,34 ± 0,78 ^a	0,0134	0,9991
Gordura (%)	4,23 ± 0,09 ^{ab}	4,05 ± 0,10 ^a	3,93 ± 0,09 ^b	4,32 ± 0,09 ^a	0,0088	0,9906
Proteína (%)	3,18 ± 0,02 ^{ab}	3,14 ± 0,02 ^b	3,22 ± 0,02 ^a	3,12 ± 0,02 ^b	0,0071	0,9983
Relação Gb:Pb	1,35 ± 0,03 ^a	1,25 ± 0,03 ^a	1,24 ± 0,03 ^b	1,39 ± 0,03 ^a	0,0003	0,9708
Efici. PL	1,55 ± 0,05	1,54 ± 0,05	1,59 ± 0,05	1,54 ± 0,05	0,8360	0,9803
Efici. PLc	1,62 ± 0,05	1,50 ± 0,05	1,58 ± 0,05	1,62 ± 0,05	0,3194	0,9806
Efici. CM	1,69 ± 0,05	1,58 ± 0,05	1,66 ± 0,05	1,68 ± 0,05	0,4146	0,9817
ECM	29,97 ± 0,82 ^a	27,40 ± 0,87 ^b	26,82 ± 0,79 ^b	29,37 ± 0,78 ^a	0,0163	0,9996
Lactose (%)	4,66 ± 0,02 ^a	4,56 ± 0,02 ^b	4,67 ± 0,02 ^a	4,64 ± 0,02 ^{ab}	<0,0001	0,9996
ES (%)	12,90 ± 0,10	13,00 ± 0,11	12,72 ± 0,10	13,07 ± 0,10	0,1026	0,9974
ESD (%)	8,81 ± 0,04 ^a	8,70 ± 0,04 ^b	8,90 ± 0,04 ^a	8,72 ± 0,03 ^b	0,0002	0,9997
CCSc** (cél/mL)	2,48 ± 0,06 ^{ab}	2,55 ± 0,06 ^a	2,13 ± 0,06 ^b	2,20 ± 0,06 ^b	<0,0001	0,9997

CCS (x 1000 cél/mL)	668 ± 182	1406 ± 199	264 ± 182	596 ± 189	-	-
Ureia (mg/DL)	21,13 ± 0,45 ^{bc}	19,66 ± 0,45 ^c	22,51 ± 0,46 ^{ab}	23,11 ± 0,46 ^a	<0,0001	0,9835
Álcool (°GL)	82,45 ± 1,05	83,36 ± 1,06	82,00 ± 1,05	84,97 ± 1,07	0,2123	0,9414
Acidez (°D)	15,60 ± 0,24 ^a	14,42 ± 0,22 ^b	15,12 ± 0,24 ^{ab}	14,40 ± 0,23 ^b	0,0005	0,7222
pH	6,81 ± 0,01 ^b	6,85 ± 0,01 ^a	6,79 ± 0,01 ^b	6,79 ± 0,01 ^b	<0,0001	0,6667

* a,b Médias seguidas por letras distintas na linha são diferentes (P<0,05), c,d Médias seguidas por letras distintas na linha tendem a ser diferentes (P<0,10)

** CCSc = Contagem de células somáticas transformada para log10

*** ECC: Escore de condição corporal; PL: Produção de leite; ES: Extrato seco; ESD: Extrato seco desengordurado; Relação PB:Gb = Relação proteína e gordura.

Tabela 5. Concentração de ácidos graxos do leite de vacas da raça Holandês e mestiços Holandês e Gir alimentadas com dieta controle (sem extratos vegetais) e contendo extrato de orégano, chá verde e sua associação.

Ácido graxo do leite (g/100g ácidos graxos totais)	Chá verde	Orégano	Mix	Controle	P>F Tratamentos
C4:0	3,712	3,636	3,803	3,779	0,7136
C5:0	0,044	0,037	0,040	0,038	0,7799
C6:0	2,420	2,130	2,500	2,397	0,0130
C7:0	0,043	0,033	0,042	0,041	0,4917
C8:0	1,473	1,264	1,508	1,475	0,2510
C9:0	0,058	0,045	0,056	0,052	0,2843
C10:0	3,351	2,688	3,406	3,288	0,0731
C10:1c9	0,359	0,351	0,387	0,357	0,6088
C11:0	0,108	0,072	0,111	0,106	0,0359
C12:0	3,902	3,226	3,915	3,818	0,1048
C12:1c9+C13:0	0,277	0,240	0,270	0,261	0,4911
C14:0 ISO	0,087	0,089	0,111	0,098	0,1728
C14:0	11,639	10,530	10,400	11,173	0,7095
C15:ISO	0,218	0,250	0,247	0,245	0,1851
C15:0 ANTEISO	0,460	0,506	0,454	0,459	0,4974
C14:1 c9	1,125	1,223	1,251	1,053	0,4567
C15:0	1,479	1,375	1,396	1,356	0,8222
C16:0 ISO	0,216	0,205	0,225	0,228	0,6904
C16:0	34,405	33,560	33,793	32,698	0,7875
C16:1t9+C17:0 ISO	0,291	0,331	0,305	0,298	0,2688
C16:1t12	0,139	0,140	0,146	0,146	0,9203
C16: 1c9+C17:0 ANTEISO	1,951	1,948	1,912	1,802	0,6705
C17:0	0,545	0,554	0,520	0,546	0,8704
C18:0 ISO	0,033	0,038	0,034	0,038	0,3883
C17: 1c9	0,205	0,229	0,187	0,197	0,1352
C18:0	8,000	8,914	8,623	9,482	0,2453
C18:1 t4	0,018	0,018	0,024	0,021	0,0121
C18:1 t5	0,014	0,013	0,017	0,014	0,0587
C18:1 t6-t8	0,200	0,215	0,232	0,220	0,4051
C18: 1t9	0,173	0,181	0,176	0,173	0,8925
C18:1 t10	0,249	0,245	0,240	0,233	0,9507
C18: 1t11	0,609	0,614	0,694	0,683	0,3709
C18:1 t12	0,248	0,253	0,274	0,258	0,7690
C18:1 t13-t14	0,267	0,264	0,293	0,291	0,6506
C18: 1c9	16,203	18,668	16,415	16,760	0,1614
C18:1 c11	0,536	0,525	0,510	0,500	0,9183

C18:1 c12	0,202	0,211	0,232	0,211	0,4598
C18:1 c13	0,028	0,031	0,039	0,035	0,0084
C18:1 t16	0,198	0,212	0,229	0,229	0,1841
C19:0+C18:1c15	0,058	0,062	0,074	0,074	0,0196
C18:2 t9t12	0,004	0,004	0,010	0,009	0,0012
C18: 2 c9t12	0,024	0,025	0,026	0,026	0,9132
C18:2 t9c12	0,019	0,022	0,020	0,016	0,0508
C18:2n-6	1,373	1,531	1,426	1,440	0,5336
C20:0	0,112	0,127	0,121	0,134	0,1447
C18:3n-6	0,023	0,025	0,026	0,028	0,3446
C18:3n-3	0,265	0,307	0,292	0,300	0,2348
C20:1 c11	0,032	0,035	0,032	0,035	0,5162
CLAc9t11	0,348	0,375	0,375	0,346	0,8036
CLAt9c11	0,009	0,010	0,012	0,010	0,1889
CLAt10c12	0,003	0,003	0,003	0,003	0,5200
C21:0	0,019	0,020	0,023	0,024	0,0411
C20:2n-6	0,018	0,022	0,020	0,021	0,1427
C22:0	0,069	0,077	0,062	0,076	0,4596
C20:3n-6	0,039	0,046	0,041	0,046	0,2000
C20:4n-6	0,114	0,121	0,124	0,137	0,1670
C23:0	0,024	0,029	0,026	0,029	0,4822
C20:5n-3	0,018	0,020	0,023	0,022	0,0708
C24:0	0,026	0,034	0,033	0,036	0,1066
C22:5n-3	0,051	0,053	0,056	0,059	0,7173
AG cadeia curta	67,759	63,878	66,281	65,171	0,1773
AG cadeia longa	30,380	34,135	31,568	32,768	0,2099
AG saturados	72,121	69,160	71,117	71,287	0,2586
AG insaturados	25,333	28,223	26,009	25,961	0,2402
CLA total	0,360	0,388	0,390	0,359	0,8021
Ômega 6	1,567	1,746	1,638	1,672	0,4892
Ômega 3	0,335	0,380	0,371	0,381	0,2379
C18 insaturado	20,712	23,428	21,249	21,523	0,2345

Tabela 6. Médias dos atributos do hemograma e enzimas de estresse oxidativo de vacas da raça Holandês e mestiços Holandês e Gir alimentadas com dieta controle (sem extratos vegetais) e contendo extrato de orégano, chá verde e sua associação.

Atributos	Chá verde	Orégano	MIX	Controle	P > F Tratamentos	P > F Interação
Hemograma						
Leucócitos (/μL)	11247 ± 749,38	12339 ± 448,88	11610 ± 534,93	12873 ± 513,09	0,2139	0,9163
Eosinófilo (/μL)	403,51 ± 99,87 ^{bc}	266,00 ± 62,82 ^c	601,33 ± 74,37 ^a	612,35 ± 71,50 ^{ab}	0,0010	0,5620
Segmentado (/μL)	2970,08 ± 452,19 ^c	4962,55 ± 283,00 ^a	4246,46 ± 337,47 ^{ab}	4091,31 ± 324,64 ^b	0,0043	0,8843
Linfócito (/μL)	7576,70 ± 553,96	6778,60 ± 333,36	6559,03 ± 399,73	7530,45 ± 379,03	0,2152	0,7242
Monócito (/μL)	430,69 ± 86,50	299,67 ± 48,41	421,34 ± 56,56	427,80 ± 54,94	0,2314	0,8716
Plaquetas (x10 ³ /μL)	414,81 ± 36,94	451,92 ± 20,56	460,64 ± 23,95	481,16 ± 24,88	0,5393	0,2061
Ptn plasmática (g/dL)	7,69 ± 0,14	7,81 ± 0,08	7,75 ± 0,10	7,62 ± 0,11	0,5359	0,6052
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	6,17 ± 0,20	5,80 ± 0,13	5,95 ± 0,15	5,96 ± 0,14	0,4752	0,8812
Volume globular (%)	29,51 ± 0,78	28,03 ± 0,49	29,45 ± 0,58	29,27 ± 0,55	0,1801	0,8447
Hemoglobina (q/dL)	10,03 ± 0,31	9,45 ± 0,19	10,03 ± 0,23	9,97 ± 0,22	0,1598	0,9328
VCM (fL)	48,02 ± 1,20	48,30 ± 0,72	49,68 ± 0,89	49,29 ± 0,82	0,5567	0,9992
CHCM (%)	34,11 ± 0,28	33,69 ± 0,18	33,90 ± 0,21	33,88 ± 0,20	0,6300	0,9124
Enzimas de estresse oxidativo						
DCFER (nmol/mg)	8975,26 ± 472.23 ^a	9510,44 ± 474.54 ^a	7535,99 ± 473.40 ^b	9006,80 ± 470,42 ^a	0,0290	0,3248
GSH (U/mg)	1,33 ± 0.14 ^a	0,71 ± 0.15 ^b	0,90 ± 0.14 ^b	0,91 ± 0.13 ^b	0,0266	0,0377
DCFPLA (nmol/mg)	2180,44 ± 112.69 ^a	2327,02 ± 109.79 ^a	1991,19 ± 109.30 ^b	2396,93 ± 111.73 ^a	0,0469	0,2731
SOD (U/mg)	14,74 ± 1,90	17,94 ± 1,81	14,74 ± 1,90	12,73 ± 2,10	0,2431	0,4778
CAT (U/mg)	1,06 ± 0,07	1,32 ± 0,08	1,05 ± 0,07	1,10 ± 0,08	0,0569	0,3934
GPX (U/mg)	2,39 ± 0,24	3,10 ± 0,26	2,63 ± 0,24	2,80 ± 0,25	0,2551	0,8475
CARBONILA (U/mg)	2,79 ± 0,36	3,37 ± 0,36	3,53 ± 0,36	2,79 ± 0,36	0,5125	0,4946

* VCM = volume corpuscular médio; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média; DCFER = oxidação da diclorofluoresceína nos eritrócitos; GSH = Glutathione reduzida; DCFPLA = oxidação da diclorofluoresceína no plasma; SOD = Superóxido dismutase; CAT = catalase; GPX = Glutathione peroxidase.

* Médias seguidas pela mesma letra na linha não são diferentes (P<0,05)

Tabela 7. Médias dos atributos comportamentais de vacas da raça Holandês e mestiços Holandês e Gir alimentadas com dieta controle (sem extratos vegetais) e contendo extrato de orégano, chá verde e sua associação.

Variável	Chá verde	Orégano	MIX	Controle	P>F Tratamento	P>F Interação
Atividade de ingestão ¹	168,3 ± 0,56 ^b	165,2 ± 0,56 ^b	161,0 ± 0,56 ^b	189,2 ± 0,56 ^a	0,0026	0,8086
Deitada total ¹	367,5 ± 1,49 ^b	388,1 ± 1,49 ^a	402,5 ± 1,49 ^a	437,9 ± 1,49 ^a	0,0091	0,8534
Deitada ócio ¹	203,5 ± 0,92 ^b	238,1 ± 0,92 ^{ab}	246,8 ± 0,92 ^{ab}	249,8 ± 0,92 ^a	0,0016	0,4077
Deitada Ruminando ¹	163,9 ± 1,12	150,0 ± 1,12	155,6 ± 1,12	188,1 ± 1,12	0,0856	0,6348
Em Pé total ¹	370,6 ± 1,60 ^a	336,4 ± 1,60 ^a	336,2 ± 1,60 ^a	287,5 ± 1,60 ^b	0,0043	0,8153
Em Pé ócio ¹	212,9 ± 0,89 ^a	188,1 ± 0,89 ^a	209,1 ± 0,89 ^{ab}	177,7 ± 0,89 ^b	0,0151	0,4154
Em Pé Rumina ¹	157,7 ± 0,99 ^a	148,3 ± 0,99 ^{ab}	127,0 ± 0,99 ^b	109,8 ± 0,99 ^b	0,0038	0,9737
Ócio Total ¹	416,4 ± 1,00 ^b	417,9 ± 1,00 ^b	456,0 ± 1,00 ^a	427,5 ± 1,00 ^b	0,0205	0,7582
Rumina Total ¹	321,7 ± 0,72 ^a	298,3 ± 0,72 ^b	282,7 ± 0,72 ^b	297,9 ± 0,72 ^a	0,0025	0,2332
Ingere água ²	5,80 ± 0,48	5,21 ± 0,48	6,23 ± 0,48	6,56 ± 0,48	0,2139	0,7977

¹ Tempo gasto (minutos) em cada atividade comportamental

² Número de atividade comportamental

* Médias seguidas pela mesma letra na linha não são diferentes (P<0,05)

Tabela 8. Médias de produção de calor metabólico, gases produzidos e AGV de vacas da raça Holandês e mestiços Holandês e Gir alimentadas com dieta controle (sem extratos vegetais) e contendo extrato de orégano, chá verde e sua associação.

	Chá	Orégano	Mix	Controle	P>F Tratamento	P>F Interação
VCH ₄ Total (L/dia)	451,89 ± 23,73	435,47 ± 23,73	472,01 ± 23,73	449,70 ± 23,73	0,7529	0,6173
VCH ₄ KgMS (L/kg MS ing)	24,37 ± 1,58	23,37 ± 1,58	25,57 ± 1,58	26,37 ± 1,58	0,5584	0,5872
VCH ₄ PM (L/dia)	4,10 ± 0,16	3,98 ± 0,16	4,27 ± 0,16	3,98 ± 0,16	0,5674	0,3940
VCO ₂ PM (L/dia)	50,62 ± 1,3	49,65 ± 1,3	50,67 ± 1,3	49,56 ± 1,3	0,8858	0,0843
PCalorPM (Kcal/kg PV ^{0.75})	240,07 ± 5,30	236,60 ± 5,30	237,19 ± 5,30	235,19 ± 5,30	0,9294	0,1559
C2	29,72 ± 5,93	40,56 ± 5,93	22,04 ± 5,93	27,89 ± 5,93	0,2058	-
C3	9,77 ± 2,10	12,83 ± 2,10	7,58 ± 2,10	10,29 ± 2,10	0,3952	-
C4	5,78 ± 1,49	8,13 ± 1,49	5,88 ± 1,49	5,79 ± 1,49	0,6202	-
pH	7,55 ± 0,18	7,15 ± 0,18	7,57 ± 0,18	7,28 ± 0,18	0,2495	-
C2C3	3,3 ± 0,23	3,15 ± 0,23	2,99 ± 0,23	2,9 ± 0,23	0,6252	-
Exc. Nitro	1,37 ± 0,79	1,24 ± 0,79	1,31 ± 0,79	1,44 ± 0,79	0,3617	-

* VCH₄Total = volume total de CH₄; VCH₄KgMS = volume de CH₄ produzido por Kg de matéria seca ingerida; VCH₄PM = volume de CH₄ por peso metabólico; VCO₂PM = volume de CO₂ por peso metabólico; PCalorPM = produção de calor por peso metabólico.

* Médias seguidas pela mesma letra na linha não são diferentes (P<0,05)

CAPÍTULO IV

CONCLUSÃO GERAL

- A inclusão de até 7,5 gramas de extrato de orégano na dieta de novilhas em fase de crescimento não influencia o consumo total de MS, variáveis fisiológicas e de desempenho.
- A suplementação de extrato de chá verde na dieta de vacas leiteiras da raça Holandês e mestiços Holandês e Gir no terço inicial da lactação beneficia a produção de leite e o consumo de MS. A associação do extrato de orégano e chá verde melhora o perfil de enzimas antioxidantes e composição química do leite.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o início da utilização de extratos vegetais com capacidades terapêuticas na alimentação animal, inúmeros estudos vêm sendo conduzidos para avaliar sua real capacidade benéfica tanto em monogástricos quanto ruminantes. A suplementação de extrato de orégano e chá verde apresenta potencial benéfico sobre o ambiente ruminal e suas atividades sobre os microrganismos para diminuir a produção de CH₄ e CO₂, embora exista variabilidade nos resultados. No entanto, alguns resultados encontrados em outras pesquisas demonstram a capacidade desses extratos vegetais em atuar positivamente sobre o desempenho animal, contudo, a escassez de dados referentes à capacidade de melhoria das enzimas antioxidantes despertou o interesse específico de nossas pesquisas.

As novilhas suplementadas na dose de 7,5 g de extrato de orégano reduziram o consumo e o tempo de consumo de concentrado, além disso, a inclusão de diferentes doses de extrato influenciou significativamente com relação aos animais não suplementados sobre o desenvolvimento corporal. Porém, benefícios sobre suas possíveis atividades metabólicas e sobre o sistema imune não foram avaliadas, sendo sugerido novas pesquisas para verificar as doses utilizadas nessa pesquisa e até doses superiores sobre o estado imunológico e reprodutivo.

O comprovado incremento dos extratos de chá verde, orégano e a associação de ambos na suplementação de vacas leiteiras da raça Holandês e mestiços Holandês e Gir sobre a produção, composição do leite, consumo e enzimas antioxidantes encontrados nessa pesquisa demonstram a possibilidade de introduzir seu uso como rotina nas fazendas leiteiras. Além da melhoria na saúde e desempenho das vacas, consumidores preocupados com a qualidade dos produtos ingeridos tendem a ser beneficiados com produtos mais naturais visto que a suplementação dos extratos poderá prevenir doenças e minimizar o uso de medicamentos aos animais.

Além dos resultados positivos encontrados nessas pesquisas a literatura revisa destaca os benefícios da utilização dos fitoquímicos a nível ruminal, propiciando a diminuição de gases prejudiciais ao meio ambiente. Assim, ressaltamos a necessidade do fortalecimento e promoção da utilização desses extratos como estratégia ambiental na pecuária leiteira.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIRDIVANI, S.; BABA A. S. H. Green tea yogurt: major phenolic compounds and microbial growth. **Journal Food Science and Technology**, Chichester, v. 52, n. 7, p. 4652–4660, 2015.
- ALEXANDER, M. Aromatherapy and immunity: how the use of essential oils aids immune potentiality. **International Journal of Aromatherapy**, Hove, v. 12, p. 49-56, 2002.
- ANDO, S. et al. Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 82, p. 245-248, 2003.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- ANKRI, S.; MIRELMAN, D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, p. 125-129. 1999.
- ASGARY, S. et al. The antioxidant activity of the essential oils of Iranian conifers on red blood cell. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ATHEROSCLEROSIS, 13., Kyoto, Japan. **Proceedings...** Kyoto, Japan, 2003. 476 p.
- AWIKA, J.M.; ROONEY, L.W. Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. **Phytochemistry**, New York, v. 65, p. 1199-1221, 2004.
- BAUER, K.; GARBE, D.; SARBURG, H. **Common fragrance and flavor materials**: preparation, properties and uses. Weinheim: Wiley-VCH, 2001. 293 p.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and Chemical Toxicology**, Catalonia, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BARRY, T. N. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pendunculatus* for sheep. 3. Rates of body and wool growth. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 54, p. 211–217, 1985.
- BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M. Effects of various feed additives on the methane emissions from beef cattle. **International Congress Series**, [Amsterdam], v.1293, p. 152–155, 2006.(Proceedings of the 2nd International Conference on Greenhouse Gases and Animal Agriculture, held in Zurich, Switzerland between 20 and 24 September 2005)
- BEECHER, G. R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and

intake. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC SYMPOSIUM ON TEA AND HUMAN HEALTH, 13., 2003, Washington. **Proceedings...** Washington, 2003.

BENCHAAR, C. et al. Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production and milk composition in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, p.4352-4364, 2006.

BENCHAAR, C. et al. Effects of essential oils and their components on in vitro rumen microbial fermentation. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 87, p. 413–419, 2007.

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

BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Lebensm Wiss Technology**, [Amsterdam], v. 37, p. 263–268, 2004.

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

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

BUSLIG, B. S.; MANTHEY, J. A. **Flavonoids in cell function**. New York. USA: Kluwer Academic /Plenum Publishers, 2002.

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

BRASIL. Instrução Normativa n. 51 de 18 de setembro de 2002. Dispõe sobre regulamentos técnicos aplicados ao leite cru e pasteurizado. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, n.183, p.13-22, 2002.

BROUDISCOU, L. P.; PAPON, Y.; BROUDISCOU, A. F. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 87, p.263-277. 2000.

BROUDISCOU, L. P.; PAPON, Y.; BROUDISCOU, A. F. Effects of dry plant extracts on feed degradation and the production of rumen microbial biomass in a dual outflow fermenter. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 101, p. 183-189, 2002.

- BROUGHAN, C. Odours, emotions, and cognition- how odours may affect cognitive performance. **International Journal of Aromatherapy**, Hove, v. 12, p. 92- 98. 2002.
- BROWNSON, D. M. et al. Flavonoid effects relevant to cancer. **Journal of Nutrition** (Suppl.), Rockville Pike, v. 132, p. 3482S-3489S, 2002.
- BRUFAU, J. **Animal feeding in Europe: challenges and opportunities**. Nutritional biotechnology in the feed and food industries. Nottingham, UK: Nottingham University Press, 2004.
- CALSAMIGLIA, S. et al. Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 2580–2595, 2007.
- CARDINALI, R. et al. Oregano, rosemary and vitamin E dietary supplementation in growing rabbits: Effect on growth performance, carcass traits, bone development and meat chemical composition. **Livestock Science**, Amsterdam, n. 175, p. 83–89, 2015.
- CARDOZO, P. W. et al. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, p. 3230-3236, 2004.
- CARDOZO, P. W. et al. Effects of alfalfa extract, anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high- concentrate diet. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 2801-2808, 2006.
- CIESLAK, A. et al. Plant components with specific activities against rumen methanogens. **Animal**, Cambridge, v. 7, p. 253-265, 2013.
- 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**, [Amsterdam], p. 545-546, 556-568. 2016.
- DEDL, H.; ELSENWENGER, T. Phytogetic feeds additives – an alternative? **International Pigs Topics**, England, v. 15, p. 33-34. 2000.
- DELAQUIS, P. J. et al. Antimicrobial activity of mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 74, p. 101-109, 2002.
- DURAK, I. et al. Effects of garlic extract consumption on plasma and erythrocyte antioxidant parameters in atherosclerotic patients. **Life Science**, Amsterdam, v. 75, p. 1959-1966. 2004.
- DURMIC, Z.; BLACHE, D. Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.176, p. 150– 162, 2012.

- DRAGLAND, S. et al. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. **Journal of Nutrition**, Rockville Pike, v. 133, p. 1286-1290. 2003.
- ESTELL, R. E. et al. Effects of eugenol, alfa-terpineol, terpin-4-ol and methyl-eugenol on consumption of alfalfa pellets by sheep. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.73, p. 272-276, 2007.
- FUJIWARA, R.; KOMORI, T.M.; YOKOYAMA, M. Psychoneuroimmunological benefits of aromatherapy. **International Journal of Aromatherapy**, Hove, v. 12, p. 77-82. 2002.
- FREI, B.; HIGDON, J. V. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. **Journal of Nutrition** (Suppl), Rockville Pike, v. 133, p. 3275S-3284S, 2003.
- GABBI, A. M. et al. Hematological parameters of dairy heifers submitted to diets with phytogetic additives. **Brazilian Journal of Health and Animal Production**, Salvador, v. 10, p. 917-928, 2009a.
- GABBI, A. M. et al. Productive performance and behavior of dairy heifers submitted to diets with phytogetic additive. **Brazilian Journal of Health and Animal Production**, Salvador, v. 10, p. 949-962, 2009b.
- GIBBS, M.J.; LEWIS, L.; HOFFMAN, J.S. **Reducing Methane Emissions from Livestock: Opportunities and Issues**. [Washington]: U.S. Environmental Protection Agency, 1989.
- GOUVÊA, M. M. et al. Ácidos Linoleicos Conjugados (ALC) – Os benefícios que exercem sobre a saúde humana e as principais metodologias analíticas aplicadas para a sua determinação em leites. **Revista Virtual Química**, Niterói, v. 4, n. 6, p. 653-669, 2012.
- GOLOMBESKI, G. et al. Performance of post-weaned Holstein heifer calves fed grain mixes supplemented with essential oils at differing levels. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 5, 2010.
- GONZALES, H. L. et al. Qualidade do leite em diferentes sistemas de produção da bacia leiteira de Pelotas, RS. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.14, p.475 - 480, 2007.
- GUENTHER E. **The Essential Oils**. II. New York: Van Nostrand Co., 1948.
- HALVORSEN, B.L. et al. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. **Journal of Nutrition**, Rockville Pike, v. 132, p. 461-471, 2002.
- HALLIER, A. et al. Development of a method to determine essential oil residues in cow milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 96, p. 1447-1454, 2013.
- HART, K.J. et al. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. **Animal**

Feed Science and Technology, Amsterdam, v. 147, p. 8–35. 2008.

HOOK, S. E; WRIGHT, A. D. G; McBRIDE, B. W. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. Cairo: Archaea, 2010.

HODGES, J. Livestock, ethics, and quality of life. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, p. 2887-2894, 2003.

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

HUI, Y. H. Oleoresins and essential oils. In: BAILEY'S industrial oil and fat products. New York: Wiley-Interscience Publication, 1996. v. 6, p. 145-153

JOUANY, J. P.; MORGAVI, D. P. Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. **Animal**, Cambridge, v. 1, p. 1443–1466, 2007.

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

KOHLERT, C.; DAVIDSON, J. C.; ALBERT, L. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans. **Planta Medica**, New York, v. 66, p. 495–505, 2000.

KONDO, M. et al. Variation of tannin contents in selected agro-industrial by-products and their biological activity in precipitin protein. **Advances in Animal and Veterinary Science**, Pakistan, v. 4, n. 1, p. 66-70. 2016.

KUNG, 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**, Champaign, v. 91, p. 4793- 4800, 2008.

LAU, B.H.S. Detoxifying, radioprotective and phagocyte-enhancing effects of garlic. **International Clinical Nutrition Review**, Estados Unidos, v. 9, p. 11-15, 1989.

LAUZON, K. et al. Antioxidants to prevent bovine neutrophil-induced mammary epithelial cell damage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 4295-4303, 2005.

LARKINS, N.; WYNN, S. Pharmacognosy: phytomedicines and their mechanisms. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, Canadá, v. 34, p. 291-327, 2004.

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**, [Oxford], v. 18, p. 457-465, 2004.

- Lejonklev, J. et al. Transfer of terpenes from essential oils into cow milk. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 96, p. 4235–4241, 2013.
- MACIEJ, J. et al. Effects of oral flavonoid supplementation on the metabolic and antioxidative status of newborn dairy calves. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 99, p. 805–811, 2016.
- MACHEBOEUF, D. Dose–response effects of essential oils on in vitro fermentation activity of the rumenmicrobial population. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, p. 335–350, 2008.
- MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiacea and Compositae. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 67, p. 187-195, 2001.
- MARQUES, L. T. et al. Fornecimento de suplementos com diferentes níveis de energia e proteína para vacas Jersey e seus efeitos sobre a instabilidade do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.39, n. 12, p. 2724-2730, 2010.
- MARQUES, L. T. et al. Produção leiteira, composição do leite e perfil bioquímico sanguíneo de vacas lactantes suplementadas com sal aniônico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, p. 1088-1094, 2011.
- MARTINS, P. R. G. et al. Produção e qualidade do leite em sistemas de produção da região leiteira de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, p. 212-217, 2007.
- MCINTOSH, F. M. et al. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v. 69, p. 5011-5014, 2003.
- MCSWEENEY, C. S.; MACKIE, R. I. Gastrointestinal detoxification and digestive disorders in ruminant animals. In: **GASTROINTESTINAL Microbiology**. London, UK: Chapman & Hall, 1997. p. 583-634.
- MELO, F. H. C. et al. Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, Paris, v. 24, p. 437–443, 2010.
- MICHIELS, J. et al. In vitro degradation and in vivo passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 88, p. 2371-2381, 2008.
- 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. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 1, p. 167-172, 2012.

- MIN, B. R. et al. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 106, p. 3-19. 2003.
- MIN, B. R. et al. The effects of tannins-containing ground pine bark diet upon nutrient digestion, nitrogen balance, and mineral retention in meat goats. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, China, v. 6, n. 25, p. 1-8. 2015.
- MIRON, T. et al. The mode of effect of garlic component, allicin, on murine peritoneal macrophages. **Nutrition Research**, [New York], v. 21, p. 617-626, 2001.
- 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**, Amsterdam, v. 114, p. 91-104. 2004.
- MUELLER-HARVEY, I. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Malden, v.86, n.13, p. 2010-2037, 2006.
- McDOUGALL, G. J. et al. Anthocyanin-Flavanol Condensation Products from Black Currant (*Ribes nigrum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.53, n.20, p.7878-7885, 2005.
- NASCIMENTO, G. G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, p. 247-256, 2000.
- NARJISSE, H.; MALECHEK, J. C.; OLSEN J. D. Influence of odor and taste of monoterpenoidson food selection by anosmic and intact sheep and goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 23, p. 109-115, 1996.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition. **Nutrient requirements of dairy cattle**. Washington, DC: National Academy Press, 2001. 381p.
- NGUYEN, T. M.; BINH, D. V.; ORSKOV, E. R. Effect of foliages containing condensed tannin and on gastrointestinal parasites. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 121, n.1-2, p.77-87, 2005.
- NEWBOLD, C. J. et al. Effects of a specific blend of essential oil components on rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 114, p. 105-112, 2004.
- OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, London, v. 120, p. 308-312. 2010.

- PUCHALA, R. et al. The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, p. 182-186, 2005.
- QIAN, J. Y.; LIU, D.; HUANG, A. G. The efficiency of flavonoids in polar extracts of *Lycium chinense* Mill fruits as free radical scavenger. **Food Chemistry**, London, v. 87, p. 283-287, 2004.
- RAMÍREZ-RESTREPO C. A.; BARRY, T. N. Alternative temperate forages containing secondary compounds for improving sustainable productivity in grazing ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 120, p. 179–201. 2005.
- RANUCCI, D. et al. Dietary effects of a mix derived from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil and sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) wood extract on pig performance, oxidative status and pork quality traits. **Meat Science**, Barking, v. 100, p.319–326, 2015.
- RASOOLI, I.; ABYANEH, M. R. Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, Reading, v. 15, p. 479-483, 2004.
- REMPPIIS, S. et al. Effects of energy intake on performance, mobilization and retention of body tissue, and metabolic parameters in dairy cows with special regard to effects of pre-partum nutrition on lactation: a review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Gwanak-gu, v. 24, n. 4, p. 1011-2367, 2011.
- REVELL, D. K.; KOTZE, A.; THOMAS, D. T. Opportunities to use secondary plant compounds to manage diet selection and gut health of grazing herbivores. In: **MULTIFUNCTIONAL grasslands and rangelands in a changing world**. Beijing: Guangdong People's Publishing House, v.1, p.1-6, 2008.
- RIVAROLI, D. C. **Níveis de óleos essenciais na dieta de bovinos de Corte terminados em confinamento: desempenho, características da carcaça e qualidade da carne**. 2014. 84 p. Dissertação - Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2014.
- ROCHFORT, S.; PARKER, A. J.; DUNSHEA, F. R. Plants bioactives for ruminant health and productivity. **Phytochemistry**, New York, v. 69, p. 299–322. 2008.
- ROOFCHAE, A. et al. Effect of dietary oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil on growth performance, cecal microflora and serum antioxidant activity of broiler chickens. **African Journal of Biotechnology**, [Nairobi], v. 10, n. 32, p. 6177-6183. 2011.
- SIVAM, G. P. Protection against *Helicobacter pylori* and other bacterial infections by garlic. **Journal of Nutrition** (Suppl.), Rockville Pike, v. 131, p.

1106S- 1108S. 2001.

SPANGHERO, M. et al. Effect of increasing doses of a microencapsulated blend of essential oils on performance of lactating primiparous dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 153, p. 153–157, 2009.

SYMEON, G. K. et al. Effects of Oregano Essential Oil Dietary Supplementation on the Feeding and Drinking Behaviour as Well as the Activity of Broilers. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v. 9, n. 4, p. 401-405, 2010.

SZUMACHER-STRABEL, M.; CIEŚLAK, A. Dietary possibilities to mitigate rumen methane and ammonia production. Greenhouse gases capturing, utilization and reduction. In: Greenhouse gases – capturing, utilization and reduction. Rijeka, Croatia: Intech, 2012. Cap.9, p.201-238

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**, Champaign, v. 92, p.1734-1744, 2009.

TEDESCO D. et al. Effects of Silymarin, a natural hepatoprotector, in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, p. 2239-2247, 2004.

TEKIPPE, E. et al. Rumen fermentation and production effects of *Organum vulgare* leaves in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, p.5065- 5079, 2011.

TORNAMBÉ, G. et al. Changes in terpene content in milk from pasture-fed cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, p. 2309-2319, 2006.

VAKILI, A. R. et al. The effects of Thyme and Cinnamon essential oils on performance, rumen fermentation and blood metabolites in Holstein calves consuming high concentrate diet. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, Gwanak-gu, v. 26, n. 7, p. 935-944, 2013.

VAN DE BRAAK, S. A.; LEIJTEN, G. C. **Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union**. Rotterdam: CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, 1999. 116 p.

VASTA, V. et al. Alternative feed resources and their effects on the quality of meat and milk from small ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 147, p.223–246, 2008.

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**, Amsterdam, v. 89, p. 145-154, 2003.

VIALLO, C. et al. Transfer of monoterpenes and sesquiterpenes from forages into milk fat. **Le Lait**, [S.I.], v. 80, n.6, p. 635-641, 2000.

WAGHORN, G. C.; CLARK, D. A. Greenhouse gas mitigation opportunities with immediate application to pastoral grazing for ruminants. **International Congress Series**, [Amsterdam], v.1293, p. 107– 110, 2006. (Proceedings of the 2nd International Conference on Greenhouse Gases and Animal Agriculture, held in Zurich, Switzerland between 20 and 24 September 2005)

WARREHAM, C. N.; WISEMAN, J.; COLE, D. J. A. Processing and antinutritive factors in feedstuffs. In: PRINCIPLES of pig sciences. Nottingham, Nottingham University Press, 1994. 427p.

WETSCHEREK, W. Gains from phytogenic feed additives. **International Pigs Topics**, East Yorkshire, v. 15, p. 31-32, 2000.

WINDISCH, W. et al. A. Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. **American Society of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. E140-E148 (Suppl.), 2008.

WOHLT, J. E.; FIALLO, J. F.; MILLER, M. E. Composition of by-products of the essential oil industry and their potential as feeds for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 6, p. 115-121, 1981.

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

ZANELA, M. B. et al. Ocorrência do leite instável não ácido no noroeste do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, p.1009-1013, 2009.

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

ZHOU, S. et al. Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. **Life Sciences**, Oxford, v. 74, n.8, p.935–968. 2004.

APÊNDICES

Normas para submissão de artigo para o Tropical Animal Health and Production

AUTHORSHIP POLICY

Authorship should incorporate and should be restricted to those who have contributed substantially to the work in one or more of the following categories:

- Conceived of or designed study
- Performed research
- Analyzed data
- Contributed new methods or models
- Wrote the paper

TYPES OF ARTICLES

Manuscripts should be presented preferably in Times New Roman font, double spaced, using A4 paper size. Please use the automatic page and line numbering function to number the pages and lines in your document and number the lines in a single continuous sequence. Regular Articles: Articles should be as concise as possible and should not normally exceed approximately 4000 words or about 8 pages of the journal including illustrations and tables.

Articles should be structured into the following sections;

(a) Abstract of 150-250 words giving a synopsis of the findings presented and the conclusions reached. The Abstract should be presented as a single continuous paragraph without subdivisions.

- (b) Introduction stating purpose of the work
- (c) Materials and Methods
- (d) Results
- (e) Discussion (conclusions should be incorporated in the discussion!)
- (f) Acknowledgements
- (g) Statement of Animal Rights
- (h) Conflict of Interest Statement
- (i) References

Short Communications and Technical Notes: Short Communications and Technical Notes should not normally exceed approximately 2000 words or about 4 pages of the journal, including illustrations, tables and references. An abstract of 150-250 words should be included and a minimum number of subheadings may be included if it adds clarity to the article.

Short Communications report original scientific data. Technical Notes describe innovative methodologies. Reviews: Review articles will be welcomed. However, authors considering the submission of review articles are advised to consult the EditorinChief in advance.

Correspondence: Letters on topics relevant to the aims of the Journal will be considered for publication by the Editorin Chief who may modify them. It is the authors responsibility to ensure that submitted manuscripts comply with journal format as indicated in the current instructions to authors and free sample articles on the springer.com journal homepage.

ETHICAL STANDARDS

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human and animal studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

These statements should be added in a separate section before the reference list. If these statements are not applicable, authors should state: The manuscript does not contain clinical studies or patient data.

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the abovementioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the abovementioned requirements

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all coauthors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Costs of Color Illustrations

Online publication of color illustrations is always free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs of EUR 950 / US\$ 1150 (+ local tax) per article, irrespective of the number of figures in it.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The email address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting; Manuscripts should be submitted in Word; Use a normal, plain font (e.g., 10point; Times Roman) for text; Use italics for emphasis; Use the automatic page numbering function to number the pages; Do not use field functions; Use tab stops or other commands for indents, not the space bar; Use the table function, not spreadsheets, to make tables; Use the equation editor or MathType for equations; Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter: Footnotes; Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables; Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lowercase letters (or asterisks for significance values and other statistical data); Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Please note:

Use the automatic page and line numbering function to number the pages and lines in your document.

REFERENCES

1. All publications cited in the text should be presented in the list of references. The typescript should be carefully checked to ensure that the spelling of the authors' names and dates are exactly the same as in the reference list.

2. In the text, refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed, if necessary, by a short reference to appropriate pages. Examples: 'Peters (1985) has shown that "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1984, pp. 1216)'

3. If reference is made in the text to a publication by three or more authors, the abbreviation et al. should be used. All names should be given in the list of references.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically by authors' surname(s) and chronologically by author. If an author in the list is also mentioned with coauthors the following order should be used: publications by the single author, arranged according to publication dates; publications of the

same author with coauthors. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1986a, 1986b, etc.

5. Use the following system for arranging each reference in the list:

- For journal articles:

Ahl, A.S., 1986. The role of vibrissae in behaviour: a status review, *Veterinary Research Communications*, 10, 245268

- For books:

Fox, J.G., Cohen, B.J. and Lowe, F.M., 1984. *Laboratory Animal Medicine*, (Academic Press, London)

- For a paper in published symposia proceedings or a chapter in multiauthor books:

Lowe, K.F. and Hamilton, B.A., 1986. Dairy pastures in the Australian tropics and subtropics. In: G.T. Murtagh and R.M. Jones (eds), *Proceedings of the 3rd Australian conference on tropical pastures*, Rockhampton, 1985, (Tropical Grassland Society of Australia, St. Lucia; Occasional Publication 3), 6879

- For unpublished theses, memoranda etc:

Crowther, J., 1980. Karst water studies and environment in West Malaysia, (unpublished PhD thesis, University of Hull)

- For Online documents:

Doe J. Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. 1999. <http://www.rsc.org/dose/title> of subordinate document. Accessed 15 Jan 1999

6. Do not abbreviate the titles of journals mentioned in the list of references.

7. Titles of references should be given in the original language, except for the titles of publications in nonLatin alphabets, which should be transliterated, and a notation such as '(in Russian)' or '(in Greek, with English abstract)' added.

8. Citations of personal communications should be avoided unless absolutely necessary. When used, they should appear only in the text, using the format: 'E. Redpath, personal communication, 1986' and should not appear in the Reference List. Citations to the unpublished data of any of the authors should not be included unless the work has already been accepted for publication, in which case a reference should be given in the usual way with "in press" in place of the volume and page numbers.

TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lowercase letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission; Supply all figures electronically; Indicate what graphics program was used to create the artwork; For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable; Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your finalized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8pt type on an axis and 20pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,

"A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material)

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and booksized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a texttospeech software or a texttoBraille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and email; address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that largersized files may require very long download times and that some users may experience other

Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for longterm viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.

Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and

ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the reuse of material to avoid the hint of textrecycling (“selfplagiarism”).

A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salamipublishing”).

No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions

No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Consent to submit has been received explicitly from all coauthors, as well as from the responsible authorities tacitly or explicitly at the institute/organization where the work has been carried out, before the work is submitted.

Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

Changes of authorship or in the order of authors are not accepted after acceptance of a manuscript.

Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted.

Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the EditorinChief.

In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the EditorinChief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after

investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor in Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.

The author's institution may be informed.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or nonfinancial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest

Research involving Human Participants and/or Animals

Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline.

Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the abovementioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the abovementioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests that are directly or indirectly related to the research may include but are not limited to the following:

Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)

Honoraria for speaking at symposia

Financial support for attending symposia

Financial support for educational programs

Employment or consultation

Support from a project sponsor

Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships Multiple affiliations

Financial relationships, for example equity ownership or investment interest Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)

Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (nonfinancial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS

1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

For retrospective studies, please add the following sentence:

“For this type of study formal consent is not required.”

2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

INFORMED CONSENT

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscriptionbased article, but in addition is made available publicly through Springer’s online platform SpringerLink.

Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case,

you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in:

Edanz English editing for scientists

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

Normas para submissão de artigo no Journal of Dairy Science

Editorial Policies and Procedures

The American Dairy Science Association® (ADSA®) invites scientists from the global community to submit papers for consideration to the Journal of Dairy Science. Authors need not be members of ADSA. These instructions detail the form and style required by the Journal of Dairy Science (JDS) for papers submitted for publication. Papers that do not follow the form and style of the journal may be rejected without review. We recommend that authors refer to these instructions when preparing manuscripts, when incorporating requested changes into revisions after review, and when checking author proofs.

Contact Information for Journal Staff.

For information on the scientific content of the journal, contact the editor-in-chief, Dr. Matthew C. Lucy; phone: (573) 882-9897; e-mail: lucym@missouri.edu. For assistance with Manuscript Central, Manuscript Submission/Copyright forms, and page charge/ offprint orders contact Shauna Miller, Editorial Assistant, Headquarters Office, 1800 S. Oak St., Suite 100, Champaign, IL 61820; FAX (217) 378-4083; shaunam@assoqh.org. For other information or to submit a paper, contact Susan Pollock, Managing Editor, Headquarters Office, American Dairy Science Association, 1800 S. Oak St., Suite 100, Champaign, IL 61820; phone (217) 356- 7641; FAX (217) 378-4083; journals@assoqh.org.

Care and Use of Animals

All research animals should be acquired, retained, and used in compliance with federal, state, and local laws and regulations. The authors should state explicitly that IACUC (or equivalent) approval was obtained before commencement of the study. Authors should make it clear that experiments were conducted in a manner that avoided unnecessary discomfort to the animals by the use of proper management and laboratory techniques. Experiments should be conducted in accordance with the principles and specific guidelines presented in Guidelines for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching, 3rd ed. (available from Federation of Animal Science Societies, 1800 S. Oak St., Suite 100, Champaign, IL 61820; <http://www.fass.org/>). Methods of killing experimental animals must be described in the text. When describing

surgical procedures, the type and dosage of the anesthetic agent must be specified.

Human Subjects Research

If human subjects were involved in research (e.g., surveys, sensory panels, or other participation), the authors certify that the studies complied with all appropriate laws, regulations, and policies governing the use of human subjects in research.

Types of Articles

Full-Length Research Papers. The majority of papers published in JDS are full-length research articles. The journal emphasizes the importance of good scientific writing and clarity in presentation of the concepts and methods, and sufficient background information that would be required for thorough understanding by scientists in other disciplines. The results of experiments published in the journal must be replicated, either by replicating treatments within experiments or by repeating experiments. In addition to full-length research papers, the following types of articles appear in the journal:

Our Industry Today. The Our Industry Today section includes interpretive applied summaries and recommendations from research that are useful to the dairy industry. Syntheses and applications from technical reports that contribute to solutions of problems in the dairy industry especially are solicited. Authors of reports for extension education of the nonscientist are encouraged to share their contributions with colleagues and to achieve larger circulation of their conclusions and recommendations through this section. In addition, papers that report on advances in teaching and outreach techniques are suitable for this section. The organization of papers for Our Industry Today may vary but should be logical and effective; an abstract is required. All other style and form instructions apply. **Hot Topics.** Papers submitted for this section must report on a completed experiment testing a timely, original hypothesis of importance to an area of dairy science. The work may be preliminary in nature, but with sufficient data so that the hypothesis is clearly tested. Results may point to avenues for fruitful, indepth analyses. Reports must contain an explicitly stated hypothesis and objectives, with sufficient detail in methodology for repetition of the work, as well as a results section, a brief discussion, and references. Total page limits for text, tables, figures, and references must be no more than 4 journal pages (approximately 10 typewritten pages minus space for tables and figures). The manuscript should contain a title and short abstract but not separate sections. The total number of tables and figures should be no more than 3; references should be minimal. The first page must have HOT TOPICS in capital letters on the header line. These papers will be given priority for publication. An effort will be made to notify authors of a decision within 1 mo of the date of receipt. Once accepted, the paper should be published within 3 mo.

Short Communications. Short communications are reports of limited experiments that test a timely, original hypothesis of importance to some area of dairy science. The manuscript should be no more than 4 journal pages in length (approximately 10 typewritten pages minus space for tables and

figures); ||Short communication:|| should precede the title on the title page of the manuscript. Short communications should not contain main headings (e.g., Introduction, Materials and Methods) but may include subheadings for clarity. The manuscript may report negative results. Reports must contain a hypothesis, objectives, sufficient detail in methodology for repetition of the work, results with brief discussion, and references.

Technical Notes. Papers in this section should report a method that is useful to some aspect of dairy science. Submissions should include a brief justification for the technique, be it new or an improvement on a previously published technique. The report should state a hypothesis, include a full description of procedures that can be repeated by researchers, and include explicit controls to indicate sensitivity, precision, and accuracy of the technique. Technical notes should not contain main headings (e.g., Introduction, Materials and Methods) but may include subheadings for clarity. If the technique is an improvement on an existing technique, sufficient comparison of the previous technique should be included, and mean and dispersion information must be included. The page limit is 4 printed pages (approximately 10 typewritten pages minus space for tables and figures). Use of tables, figures, and references should be minimized. Requests for longer technical notes may be made to the senior editor and editor-in-chief, but justification for a longer report will be required.

Invited Reviews. The mechanism for consideration of invited reviews is to encourage additional publication (~10 to 12 per year) of invited reviews in all sections of the journal. Section editors will advise the editor-in-chief on suggested reviewers and justification for the review. The editor-in-chief will make the invitation and the invited reviews editor will ensure the quality of the review. The first 10 printed pages of an invited review are published at no cost to the author. Authors of symposium papers and invited papers presented at the joint annual meeting of ADSA/American Society of Animal Science may be selected to contribute invited review papers.

Letters to the Editor. Short (300 words) letters to the editor on topics of concern to readers, including comment on publications with rebuttals from authors if needed, may be submitted to the editor-in-chief or to any of the editors. The letters should be titled, and the title and running head should include —Letter to the editor.|| Letters will be published at the discretion of the editor-in-chief. Authors of letters are subject to the same copyright release requirements as other authors. Letters are published at no charge to the author(s). Biographical Sketches. Occasionally, retiring or past scientists and educators should be subjects of biographical essays, both as a small honor to them and as an example and history for other readers. This section brings a sense of maturity and completeness to our field. Individuals who wish to submit biographical sketches should contact the editor-in-chief or one of the editors for additional instructions.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Authors should submit their papers online at Manuscript Central (<http://mc.manuscriptcentral.com/jds>). Detailed instructions for submitting

electronically are provided online (<http://mc.manuscriptcentral.com/jds>). Authors who are unable to submit online should contact Shauna Miller, Editorial Assistant, American Dairy Science Association, 1800 S. Oak St., Suite 100, Champaign, IL 61820 (shaunam@assoqh.org).

Copyright Agreement

Data (including graphs, figures, tables, and illustrations) must not have appeared in print elsewhere except as abstracts, local or regional field day reports, extension letters, or non-peer-reviewed, noncopyrighted proceedings of conferences. Material submitted to JDS should not be submitted for publication to popular magazines, company advertisements, or organizational proceedings until the author has received notification of acceptance of the manuscript. Before manuscripts are submitted, authors should have them read critically by others well versed in English to facilitate review, and the senior author should have authorization to publish. All coauthors should approve the manuscript before its submission to the journal.

The Manuscript Submission and Copyright Release form (published in issues of the journal and available from the journal web site: <http://www.journalofdairyscience.org/>) should be submitted for each paper; faxed copies are acceptable. The copyright agreement is included in the Manuscript Submission and Copyright Release Form; manuscripts cannot be published without this form. The corresponding author is responsible for obtaining the signatures of all coauthors. Authors who are not permitted to release copyright must still return the form with a statement of the reason for not releasing the copyright.

Requests to reproduce material published in JDS must be made through Elsevier's Rights Department (permissions@elsevier.com), online via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>), or via the Copyright Clearance Center (<http://www.copyright.com>). The Association grants to the authors the right of republication of their own material in any book, thesis, or dissertation of which they are authors or editors subject only to giving proper credit in the book to the original JDS publication. In addition, authors may post abstracts of manuscripts on the web at the time of submission. Once an author receives notification of acceptance, the peer-reviewed, pre-typesetting manuscript can be posted to the author's website. Authors may deposit their peer-reviewed, pre-typesetting manuscript into a repository upon payment of the open access fee (see page 4 of these instructions). For more information, read the —Terms and Conditionsll pages at <http://www.journalofdairyscience.org/>.

REVIEW OF MANUSCRIPTS

Upon submission to JDS, a manuscript is assigned to an editor, who enlists reviewers to assist in the evaluation of the manuscript. The review process is confidential, which infers a bond of trust among the authors, editor, and reviewers. The editor is trustee of the manuscript until the review process is completed and ensures that the review process is fair, thorough, and confidential. Reviewers are asked not to share the contents of the manuscript with anyone, except that they may ask a colleague to assist with the review with approval of the editor. Communication with authors

should only be through the editor. Reviewers should notify the editor of conflicts of interest that may compromise their ability to provide a fair and unbiased review. Moreover, they must recognize their responsibility in maintaining the confidential nature of the review. Authors should suggest names of appropriate reviewers when submitting the manuscript to streamline the review process and may list reviewers whom they consider unacceptable because of potential bias. These recommendations will be considered by the editor when assigning reviewers.

A reviewed paper returned to authors for revision must be returned to the editor within 6 wk. If not, the paper may be treated as a new submission. Under unusual circumstances, editors may extend the revision deadline beyond 6 wk.

The Journal of Dairy Science follows the guidelines of the Committee on Publication Ethics (COPE; publicationethics.org) and authors should refer to COPE for guidance on authorship and publication ethics.

PRODUCTION OF PROOFS

Accepted manuscripts are forwarded by the section editors to the editorial office for technical editing and composition. At this point the technical editor may contact the authors for missing information or figure revisions. The manuscript is then typeset, figures reproduced, and author proofs prepared.

Proofs

Author proofs will be sent by e-mail (in PDF format) to the corresponding author. Although the proof appears in a 2-column page format, it should be considered a galley proof; page layout may change when the article is paginated into an issue. Author proofs should be read carefully and checked against the typed manuscript, because responsibility for proofreading lies with the authors. Corrections may be returned by fax, mail, or e-mail. The Comments feature in Adobe Acrobat or Adobe Reader may be used to insert changes and comments within the proof PDF. For faxed or mailed corrections, changes to the proof should be made neatly and clearly in the margins of the proof. If extensive editing is required, corrections should be provided on a separate sheet of paper with a symbol indicating location on the proof. Changes sent by e-mail to the technical editor must indicate page, column, and line numbers for each correction to be made on the proof. Author queries should be answered on the galley proofs; failure to do so may delay publication. Proof corrections should be made and returned to the technical editor within 3 days of receipt. Publication cannot proceed until proofs are returned. Contact a technical editor at journals@assochnq.org if you have questions about the proof correction process.

Publication Costs

The Journal of Dairy Science® offers two options for publication of articles: Standard Page Charges and Open Access.

Standard Page Charges: The current charge for publication is \$85 per printed page in the journal for articles if at least one author is a professional member of ADSA. If no authors are ADSA members, the publication charge is \$140 per journal page. The cost to publish a color figure is \$995 (per figure) plus an offprint surcharge. There is charge for

all offprints and reprints. An offprint order form will be sent to the corresponding author with the author proof. Open Access: Under the open access (OA) policy, authors may choose to pay the OA fee in lieu of standard page charges when author proofs are returned so that their paper becomes freely available upon publication in an online issue. The OA fee is \$1750 if at least one author is a professional member of ADSA or \$3500 if no authors are ADSA members. Open access articles will be freely accessible through the journal's web site (<http://www.journalofdairyscience.org/>) at the time of publication. All other (non-OA) articles become freely available without a subscription 12 months after publication.

Articles for Deposit: Author(s) publishing articles under open access shall bear sole responsibility for meeting the specific posting requirements of their funders. Upon payment of the OA fee, authors may deposit the accepted (peer-reviewed pre-typeset only) manuscript in a repository. The embargo period before deposit in a repository is 12 months (or as specified by the funder) after publication in a journal issue. By signing the Manuscript Submission and Copyright Release Form at the time of submission, the authors agree to bear responsibility for payment of publication charges. Invoices for publication charges will be issued at the time an issue goes to press (approximately 2 weeks before an issue is published online). Payment is due within 30 days of receipt of the invoice. The preferred method of payment is by credit card, with credit card details submitted on the page charge form sent out with the author's proof. Payment may be made by check, drawn on a US bank. For payments by wire transfer, contact Vicki Paden at vickip@assochoq.org. Manuscripts will be withheld from publication for authors (and their co-authors) with past-due page charge invoice(s) until all prior payment obligations have been met.

Page Charge Waivers

Authors who must use personal funds to pay for page charges and for whom such charges would entail hardship can request of the editor-in-chief that these charges be waived, under the following conditions: 1) the request must be made in writing at the time the manuscript is submitted; 2) the request should be accompanied by a statement from a financial officer or other official from the institution with which the author is affiliated, indicating the reasons why page charges cannot be paid; and 3) if the waiver is granted, the author is expected to become a professional member of ADSA. Only one waiver will be granted per institution per twelve-month period. Authors who request waivers cannot order offprints. Full or partial waivers will be granted at the discretion of the editor-in-chief. Offprints may be ordered at an additional charge. Offprints will be shipped approximately 1 month after publication of the issue. Invoices for offprints will be sent to the author or institution shown on the page charge and offprint order form. There is a charge for all offprints.

MANUSCRIPT PREPARATION: STYLE AND FORM

General

Papers must be written in English. The text and all supporting materials must use American spelling and usage as given in Merriam-Webster's Collegiate Dictionary, 11th ed., Webster's Third International Dictionary, or

the Oxford American English Dictionary. Authors should follow the style and form recommended in *Scientific Style and Format*. The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers, 7th ed., published by the Council of Science Editors in cooperation with The Rockefeller University Press. Authors should prepare their manuscripts in Microsoft Word (.doc or .docx format) and upload them using the fewest files possible to facilitate the review and editing processes.

Preparing the Manuscript File Manuscripts should be typed double-spaced (in Microsoft Word) with lines and pages numbered consecutively, using Times New Roman font at 12 points. Special characters (e.g., Greek, math, symbols) should be inserted using the symbols palette available in this font. Complex math should be entered using MathType from Design Science (www.dessci.com). Note that equations created using the Equation Builder in Microsoft Word 2007 (and later versions) may not be compatible with earlier versions of Word or other software used in our composition system. Tables and figures should be placed in separate sections at the end of the manuscript (not placed within the text). Failure to follow these instructions may result in immediate rejection of the manuscript.

Interpretive Summary

All authors of JDS papers should provide an interpretive summary (IS) of 100 words or less that has been written for nonspecialist readers. That summary should consist of a title, the first author's last name, and a summary, which must include a sentence or two to summarize the project's expected importance, or its economic, environmental, and/or social impact (similar to the CRIS Progress Report Statement for those who must complete that form). Common abbreviations are permitted (those from the JDS Unrestricted list). The summary should appear on top of the first page of the manuscript, before the running head and title. Interpretive summaries will be peer reviewed. At publication, interpretive summaries will appear in a section at the beginning of the journal. The summaries are intended for an audience who may not be familiar with work in the author's area of expertise and for government or media researchers, and they will provide JDS readers with a brief overview of the research presented in each issue. Authors must make the summary readable by the general public. The goal is to make JDS research more visible to a wider audience and to emphasize its impact.

Headings

Major Headings. Major headings are centered (except ABSTRACT), all capitals, boldface, and consist of ABSTRACT, INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION (or RESULTS AND DISCUSSION),

CONCLUSIONS (optional), APPENDIX (optional), and REFERENCES.

First Subheadings. First subheadings are placed on a separate line, begin at the left margin, the first letter of all important words is capitalized, and the headings are boldface and italic. The heading is not followed by punctuation. Text that follows a first subheading should be in a new paragraph.

Second Subheadings. Second subheadings begin the first line of a paragraph. They are indented, boldface, italic, and followed by a period. The first letter of each important word should be capitalized. The text

follows immediately after the final period of the subheading.

Title Page

Across the top of the title page (first page), indicate a running head (abbreviated title) of 45 characters or less. The running head is centered and all uppercase.

Our Industry Today and Hot Topic serve as the running heads for those respective article types. Short Communications, Technical Notes, Invited Reviews, and Letters to the Editor use a running head beginning with the appropriate designation (i.e., SHORT COMMUNICATION:) followed by a short title.

The title should be in boldface; the first letter of the article title and proper names are capitalized and the remainder of the title is lowercase. The title should contain words or phrases used for indexing the article. Under the title, names of authors should be typed in mixed case (e.g., T. E. Smith or Tom E. Smith) and in boldface. Institutional addresses are displayed below the author names; footnotes referring from author names to displayed addresses should be symbols in the following order: *, †, ‡, §, #, ||, and ¶. The full name, mailing address, phone number, fax number, and email address of the corresponding author should appear directly below the affiliation lines on the title page. The corresponding author will be identified by a numbered footnote and e-mail address below the accepted line on the first page of the published article (e.g., 1Corresponding author: my.name@university.edu). Supplementary address information may be given in footnotes to the first page; use numerals for these footnotes. Acronyms (except USDA) for affiliations are discouraged unless the acronym is the official name. State or provincial postal code abbreviation is not included between city and zip code if the state or province is previously mentioned in the address (see example). Acceptable format is shown below:

J. E. Smith,* R. A. Jones,† and A. T. Peters‡

*Department of Animal Science, and

†Department of Dairy Science, University of Wisconsin,
Madison 53706

‡Department of Animal Science, Utah State University,
Logan 84321

Abstract. Abstracts should be limited to 2,500 keystrokes (i.e., characters plus spaces). The abstract should review important objectives, materials, results, conclusions, and applications as concisely as possible. The abstract disseminates scientific information through abstracting journals and is a convenience for readers. Open the abstract with objectives and make the abstract intelligible without reference to the manuscript. Use complete sentences and standard terms. Limit the use of abbreviations in the Abstract. Refer to the list on the inside front cover of JDS or Appendices 1 and 2 of this document for those terms that should be defined in the abstract. If a term is used fewer than 3 times in the abstract, it should be spelled out at each use.

Minimize the amount of data in the abstract and exclude statements of

statistical probability (e.g., $P < 0.05$). Exclude references to other work because the abstracts will appear online and in indexing services without the reference list.

Key Words. After the abstract, list 2 to 4 key words or phrases; they should be typed in lowercase letters and separated by commas. Key words should be singular (e.g., —dairy cowll not —dairy cowsll).

Abbreviations

Author-derived abbreviations should be defined at first use in the abstract, and again in the body of the manuscript, and in each table and figure in which they are used. The abbreviation will be shown in bold type at first use in the body of the manuscript. Refer to the Miscellaneous Usage Notes for more information on abbreviations.

Body of the Paper

The body of the paper should contain an introduction to the problem (questions, objectives, reasons for research, and related literature); materials, methods, experimental design, and procedures; and results, discussion, conclusions, and applications.

Results and discussion may be combined into a single section. If not, the results section should not contain discussion of previously published work. Results and references to tables and figures already described in the results section should not be repeated in the discussion section. The conclusions section (optional) should consist of one brief paragraph summarizing the main findings of the study.

Appendix

A technical appendix, if desired, shall follow the References section. The appendix may contain supplementary material, explanations, and elaborations that are not essential to other major sections but are helpful to the reader. Novel computer programs or mathematical computations would be appropriate. The appendix will not be a repository for raw data.

References

List only pertinent references. No more than 3 references should be needed to support a specific concept. Research papers and reviews should cite a reasonable number of references. Abstracts and articles from nonpeer-reviewed magazines and proceedings should be cited sparingly. Citation of abstracts published more than 3 yr ago is strongly discouraged.

Citations in Text. In the body of the manuscript, refer to authors as follows: Smith and Jones (1992) or Smith and Jones (1990, 1992). If the sentence structure requires that the authors' names be included in parentheses, the proper format is (Smith and Jones, 1982; Jones, 1988a,b; Jones et al., 1993) with citations listed chronologically (i.e., oldest first) and then alphabetically within a year. Where there are more than 2 authors of one article, the first author's

name is followed by the abbreviation et al. Work that has not been accepted for publication shall be listed in the text as follows: —J. E. Jones (institution, city, and state, personal communication). The author's own unpublished work should be listed in the text as —(J. Smith, unpublished data). Personal communications and unpublished data (including papers under review) must not be included in the references section.

References Section. To be listed in the references section, papers must be published or accepted for publication. Manuscripts submitted for publication can be cited as —unpublished data in the text. In the references section, references shall first be listed alphabetically by author(s) last name(s), and then chronologically. The year of publication follows the authors' names. As with text citations, two or more publications by the same author or set of authors in the same year shall be differentiated by adding lowercase letters after the date. The dates for papers with the same first author that would be abbreviated in the text as et al., even though the second and subsequent authors differ, shall also be differentiated by letters. All authors' names must appear in the reference section. Journals shall be abbreviated according to the conventional ISO abbreviations used by PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=journals>). A short list of journal title abbreviations is provided in Appendix 3 of this document. Oneword titles are spelled out. Inclusive page numbers must be provided and digital object identifiers (doi) should be provided whenever possible. Sample references are given below.

Journals

Buch, L. H., A. C. Sorensen, J. Lassen, P. Berg, J.-A. Eriksson, J. H. Jakobsen, and M. K. Sorensen. 2011. Hygiene-related and feed-related hoof diseases show different patterns of genetic correlations to clinical mastitis and female fertility. *J. Dairy Sci.* 94:1540–1551. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3137>.

Chapinal, N., A. M. de Passille, D. M. Weary, M. A. Hayes, B. J., P. J. Bowman, C. Chamberlain, K. Savin, C. P. van Tassell, T. S. Sonstegard, and M. E. Goddard. 2009. A validated genomewide association study to breed cattle adapted to an environment altered by climate change. *PLoS ONE* 4:e6676.

Vries, M. J., and R. F. Veerkamp. 2000. Energy balance of dairy cattle in relation to milk production variables and fertility. *J. Dairy Sci.* 83:62–69.

Jenkins, T. C., E. Block, and P. H. Morris. 2011. Potassium reduces the accumulation of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid and *trans*-18:1 in continuous cultures of mixed ruminal microorganisms regardless of dietary fat level. *J. Dairy Sci.* 94(E-Suppl. 1):509. (Abstr.)

VanRaden, P. M. 2008. Efficient methods to compute genomic predictions. *J. Dairy Sci.* 91:4414–4423.

Books

AOAC International. 2012. *Official Methods of Analysis*. 19th ed. AOAC International Gaithersburg, MD.

Goering, H. K., and P. J. Van Soest. 1970. *Forage Fiber Analyses*

(Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications). Agric. Handbook No. 379. ARS-USDA, Washington, DC.

Lengemann, F. W., R. A. Wentworth, and C. L. Comar. 1974. Physiological and biochemical aspects of the accumulation of contaminant radionuclides in milk. Pages 159–170 in *Lactation: A Comprehensive Treatise. Nutrition and Biochemistry of Milk/ Maintenance*. Vol. 3. B. L. Larson and V. R. Smith, ed. Academic Press, London, UK.

National Research Council. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

Conferences

Barbano, D. M. 1996. Mozzarella cheese yield: Factors to consider. Page 29 in *Proc. Wisconsin Cheese Makers Mtg. Ctr. Dairy Res., Univ. Wisconsin, Madison*.

National Mastitis Council. 1995. Summary of peer-reviewed publications on efficacy of premilking and postmilking teat disinfections published since 1980. Pages 82–92 in *Natl. Mastitis Council. Reg. Mtg. Proc., Harrisburg, PA. Natl. Mastitis Council, Inc., Madison, WI*.

Other

Biernoth, G., and W. Merk, inventors. 1985. Fractionation of milk fat using a liquified gas or a gas in the supercritical state. Unilever NV-PLC, assignee. US Pat. No. 4,504,503.

FASS. 2010. *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching*. 3rd ed. Federation of Animal Science Societies, Champaign, IL.

Interbull. 2008. Genetic evaluation. Direct longevity. Accessed Dec. 20, 2012. <http://www-interbull.slu.se/longevity/l-aug08.html>.

Kelly, M. G. 1977. Genetic parameters of growth in purebred and crossbred dairy cattle. MS Thesis. North Carolina State Univ., Raleigh.

US Department of Agriculture, Plant and Animal Health Inspection Service. 2004. Blood and tissue collection at slaughtering and rendering establishments, final rule. 9CFR part 71. *Fed. Regist.* 69:10137–10151.

Tables

The use of tables should be minimized. When used, tables should be self-explanatory and may be the most effective way to organize extensive data. Refer to *Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers* for more information on effective use of tables. Table 1 in this document may be used as an example.

Tables must be prepared using the table feature in Microsoft Word; tables prepared in other programs (e.g., Excel) or by using spaces, tabs, and hard returns will not convert accurately and errors can result. When possible, tables should be organized to fit across the page without running broadside. Be aware of the dimensions of the printed page when planning tables (use of more than 15 columns may create layout problems).

Place table number and title on the same line above the table (as shown in sample table). The table title does not require an ending period. Do not use vertical lines and use few horizontal lines. Bold and italic typefaces should not be used in tables. When it is necessary to do so, such use must be defined in a footnote. Limit the data field to the minimum needed for

meaningful comparison within the accuracy of the methods.

For each table, spell out the first use of abbreviations in parentheses or in numbered footnotes. Abbreviations should conform to journal style and be consistent with those used in the text. Avoid reference to other tables, figures, or text.

Footnotes to tables should be numerals. Each footnote should begin a new line (see sample table). For differences among means within a row or column, superscript letters should be used as appropriate sequentially (e.g., a, ab, b, c, cd) consistently from largest to smallest means. Probability may be indicated thus: †P < 0.10, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

Figures

To facilitate review, figures should be placed at the end of the manuscript (separated by section breaks). Each figure should be placed on a separate page, and identified by the last name of the first author and figure number. Figure captions should be typed (double spaced) on a separate page.

- **Figure size.** Prepare figures at final size for publication. Figures should be prepared to fit one column (8.9 cm wide), 2 columns (14 cm wide), or full-page width (19 cm wide).

- **Font size.** Ensure that all type within the figure and axis labels are readable at final publication size. A minimum type size of 8 points (after reduction) should be used.

- **Fonts.** Use Helvetica, Times New Roman, Arial, and the symbols palette within those fonts only.
- **Line weight.** For line graphs, use a minimum stroke weight of 1 point for all lines. If multiple lines are to be distinguished, use solid, long-dash, shortdash, and dotted lines. Avoid the use of gray or shaded lines, as these will not reproduce well. Lines with different symbols for the data points may also be used to distinguish curves.

- **Axis labels.** Each axis should have a description and a unit. Units may be separated from the descriptor by a comma or parentheses.

- **Shading and fill patterns.** For bar charts, use different fill patterns if needed; e.g., black, white, gray, diagonal stripes. Avoid the use of multiple shades of gray, as they will not be easily distinguishable in print. Remove unnecessary backgrounds and gridlines from graphs.

- **Symbols.** Identify curves and data points using the following symbols only: ●, ○, ▲, ▼, ×, +. Symbols should be defined in the figure caption or in a key on the figure (but not both).
- **File formats.** Figures can be submitted in Word, PDF, EPS, TIFF, and JPEG formats.

- **Grayscale figures.** If figures are to be reproduced in grayscale (black and white), submit in grayscale. Often color will mask contrast problems that are apparent only when the figure is reproduced in grayscale.

- **Color figures.** If figures are to appear in color in the print journal, files must be submitted in CMYK color (not RGB).

- **Resolution.** Minimum resolution is 300 dpi for grayscale and color figures, and 600 dpi for line art.

- **Photomicrographs.** Photomicrographs must have their unmagnified size designated, either in the caption or with a scale bar on the figure. Reduction

for publication can make a magnification power designation (e.g., 100×) inappropriate.

- **Captions.** The caption should provide sufficient information that the figure can be understood without excessive reference to the text. All author-derived abbreviations and symbols used in the figure should be defined in the caption.

- **General tips.** Avoid the use of three-dimensional bar charts, unless essential to the presentation of the data. Use the simplest shading scheme possible to present the data clearly. Ensure that data, symbols, axis labels, lines, and key are clear and easily readable at final publication size.

Color Charge. The cost to publish each color figure in the print journal is \$995; a surcharge for offprints will also be assessed. At the time of submission on Manuscript Central, authors will be asked to approve color charges for figures that they wish to have published in color in the print journal. Color versions of figures will be included in the online PDF and full-text article at no charge.

Online-Only Data Supplements. Authors are now able to present material online that cannot physically be displayed in the print journal (e.g., Excel files, video), or that might be cost-prohibitive (e.g., extra tables or large data sets), or that is too detailed for publication in the print issue. A note will appear in the print version that more material can be found online. A small charge may be levied for preparing data supplements; contact journal headquarters (journals@assoqh.org) for more information. Material posted online only must go through the review process, and consequently should be in an application or format easily accessible by most reviewers and readers.

Statistical Analysis

Biology should be emphasized, but the use of incorrect or inadequate statistical methods to analyze and interpret biological data is not acceptable. Consultation with a statistician is recommended. Statistical methods commonly used in the animal sciences need not be described in detail, but adequate references should be provided. The statistical model, classes, blocks, and experimental unit must be designated. Any restrictions used in estimating parameters should be defined. Reference to a statistical package without reporting the sources of variation (classes) and other salient features of the analysis, such as covariance or orthogonal contrasts, is not sufficient. A statement of the results of statistical analysis should justify the interpretations and conclusions. When possible, results of similar experiments should be pooled statistically. Do not report a number of similar experiments separately.

The experimental unit is the smallest unit to which an individual treatment is imposed. For group-fed animals, the group of animals in the pen or the paddock is the experimental unit; therefore, groups must be replicated.

Repeated chemical analyses of the same sample usually do not constitute independent experimental units. Measurements on the same experimental unit over time also are not independent and must not be considered as independent experimental units. For analysis of time effects, use time-sequence analysis.

Usual assumptions are that errors in the statistical models are normally and independently distributed with constant variance. Most standard methods are robust to deviations from these assumptions, but occasionally data transformations or other techniques are helpful. Most statistical procedures are based on the assumption that experimental units have been assigned to treatments at random. If animals are stratified by ancestry or weight or if some other initial measurement should be accounted for, the model should include a blocking factor, or the initial measurement should be included as a covariate. A parameter [mean, variance], which defines or describes a population, is estimated by a statistic. The term parameter is not appropriate to describe a variable observation, trait, characteristic, or measurement taken in an experiment.

Standard designs are adequately described by name and size (e.g., —a randomized complete block design with 6 treatments in 5 blocks). For a factorial set of treatments, an adequate description might be as follows:

—Tryptophan at 0.05 or 0.10% of the diet and niacin at 5, 10, or 20 mg/kg of diet were used in a 2 × 3 factorial arrangement in 5 randomized complete blocks, each block consisting of littermates. Note that a factorial arrangement is not a design; the term —design refers to the method of grouping experimental units into homogeneous groups or blocks (i.e., the way in which the randomization is restricted). Standard deviation refers to the variability in a sample or a population. The standard error (calculated from error variance) is the estimated sampling error of a statistic such as the sample mean. When a standard deviation or standard error is given, the number of degrees of freedom on which it rests should be specified. When any statistical value (as mean or difference of 2 means) is mentioned, its standard error or confidence limit should be given. The fact that differences are not —statistically significant is no reason for omitting standard errors. They are of value when results from several experiments are combined in the future. They also are useful to the reader as measures of efficiency of experimental techniques. A value attached by —± to a number implies that the second value is its standard error (not its standard deviation). Adequate reporting may require only 1) the number of observations,

2) arithmetic treatment means, and 3) an estimate of experimental error. The pooled standard error of the mean is the preferred estimate of experimental error. Standard errors need not be presented separately for each mean unless the means are based on different numbers of observations or the heterogeneity of the error variance is to be emphasized. Presenting individual standard errors clutters the presentation and can mislead readers.

For more complex experiments, tables of subclass means and tables of analyses of variance or covariance may be included. When the analysis of variance contains several error terms, such as in split-plot and repeated measures designs, the text should indicate clearly which mean square was used for the denominator of each F statistic. Unbalanced factorial data can present special problems. Accordingly, it is well to state how the computing was done and how the parameters were estimated. Approximations should be accompanied by cautions concerning possible biases.

Contrasts (preferably orthogonal) are used to answer specific questions for which the experiment was designed; they should form the basis for comparing treatment means. Nonorthogonal contrasts may be evaluated by Bonferroni *t* statistics. The exact contrasts tested should be described for the reader. Multiple-range tests are not appropriate when treatments are orthogonally arranged. Fixed-range, pairwise, multiple comparison tests should be used only to compare means of treatments that are unstructured or not related. In factorial treatment arrangements, means for main effects should be presented when important interactions are not present. Means for individual treatment combinations also should be provided in table or text so that future researchers may combine data from several experiments to detect important interactions. An interaction may not be detected in a given experiment because of a limitation in the number of observations. The terms *significant* and *highly significant* traditionally have been reserved for $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively; however, reporting the *P*-value is preferred to the use of these terms. For example, use —. . . we observed a difference ($P < 0.05$) between control and treated samples|| rather than —. . . we observed a significant ($P < 0.05$) difference between control and treated samples.|| When available, the observed significance level (e.g., $P = 0.03$) should be presented rather than merely $P < 0.05$ or $P < 0.01$, thereby allowing the reader to decide what to reject. Other probability (alpha) levels may be discussed if properly qualified so that the reader is not misled. Do not report *P*-values to more than 3 places after the decimal (2 significant digits are usually sufficient). Regardless of the probability level used, failure to reject a hypothesis should be based on the relative consequences of Type I and II errors. A —nonsignificant|| relationship should not be interpreted to suggest the absence of a relationship. An inadequate number of experimental units or insufficient control of variation limits the power to detect relationships. Avoid the ambiguous use of $P > 0.05$ to declare nonsignificance, such as indicating that a difference is not significant at $P > 0.05$ and subsequently declaring another difference significant (or a tendency) at $P < 0.09$. In addition, readers may incorrectly interpret the use of $P > 0.05$ as the probability of a beta error, not an alpha error.

Present only meaningful digits. A practical rule is to round values so that the change caused by rounding is less than one-tenth of the standard error. Such rounding increases the variance of the reported value by less than 1%, so that less than 1% of the relevant information contained in the data is sacrificed. In most cases, 2 or 3 significant digits (not decimal places) are sufficient.

Sensory Data

Sensory data should comply with “Invited Review: Sensory Analysis of Dairy Foods,” *Journal of Dairy Science* 90:4925–4937. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2007-0332>.

Nomenclature

Genes and Proteins. The journal recommends using internationally accepted symbols for genes and proteins; such symbols may be used without definition. Symbols for specific genes and proteins can be obtained by querying the gene database of PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

Nomenclature rules for humans, nonhuman primates, and livestock are available at <http://www.genenames.org>, and rules for mice and rats are at <http://www.informatics.jax.org/mgihome//nomen/strains.shtml>. Gene symbols should be shown in italics (e.g., *SERPINA14*) and proteins in roman text (e.g., SERPINA14). Gene symbols are generally shown in all uppercase letters (e.g., LHB), except in mice and rats, where only the first letter is capitalized (e.g., Lhb) Single Nucleotide Polymorphisms. The increasing number of SNP association studies and the improvements in bovine genome annotation require a standardized SNP nomenclature for unequivocal and correct SNP identification. Additionally, information regarding the SNP investigated should be easily accessible in a publicly available database. Therefore, all relevant SNP included in a study should be listed with their unique RefSNP (rs) or submitted SNP (ss) number (if rs number is not yet available) as indicated in the public domain NCBI dbSNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). If the SNP investigated do not yet have an entry in the NCBI dbSNP database, the authors of the manuscript are responsible for submitting all the required information to NCBI (see <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) for depositing the SNP into the database and obtaining a unique ss number for the SNP. In the text of the manuscript, use the rs/ss number of the SNP or an alternative standardized nomenclature.

Microorganisms. All microorganisms must be named by genus and species. The name of the genus must appear in full the first time that the microorganism is cited in the abstract, in the body of the paper, and in each table and figure legend. Thereafter, the genus can be abbreviated by its first initial unless it will be confused with other microorganisms cited in the paper, in which case each genus should be abbreviated to use enough letters to avoid confusion (e.g., *Strep.* vs. *Staph.*). The formal, binomial names of all microorganisms should be in italics. Specific strain designations and numbers should be used when appropriate. Authorities are not required.

For microorganisms that are genetic variants of a parent strain, the genotypic and phenotypic properties should be cited according to the procedures described by Demerec et al. (1966) in *Genetics* 54:61–76. Phenotypes should be identified by 3 letters; the first is capitalized. Genotypes should be identified by 3 lowercase italic letters. Superscript plus (+) signs are used to refer to a wild-type. The serial isolation number is placed after the locus symbol for mutations.

The delta symbol is used to indicate deletions. Nomenclature for bacterial plasmids should be cited according to Novick et al. (1976) in *Bacteriological Reviews* 40:168–189. Enzymes. Mention of an enzyme should include the EC number.

In Vitro Antimicrobial Susceptibility Tests

Please refer to the JDS policy in Appendix 4 of this document.

Miscellaneous Usage Notes

Abbreviations. Abbreviations should not be used in the title, key words, or to begin sentences, except when they are widely known throughout science (e.g., DNA, RNA) or are terms better known by their abbreviation (e.g., IgG, CD). Abbreviations may be used in heads within the paper if they have been first defined within the text. The inside front cover of every

issue of the journal lists abbreviations that can be used without definition. The list is subject to revision at any time, so authors should always consult the most recent issue of the journal (or the updated list at <http://www.journalofdairyscience.org>) for relevant information. Abbreviations are allowed when they help the flow of the manuscript; however, excessive use of abbreviations can confuse the reader. The suitability of abbreviations will be evaluated by the reviewers and editors during the review process and by the technical editor during editing. As a rule, author-derived abbreviations should be in all capital letters. Terms used fewer than 3 times after first use must be spelled out in full rather than abbreviated. Do not use capitalized whole words (e.g., CORN) as abbreviations, or single letter abbreviations that could be confused with chemical elements (e.g., P, C, S). All terms are to be spelled out in full with the abbreviation following in bold type in parentheses the first time they are mentioned in the main body of the text. Abbreviations shall be used consistently thereafter.

The abstract, text, each table, and each figure must be understood independently of each other. Therefore, abbreviations shall be defined within each of these units of the manuscript.

Plural abbreviations do not require —s. Chemical symbols and 1-letter and 3-letter abbreviations for amino acids do not need definition. Bacterial genus names are abbreviated according to the guidelines recommended in *Scientific Style and Format* (7th ed.), and the abbreviated form should not be shown in bold at first use. Units of measure, except those in the standard JDS abbreviation list, should be abbreviated according to standard SI usage and do not need to be defined. See Appendix 2 for a list of commonly used terms.

International Words and Phrases. Non-English words in common usage (i.e., given in recent editions of standard dictionaries) will not appear in italics (e.g., *in vitro*, *in vivo*, *ad libitum*, *in situ*, *a priori*). However, genus and species of plants, animals, or bacteria and viruses should be italicized. Authors must indicate accent marks and other diacriticals on international names and institutions. German nouns shall begin with capital letters.

Capitalization. Breed and variety names are to be capitalized (e.g., Holstein, Danish Red). Trademarked or registered names should be capitalized, but no TM or ® symbols should be used. Proper nouns should be capitalized

Numbers and Units. The Journal of Dairy Science uses the Council of Science Editors' number style given in the seventh edition of *Scientific Style and Format*.

Numbers less than 1 shall be written with preceding zeros (e.g., 0.75). All numbers shall be written as digits; a comma separator must be used in numbers greater than 999. Measures must be in the metric (SI) system; however, US equivalents may be given in parentheses. Units of measure not associated with a numeric value must be written out rather than abbreviated (e.g., lysine content was measured in milligrams per kilogram of diet) unless used parenthetically. Measures of variation must be defined in the Abstract and in the body of the paper at first use.

General Usage. Note that —and or ll is not permitted; choose the more

appropriate meaning or use $\frac{x}{y}$ or y or both. Use the slant line only when it means $\frac{x}{y}$ with numbered units of measure or $\frac{x}{y}$ divided by y in equations.

Use only one slant line in a given expression: e.g., g/cow per day. The slant line may not be used to indicate ratios or mixtures.

Use —to instead of a hyphen to indicate a range of values in text; an en-dash may be used to indicate a range in parenthetical text or tables.

Insert spaces around all signs (except slant lines) of operation ($=$, $-$, $+$, \times , $>$, or $<$) when these signs occur between 2 items.

Items in a series should be separated by commas: e.g., a, b, and c.

Restrict the use of —while and —since to meanings related to time. Appropriate substitutes include —and, —but, or —whereas for —while and —because or —although for —since.

Commercial Products. The use of names of commercial products should be minimized. When a commercial product is being tested as part of the experiment, the manufacturer and location should be given parenthetically at first mention in text, tables, and figures, but, when possible, the generic name should be used thereafter. Only generic names should be used in article titles. Trademark symbols and registration marks should not be used and will be removed. Avoid describing a method as —per manufacturer’s instructions. If the product goes out of production, the method will be lost to readers. Many products come with literature references; try to use references that can be found by other researchers to describe a method being used.

Supplemental Information

The following information is available online and updated regularly.

Please refer to these pages when preparing a manuscript for submission.

Journal Title Abbreviations. A list of standard abbreviations for common journal titles and words used in citations is available in Appendix 3.

SI Units. The following site (National Institute of Standards and Technology) provides a comprehensive guide to SI units and usage: <http://physics.nist.gov/cuu/Units/index.html>.

Figure and Table Preparation Guidelines. Current information on figure and table preparation can be found at <http://www.journalofdairyscience.org/>.

Manuscript Central Instructions. Manuscripts are submitted at <http://mc.manuscriptcentral.com/jds>. Full user instructions for using the Manuscript Central system are available at <http://mc.manuscriptcentral.com/jds/index.html?mode>

VITA

Nome: Giovani Jacob Kolling.

Filiação: Antonio Valdemar Kolling e Irene Maria Lentz Kolling.

Data de nascimento: 21/09/1985.

Local de nascimento: Cerro Largo/RS, Brasil.

Formado no Colégio Estadual João de Castilho, em Salvador das Missões, tanto no ensino fundamental como no ensino médio. Médico Veterinário formado pela Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ) no ano de 2010. Mestre em Ciências Veterinárias, área Medicina Veterinária Preventiva – Inspeção de Produtos de Origem Animal, pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2012) e ingressante no curso de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (UFRGS) no ano de 2012, sob orientação da Professora Doutora Vivian Fischer, na área de nutrição e alimentação de ruminantes.

