

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO NUTRICIONAL E COMPORTAMENTAL DE
GARROTES NELORE RECEBENDO DIFERENTES DO-
SES DE CRINA RUMINANTS® EM SUPLEMENTAÇÃO
PROTEICA EM SISTEMA DE PASTEJO

Acadêmica: Yasmin dos Santos Falcão

Aquidauana-MS
Agosto/2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO NUTRICIONAL E COMPORTAMENTAL DE
GARROTES NELORE RECEBENDO DIFERENTES DO-
SES DE CRINA RUMINANTS® EM SUPLEMENTAÇÃO
PROTEICA EM SISTEMA DE PASTEJO

Acadêmico (a): Yasmin dos Santos Falcão
Orientador (a): Prof Dr. Henrique Jorge Fernandes

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado-Pantanal, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia”

Aquidauana-MS
Agosto/2019



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Área de Concentração: Produção Animal

YASMIN DOS SANTOS FALCÃO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
concentração em Produção Animal no Cerrado-Pantanal, como requisito par
do grau de Mestre em Zootecnia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 15/08/2019.

Dr. Henrique Jorge Fernandes, UEMS

Dr. Urbano Gomes Pinto de Abreu, EMBRAPA

Dra. Aline Gomes da Silva, UFMS

Dedico este trabalho, e todas as minhas conquistas ao meu amado e saudoso pai Luiz Gonzaga Falcão “In Memoriam”. “Para quem tem Fé em DEUS não existe muralha, montanha ou pedregulho algum que impeça de vencer”. (Luiz Gonzaga Falcão; 2011).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Grande Criador do Universo, por ter me dado o dom da vida, me sustentado nos momentos onde pensei que não teria forças para seguir, por me carregar no colo quando minhas pernas não sustentavam meu corpo.

Agradeço aos meus pais Luiz Gonzaga Falcão (in memoriam), e a Maria Margarida dos Santos Falcão, pelo apoio para que meus sonhos fossem possíveis. E em especial agradeço ao meu amado pai (meu veio), pelos valores passados através do seu amor, proteção, correção e educação; por vibrar a cada conquista por menor que fosse e por ensinar o que é ter força, além de me mostrar como superar cada obstáculo e ensinar o que é ter Fé. Ao senhor, minha eterna gratidão.

Com a mesma importância agradeço a minha amada mãe por superar cada adversidade que a vida nos presenteou nos últimos anos, por crescer junto com os filhos a cada dificuldade encontrada, pela confiança criada a cada dia, e apoio durante todos esses anos, pela proteção, mais principalmente por entender que com o passar dos anos os filhos criam asas e que as vezes o melhor a fazer é dizer “Vá com Deus meu bebê”.

Aos meus irmãos, Thays Haiumy dos Santos Falcão, por muitas vezes confiar no meu potencial quando nem eu mesma acreditava, por me cuidar sempre, e nunca me deixar desistir, mesmo que para isso tivesse que deixar seus objetivos de lado; e Luiz Hamyn dos Santos Falcão agradeço-lhe simplesmente por existir e me fazer ser uma pessoa melhor, e também por me ensinar o que é ter coragem, mesmo com tão pouca idade. Agradeço a minha

família por aguentar meus momentos de raiva e insatisfação, por aguentarem meus “bicos”. Eu amo vocês. Não menos importante agradeço a Vicky, anjo de quatro patas por me roubar sorrisos nos piores dias, por ser minha fiel escudeira e estar junto a mim todos os momentos, com o seu amor incondicional.

Agradeço aos meus avós maternos e paternos, por todo amor e proteção, e a todos os familiares que de alguma forma contribuíram para que este sonho fosse possível.

Agradeço infinitamente ao Professor Henrique Jorge Fernandes, por toda sua paciência, orientação, companheirismo, atenção, cuidado confiança e correções durante estes anos, e principalmente por não me deixar desistir nos momentos difíceis, agradeço pelo exemplo de profissional e pessoa que é, agradeço por ser mais que um orientador, por ser um pai que a Zootecnia me deu. Obrigada por absolutamente tudo.

Agradeço ao meu namorado Josivaldo, por me amparar, acolher, apoiar, me estimular ser um ser humano melhor a cada dia, a lutar todos os dias pelos meus sonhos, a nunca desistir, olhar sempre pelo lado bom das coisas, sou grata a deus por ter você na minha vida e por dividi-la com você, te amo.

Agradeço a todos os professores que fizeram parte destes meus dez anos de UEMS, professores do CEPA, Geraldo Garcia e ao corpo docente dos cursos de graduação e Pós graduação da Zootecnia, obrigada por todos os conhecimentos e dedicação para a minha formação, agradeço aqueles professores que me corrigiram direta ou indiretamente, sei que suas correções eram para o meu aprimoramento e crescimento profissional e pessoal. Aos senhores, o meu muito obrigada.

À Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul e a todos os funcionários da UEMS, que sempre me auxiliavam da melhor forma possível, em especial aos funcionários Sr. Fermiano, Sr^a. Alcione e ao Gustavo por sempre me ajudarem durante estes 10 anos. Muito Obrigada UEMS por essa caminhada, anos de alegrias, tristezas, risadas, choros, enfim por absolutamente tudo.

Agradeço também aos colaboradores do grupo de pesquisa Ruminantes – MS, que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse executado com êxito, Douglas, Iago, Gabriel, Diefer e todos aqueles que passaram ao longo dos anos, sem a contribuição de vocês nada seria possível.

Em separado agradeço a Neia, Vinicius, Gean, Lucy Mery e Marco Aurélio, por mais que os anos passem, jamais esquecerei que vocês me ensinaram como se trabalha em equipe, me mostraram que mesmo que a coisa estivesse feia no final ela vai dar certo, minha gratidão continua e tais ensinamentos levarei para a vida.

Em especial agradeço a Néia, por todos os ensinamentos passados, tanto profissionais quanto pessoais, por me mostrar o que a vida científica não é brincadeira, por ser um exemplo a ser seguido, pelas correções, pela paciência, pelas risadas, e por todos os momentos vividos, sabe o quanto é importante em minha vida. Obrigada por ter topado este desafio comigo, sem seu apoio este trabalho não seria possível. À Josilaine por todo o apoio e paciência durante a execução deste experimento, sem seu apoio e parceria, eu não conseguiria. Muito Obrigada.

Agradeço também a Jéssica, um novo anjo que Deus colocou em minha vida, em pouco tempo se tornou muito mais do que uma companheira de equipe, uma amiga que pegou na minha mão e disse “vamos dar conta, calma um leão por dia”. Sem você e o lago eu realmente não teria chegado até aqui. O meu sincero muito obrigada.

Agradeço a Aline Gomes por todo o experimento, apoio técnico e emocional durante a execução das análises, muito obrigada.

Com profunda gratidão agradeço os meus amigos da vida Néia, Bruna (migs), Thais (nega), e Thiago por me ouvir, apoiar, criticar, rir, chorar e sempre amenizar o fardo que muitas vezes parecia pesado demais.

Agradeço a toda equipe da Fazenda Caçadinha que me receberam e acolheram como uma grande família. Obrigada! Vocês tornaram tudo mais fácil.

Agradeço a FUNDECT, pela concessão de bolsa e auxílio na pesquisa.

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa em nome dos professores Ednio Detteman, Luciana Rennó e Sebastião Valadares por ceder espaço em seus laboratórios e apoio técnico para as análises necessárias, agradeço também aos técnicos de laboratórios por toda a ajuda. Muito obrigada.

Agradeço a empresa DSM pelo apoio, durante toda a execução do trabalho desde as atividades de campo até a produção dos artigos, em especial

agradeço ao Guilherme por todos os ensinamentos técnicos, pelas cobranças que me fizeram crescer, sei que ganhei um amigo, muitíssimo obrigada.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado. Muito obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	02
1 - INTRODUÇÃO.....	02
2 - REVISÃO DE LITERATURA.....	03
3 - OBJETIVOS.....	10
3.1. OBJETIVO GERAL.....	10
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
4 – REFERÊNCIAS.....	11
CAPÍTULO 2 - LEVELS OF CRINA RUMINANTS IN PROTEIN SUPPLEMENTATION ON THE NUTRITIONL CONDITIONS OF GRAZING NELLORE STEERS	16
ABSTRACT.....	16
INTRODUCTION.....	16
MATHERIALS AND METHODS.....	17
RESULTS.....	22
DISCUSSION.....	24
CONCLUSION.....	29
LITERATURE CITED.....	30
CAPÍTULO 3 LEVELS OF CRINA RUMINANTS® IN PROTEIN SUPPLEMENTATION ON THE BEHAVIOR OF GRAZING NELLORE STEERS	45
ABTRACT.....	45
INTRODUCTION.....	45
MATHERIALS AND METHODS	46
RESULTS.....	49
DISCUSSION.....	50
CONCLUSION.....	53
LITERATURE CITED	53
CAPITULO 4- CONSIDERAÇÕES FINAIS	60

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 LEVELS OF CRINA RUMINANTS IN PROTEIN SUPPLEMENTATION ON THE NUTRITIONL CONDITIONS OFOF GRAZING NELLORE STEERS

Table 1 – Composition of the pasture and the supplements used in experiment.....	35
Table 2 – Daily intake of steers receiving protein supplementation with different levels of Crina Ruminants®.....	36
Table 3 – Ruminal volatile fatty acids (VFA) of steers receiving protein supplementation with different levels of Crina Ruminants®.....	38
Table 4 – Coefficient of digestibility (CD,%) of the diet components, TDN (%DM) and Digestible Organic Matter (DOM, %DM) of the diet of steers receiving protein supplementation with different levels of Crina Ruminants®.....	39
Table 5 - Blood metabolites of steers receiving protein supplementation with different levels of Crina Ruminants®	40
Table 6 – Urine urea nitrogen (UUN), microbial crude protein production (mCP), microbial crude protein production efficiency (mCPef) of steers receiving protein supplementation with different levels of Crina Ruminants®.....	41

CAPÍTULO 3 LEVELS OF CRINA RUMINANTS® IN PROTEIN SUPPLEMENTATION ON THE BEHAVIOR OF GRAZING NELLORE STEERS

Table 1- Composition of the pasture and the supplements used in Experiment.....	56
Table 2 – Number of daily visits and time spent in front of feeders and water drinkers by steers receiving protein supplementation with different levels of Crina Ruminants® or Monensin.....	57
Table 3– Behavior of steers receiving protein supplementation with different levels of Crina Ruminants® or Monensin.....	58

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 LEVELS OF CRINA RUMINANTS IN PROTEIN SUPPLEMENTATION ON THE NUTRITIONL CONDITIONS OFOF GRAZING NELLORE STEERS

Figure 1– Pasture availability during the experimental period	42
Figure 2 – Ruminal pH of Steers receiving protein supplementation with different levels Crina Rtuminants® at different hours of the day	43
Figure 3 – Ruminal ammonium nitrogen (RAN) of steers receiving protein supplementation with different levels of Crina Ruminants® at different hours of the day	44

CAPÍTULO 3 LEVELS OF CRINA RUMINANTS® IN PROTEIN SUPPLEMENTATION ON THE BEHAVIOR OF GRAZING NELLORE STEERS

Figure 1– Pasture availability during the experimental period	59
---	----

RESUMO

Objetivou-se avaliar diferentes doses de Crina Ruminants® em suplementos proteicos para novilhos em pastejo. Para isso, dois experimentos simultâneos foram realizados. No Experimento 1, cinco novilhos da raça Nelore, com peso médio de 395 kg, fistulados no rúmen, foram alojados em piquetes de B. brizantha contendo alimentadores automáticos e bebedouros (Intergado®). Os animais receberam um dos cinco tratamentos adicionados ao suplemento: Controle (sem aditivos), 400, 800, 1.200 e 1.600 mg de Crina® Ruminantes/100 kg PC (CRINA). Os tratamentos foram atribuídos aos animais de acordo com um delineamento quadrado latino 5 x 5. Avaliou-se o consumo, a produção de AGV e pH ruminal, nitrogênio amoniacal ruminal, digestibilidade, metabólitos sanguíneos, nitrogênio ureico urinário e produção de proteína bruta microbiana. No Experimento 2, foram utilizados 162 novilhos da raça Nelore, com peso corporal inicial de $323 \pm x$ kg, que foram alojados em piquetes semelhantes ao do Experimento 1, contendo alimentadores automáticos e bebedouros (Intergado®). Os animais receberam um dos seis tratamentos adicionados ao suplemento: Controle (sem aditivos), Monensina (30 mg Monensina®/100 kg PC) e 400, 800, 1.200 e 1.600 mg de Crina® Ruminantes/100 kg PC. Foram utilizados dados comportamentais dos alimentadores automáticos e dos bebedouros (durante todo o período experimental), e da observação do comportamento diurno do animal em oito dias não sequenciais, em dois meses distintos. Todos os dados do sistema Intergado® (neste caso, considerando os dados semanais como medidas repetidas) foram analisados segundo um delineamento inteiramente casualizado. O comportamento diurno foi analisado segundo o delineamento em blocos casualizados, considerando o mês como bloco e o dia como medidas repetidas. Para os dados dos parâmetros ruminais, as medidas foram analisadas como medidas repetidas. Uma vez que efeito significativo do tratamento foi observado, a média de cada tratamento com CRINA foi comparada aos tratamentos Controle e Monensina por um teste de Dunnet. Os efeitos linear e quadrático do nível de CRINA também foram avaliados. Utilizou-se o PROC MIXED da SAS University com alfa de 5%. Os animais que receberam Monensina apresentaram ($P < 0,05$), maior tempo de alimentação e mais tempo

deitado. O nível de Crina Ruminantes® que maximiza ($P < 0,05$) a síntese de proteína microbiana ruminal e nitrogênio sérico ureico também é semelhante ao nível que minimiza o tempo nos alimentadores, aumenta o tempo de pastejo e reduz o tempo de repouso, que é cerca de 1.000 mg/100 kg de peso corporal de CRINA.

Palavras-chave: bovinos de corte, óleos essenciais, produção de pasto

ABSTRACT

The objective was to evaluate different doses of Crina Ruminants® in protein supplements for grazing steers. Two simultaneous experiments were carried out. In Experiment 1 five Nellore steers, with an average body weight of $395 \pm 30,6$ kg, fistulated in the rumen, were housed in paddocks of *B. brizantha* containing automatic feeders and drinkers (Intergado®). The animals received one of five treatments in the supplement: Control (without additives), 400, 800, 1,200 and 1,600 mg of Crina Ruminants®/100 kg PC (CRINA). The treatments were assigned to the animals according to a 5 x 5 Latin square design. Intake, VFA, ruminal pH and ruminal ammonia nitrogen, digestibility, blood metabolites, urinary urea nitrogen and crude microbial protein production were evaluated. In Experiment 2, 162 Nellore steers, with an initial body weight of 323 ± 20.6 kg, were housed in a similar paddocks containing automatic feeders and drinkers (Intergado®). The animals received one of the six treatments in the supplement: Control (without additives), Monensin (30 mg Monensin®/100 kg PC) and 400, 800, 1,200 and 1,600 mg of Crina Ruminants®/100 kg PC. Behavioral data from feeders and drinkers were used (throughout the experimental period) and the observation of the daytime behavior of the animal on eight non-sequential days on two different months. All data from the Intergado® system (in this case, considering the weekly data as repeated measures) were analyzed according to a completely randomized design. The diurnal behavior was analyzed according to the randomized block design, considering the month as a block and the day as repeated measures. For the ruminal parameters data, the measurements were considered as repeated measures. Since a significant treatment effect was observed, the mean of each CRINA treatment was compared to the Control and Monensin treatments by a Dunnett test. Additionally, linear and quadratic effects of the CRINA level were evaluated. The MIXED PROC from SAS University was used at alpha 5%. Animals that received Monensin presented ($P < 0.05$), longer feeding time and more time lying down. The level of Crina ruminants® ($P < 0.05$) that maximizes ruminal microbial protein synthesis and serum urea nitrogen is also similar to the level that minimizes feeder time, increases grazing

time, and reduces resting time, which is about 1,000 mg/100 kg body weight of Crina.

Key words: beef cattle, essential oils, pasture production

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A pecuária é uma das atividades mais importantes do agronegócio nacional, representando, em 2015, 6,82% do PIB brasileiro (CEPEA, 2016). A maioria do rebanho do país é criado a pasto, o que é uma importante característica da pecuária brasileira (FERRAZ; FELÍCIO, 2010).

Entretanto, animais produzidos exclusivamente em pastagens não conseguem expressar todo o seu potencial, apresentando baixas taxas de ganho ao longo do ano, em decorrência de vários fatores (SOUZA, 2011). Isso ocorre por conta da estacionalidade e variação qualitativa da forragem (PAULINO, 1999).

Neste contexto, o uso de suplementação tem-se destacado como uma das alternativas disponíveis, sendo capaz de complementar a dieta dos animais e promover aumentos em seu desempenho, além de auxiliar no manejo da pastagem (Reis et al., 2014). Adicionalmente, o uso de aditivos melhora a eficiência dos alimentos, estimulam também o crescimento ou beneficiam de alguma forma, a saúde e o metabolismo dos animais (Reis et al., 2011).

A monensina é um ionóforo comumente usados como aditivo alimentar na produção de ruminantes (MOURO et al., 2006), o seu uso tem o intuito de melhorar o ganho médio diário e a eficiência alimentar dos bovinos (BERTIPAGLIA, 2008). No Brasil, a monensina sódica tem seu uso liberado para ser incluído em dietas para ruminantes em crescimento, terminação e vacas lactantes (OLIVEIRA et al., 2005). Entretanto, a sua utilização foi banida na União Européia.

A União Europeia possui um papel fundamental sobre a formação de opinião dos consumidores, sendo aceitável admitir que outros consumidores mundiais sejam influenciados a seguir esta decisão em futuro próximo e assim restringir ainda mais a utilização destes aditivos.

Segundo Mingoti (2013), existe um crescente interesse científico por alternativas que mimetizem os efeitos dos ionóforos, e que sejam mais seguras ao consumo humano e com aceitação pela sociedade consumidora. Assim, os óleos essenciais surgiram com uma alternativa natural ao uso de an-

36 tibióticos para alimentação animal (CALSAMIGLIA et al., 2007).

37 O principal efeito dos óleos essenciais é diminuição da degradação pro-
38 teica ruminal. Segundo Calsamiglia et al. (2010), isto reduziria o custo de ali-
39 mentação desses animais, de maneira a melhorar o desempenho animal e re-
40 duzir a poluição ambiental causada pela ureia (NH₃).

41 Apesar dos trabalhos que já avaliaram a inclusão de óleos essenciais
42 na alimentação de ruminantes, um ponto que muito ainda se questiona é o ní-
43 vel ideal a ser utilizado destes aditivos, a partir da resposta produtiva que se
44 quer alcançar. Parte destes questionamentos envolve ainda a falta de dados
45 sobre aspectos da resposta animal ao uso dos óleos essenciais em diferentes
46 condições de produção. Entre estas condições, podemos destacar a carência
47 de trabalhos avaliando o uso destes aditivos na dieta de bovinos em pastejo,
48 sistema base da produção de carne no Brasil (PAULINO et al., 2008).

49

50 **2. REVISÃO DE LITERATURA**

51

52 O sistema agroindustrial da pecuária é uma das atividades mais impor-
53 tantes do agronegócio nacional, em 2015, representou 6,82% do PIB brasileiro
54 (CEPEA, 2016). As atividades relacionadas à pecuária bovina de corte possu-
55 em destaque, dado que o País possui o maior rebanho comercial do mundo,
56 sendo o segundo maior produtor e o maior exportador mundial de carne bovina.
57 (CARVALHO & ZEN; 2017).

58 A atividade pecuária realizada dentro das fazendas foi responsável pela
59 geração de US\$ 31,4 bilhões, o que equivale a 18,7% do PIB gerado pela ca-
60 deia pecuária (ABIEC, 2011). Uma característica de grande importância da pe-
61 cuária brasileira é ter a maioria de seu rebanho criado a pasto (FERRAZ; FE-
62 LÍCIO, 2010). O uso de pastagens representa a forma mais prática e econômi-
63 ca para a alimentação de bovinos. No entanto, animais mantidos exclusivamen-
64 te em pastagens não conseguem expressar todo o seu potencial genético,
65 atingindo baixas taxas de ganho ao longo do ano, em função de vários fatores
66 (SOUZA, 2011).

67 Apesar de nos últimos anos ter aumentado significativamente o número
68 de animais terminados em confinamento no país, a maior parte do gado brasi-
69 leiro ainda é produzida em regime extensivo em pastagens tropicais, possuindo

70 longo ciclo de produção e sendo grande parte animais zebuínos (SOUZA,
71 2011).

72 Considerando este cenário, a produtividade animal nos trópicos ainda é
73 baixa, devido à estacionalidade e variação qualitativa da forragem, por esta
74 razão, algumas distorções associadas à sazonalidade da produção e do valor
75 nutritivo das forrageiras necessitam ser corrigidas (PAULINO, 1999).

Assim sendo, torna-se imprescindível o desenvolvimento e a adoção de tecnologias que favoreçam o incremento tanto na produtividade como na eficiência econômica de produção (MACITELLI et al., 2007). De acordo com Reis et al. (2014), a utilização de suplementos alimentares tem-se destacado entre as alternativas disponíveis, de forma a complementar a dieta dos animais e promover aumento do desempenho, além de auxiliar no manejo da pastagem.

Pode-se definir a suplementação como o ato de adicionar os nutrientes deficientes na pastagem, relacionando-os com a exigência dos animais em pastejo (REIS et al., 1997).

76 A suplementação dos animais surge como uma forma de corrigir possí-
77 veis ou reais deficiências no valor nutritivo das forrageiras, tanto como fonte
78 adicional de nutrientes (PAULINO et al., 2006), como para melhorar o aprovei-
79 tamento da forragem. Essa ferramenta possibilita aumentar a taxa de lotação,
80 melhorar a fermentação ruminal, possibilitando um aumento no desempenho
81 dos animais (REIS et al., 2012).

82 O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) define adi-
83 tivo como: substância intencionalmente adicionada ao alimento com a finalida-
84 de de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades, desde que não
85 prejudique seu valor nutritivo (MARINO & MEDEIROS, 2015). Os aditivos são
86 usados para melhorar a eficiência dos alimentos, estimular o crescimento ou
87 beneficiar de alguma forma, a saúde e o metabolismo dos animais (REIS et al.,
88 2011).

89 De acordo com Segabinazzi (2008), a otimização do desempenho dos
90 ruminantes através da manipulação dos padrões da fermentação ruminal é ne-
91 cessária, principalmente para que as alterações na composição da microbiota
92 do rúmen potencializem a síntese de produtos oriundos da digestão dos ali-
93 mentos, tornando-se mais eficiente e com menores perdas de energia.

94 O uso das substâncias antimicrobianas com finalidade de aditivo zootéc-
95 nico melhorador de desempenho na alimentação animal iniciou-se na década
96 de 50. Estes podem ser divididos em dois grupos, ionóforos e não ionóforos, de
97 acordo com o seu modo de ação (VENDRAMINI, 2014).

98 Como dito anteriormente, os antibióticos ionóforos tem tido muito suces-
99 so na redução de perdas de energia e proteína no rúmen além de aumentar o
100 desempenho dos animais. Este aumento do desempenho dos animais relacio-
101 na-se principalmente com a melhoria da eficiência energética, devido ao au-
102 mento da digestibilidade dos alimentos; ao aumento da produção do ácido pro-
103 piônico, com consequentemente redução da relação acetato/propionato; dimi-
104 nuição da produção de metano e ácido láctico; e por reduzir a perdas de prote-
105 ína e aminoácidos que seriam potencialmente fermentados no rúmen (RUS-
106 SELL & STROBEL, 1989).

107 Segundo Vendramini (2014) o uso de ionóforos é considerado um ótimo
108 exemplo de como a manipulação da fermentação ruminal auxilia no aumento
109 do desempenho animal, contudo a legislação classifica os ionóforos como anti-
110 bióticos, aumentando cada vez mais as críticas da sociedade sobre o uso do
111 mesmo.

112 Os ionóforos monensina sódica e lasalocida, são consideradas tanto an-
113 timicrobianas quanto coccidiostáticas, desta forma tendo seu uso autorizado
114 em dietas de ruminantes no Brasil (MAPA, 2008). A monensina é um ionóforo
115 comumente utilizado como aditivo alimentar na produção de animais ruminan-
116 tes (MOURO et al., 2006), sendo utilizado com o intuito de melhorar o ganho
117 médio diário e a eficiência alimentar dos bovinos (BERTIPAGLIA, 2008). Ainda
118 segundo este autor, sua utilização em animais em pastejo deve estar vinculada
119 à preocupação de se melhorar o processo digestivo ou minimizar as perdas de
120 nutrientes. Para bovinos em pastejo, a monensina pode ser fornecida por meio
121 de suplemento proteico-energético com intuito de reduzir o risco de intoxicação
122 a pasto (EMBRAPA, 2001).

123 A monensina melhora o desempenho animal, principalmente devido às
124 alterações na fermentação ruminal e algumas dessas respostas também po-
125 dem ocorrer por mudanças metabólicas que não envolvem alterações na fer-
126 mentação ruminal (efeitos pós-ruminais) (OLIVEIRA et al., 2005).

127 Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nati-

128 ons/World Health Organization (FAO/WHO) por meio do Codex Alimentarius
129 Commission, o limite máximo para a presença de monensina sódica na carne
130 bovina é em torno de 10 µg/kg, e sendo o fígado órgão de eleição para de-
131 tecção de resíduos de monensina, limite máximo neste órgão é de 20 µg/kg.
132 (VENDRAMINI, 2014).

133 O uso de monensina na alimentação animal é envolto de reduzida
134 aceitação social, e sua inclusão nas dietas dos animais ainda levanta questi-
135 onamentos, visto que há possíveis riscos, embora até então não comprova-
136 dos, à biossegurança alimentar dos humanos (VENDRAMINI, 2014).

137 Ainda segundo o autor em 2006, a União Europeia banuiu os antimicro-
138 bianos como promotores de crescimento animal (Regulamentação
139 1831/2003/EC), os ionóforos estão incluídos nesta lista. A alegação é a pos-
140 sível presença de resíduos no leite e na carne, além da maior probabilidade
141 de aparecimento de resistência bacteriana aos antimicrobianos usados na
142 medicina humana.

143 No Brasil, a monensina sódica tem seu uso liberado para ser incluído em
144 dietas para ruminantes em crescimento, terminação e vacas lactantes (OLI-
145 VEIRA et al., 2005). Entretanto, é inquestionável o papel da União Europeia
146 como formadora de opinião, sendo aceitável admitir que outros consumidores
147 mundiais sejam influenciados a seguir esta decisão em futuro próximo e, desta
148 maneira, a restrição da utilização destes aditivos seja ampliada. Segundo Min-
149 goti (2013), existe um crescente interesse científico por formas alternativas que
150 mimetizem os efeitos dos ionóforos, que sejam mais seguras ao consumo hu-
151 mano e, ao mesmo tempo, aceitas pela sociedade consumidora.

152 Para encontrar alternativas naturais após a proibição do uso de antibióti-
153 cos como aditivos para alimentação animal em vários países (CALSAMIGLIA et
154 al., 2007), e pelo aumento da preocupação com os efeitos ambientais da pro-
155 dução de ruminantes (VENDRAMINI, 2014), intensificou-se pesquisas avalian-
156 do o uso de óleos essenciais na alimentação de ruminantes .

157 O entendimento dos efeitos e das atividades dos óleos essenciais pode
158 constituir uma ferramenta útil para melhorar a eficiência da utilização dos nutri-
159 entes no rúmen e o desempenho dos ruminantes, além de reduzir os efeitos
160 desta sobre o meio ambiente (MEYER et al. 2009; GIANNENAS et al. 2011).

161 Os primeiros relatos sobre a utilização de óleos essenciais em ruminan-
162 tes se deram na década de 60 (BORCHERS 1965; OH et al., 1967, 1968;
163 NAGY e TENDERGY, 1968 citado por CALSAMIGLIA et al., 2007). A maioria
164 dos trabalhos envolvendo os óleos essenciais foi realizada *in vitro*, sendo útil
165 para a avaliação da atividade dos óleos essenciais, suas atividades antimicro-
166 bianas, dosagens e concentrações, para posteriores avaliações *in vivo* (VEN-
167 DRAMINI, 2014).

168 Os óleos essenciais são compostos naturais complexos voláteis e que
169 possuem um forte odor. Esses óleos são produzidos pelo metabolismo secun-
170 dário de plantas aromáticas e possuem papéis importantes na natureza, atuando
171 no mecanismo de defesa das plantas contra patógenos e predadores e para
172 atrair insetos polinizadores (BAKKALI et al., 2008).

173 Segundo Bakkali e colaboradores (2008) os óleos essenciais ou alguns
174 de seus componentes são utilizados na fabricação de produtos como perfumes
175 e maquiagens, também possuem propriedades antibacteriana, antifúngica e
176 inseticida que são largamente empregados na indústria de produtos sanitários,
177 odontológicos e agronômicos, como pesticidas, preservadores, aditivos alimen-
178 tares e remédios naturais.

179 O Crina Ruminants® (DSM Nutritional Products Ltd., Suíça), é um com-
180 posto à base de dos óleos essenciais timol, limoneno e guaiacol (OLIVEIRA.,
181 2013)

182 Substâncias puras como o timol são responsáveis por conferir proprie-
183 dades biológicas aos óleos essenciais de diferentes espécies vegetais
184 (GALLUCCI et al., 2009). PENGELLY (2004) afirma que estas substâncias são
185 chamadas de fenóis por possuírem um grupo hidroxila ligado a um anel aromá-
186 tico em suas estruturas químicas, e estão presentes em uma grande variedade
187 de plantas. Os fenóis podem apresentar atividade bactericida, antisséptica, an-
188 ti-helmíntica e inseticida.

189 O timol é uma substância pouco solúvel em água que pode ser encon-
190 trada na forma de cristais grandes translúcidos, incolores ou brancos, estando
191 presente nos óleos de tomilho (*Thymus* spp.) e orégano (*Origanum vulgare*),
192 espécies da família Lamiaceae e no óleo do “alecrim-pimenta” (*Lippia sidoides*)
193 que pertence à família Verbanaceae, como também em outras plantas do gê-
194 nero *Lippia* (PENGELLY, 2004; NEVES, 2009). Estudos *in vitro* têm demons-

195 trado a atividade bactericida deste monoterpeno (BOTELHO et al., 2007; NOS-
196 TRO et al., 2007),

197 O limoneno, composto rico em monoterpenos monocíclicos, é abundante
198 nos limões (*Citrus limonum*), na laranja (*Citrus aurantium*) e na hortelã (*Mentha*
199 *piperita* ou *spicata*), além disso, pode ser encontrado em outros óleos essencia-
200 ais (TURNER et al., 1999). Esse composto demonstra um amplo espectro de
201 ação sobre microrganismos e tem atividade até mesmo sobre bactérias gram-
202 negativas.

203 Estudos *in vitro* apontam potencial de utilização dos óleos essenciais,
204 melhorando a utilização de nitrogênio, reduzindo a emissão de metano, e, con-
205 sequentemente, aumentando a disponibilidade energética. Porém, quando os
206 aditivos foram utilizados *in vivo*, os resultados foram controversos, necessitan-
207 do-se de maiores estudos quanto à utilização desses compostos (FERRO et
208 al., 2016).

209 Segundo Ultee et al. (1999) e Dorman e Deans (2000), as possíveis
210 ações dos óleos essenciais estão em sua maioria associadas a membrana ce-
211 lular, como o transporte de elétrons e gradiente de íons, translocação de prote-
212 ínas, fosforilação e outras reações enzimo-dependentes.

213 Segundo Calsamiglia et al. (2007), esta interação faz com que desinte-
214 gre a membrana bacteriana, tornando-a mais permeável, ocorrendo então
215 grande translocação de íons através da membrana e, conseqüentemente, uma
216 diminuição no gradiente iônico. Os mesmos autores ressaltaram que as bacté-
217 rias podem contrabalancear esses efeitos usando bomba iônica e a morte celu-
218 lar pode não ocorrer, conseqüentemente, uma determinada quantidade de
219 energia é desviada para essa função e o crescimento bacteriano é reduzido,
220 interferindo na velocidade de crescimento e mudanças na proporção das popu-
221 lações de bactérias no rúmen.

222 Dentre os principais efeitos dos óleos essenciais está à diminuição da degrada-
223 ção proteica ruminal. Dados existentes levam a crer que alguns óleos reduzem a taxa de
224 deaminação e a adesão e colonização das bactérias proteolíticas aos seus substratos
225 (CALSAMIGLIA et al., 2007; BENCHAAAR et al., 2008).

226 McIntosh et al. (2003) e Wallace (2004), observaram que os óleos essenciais re-
227 duziram a diversidade e a quantidade de bactérias hiperprodutores de NH₃, o que resul-
228 tou em menor taxa de produção de NH₃ a partir de aminoácidos.

229 De acordo com Russell (2002), reduzir o número dessas bactérias é in-
230 teressante, pois tais microrganismos, apesar de existirem em baixas concen-
231 trações, possuem alta atividade produtora de NH₃. McIntosh et al. (2003) afir-
232 mam que algumas dessas bactérias (*Clostridium sticklandii* e *Peptostreptococ-*
233 *cus anaerobius*) foram afetadas pela ação dos óleos essenciais, enquanto ou-
234 tras (*Clostridium aminophilum*) não sofreram nenhum tipo de alteração. Entre-
235 tanto, McIntosh et al. (2003),

236 Varga et al. (2004), avaliando 170 vacas em lactação observaram pro-
237 dução de leite 1,6 kg/d maior ao se fornecer 1,2 g/d de Crina Ruminants® aos
238 animais. Por outro lado, Tassoul e Shaver (2009), utilizando 1 g/d de Crina
239 Ruminants® na dieta, observaram redução de 7% na ingestão de matéria seca,
240 sem efeito sobre a produção de leite.

241 De acordo com o estudo realizado por Vendramini (2014), vacas em
242 lactação apresentaram redução na excreção de nitrogênio fecal (g/dia) quan-
243 do alimentadas com Crina Ruminants®, em comparação a animais que rece-
244 beram monensina, quitosana e a animais que não receberam aditivos.

245 Meschiatti et al. (2016) estudaram a combinação de óleos essenciais
246 (Crina Ruminants®, DSM Nutritional Products), com enzimas exógenas (α -
247 amilase, Ronozyme RumiStar®, DSM e protease, Ronozyme Proact®, DSM)
248 em comparação à monensina sódica, na ingestão, digestibilidade e fermenta-
249 ção ruminal em bovinos Nelore em confinamento. Estes autores observaram
250 que os animais alimentados com os óleos essenciais mais enzimas exógenas
251 apresentaram ingestão de matéria seca e nutrientes digestíveis totais (NDT)
252 maior ($P < 0,05$) (IMS 9,77 kg; NDT 7,73 kg) quando comparados a animais
253 que receberam apenas monensina sódica (IMS 7,69 kg; NDT 5,89 kg).

254 Além disso, no mesmo trabalho, Meschiatti et al. (2016), ao utilizarem
255 apenas os óleos essenciais, observaram maior ($P < 0,05$) digestibilidade total
256 da proteína bruta (PB) quando comparado ao uso apenas da monensina sódica
257 (74,9% e 65,3%, respectivamente).

258 O comportamento ingestivo pode ser influenciado por fatores físicos
259 como a degradação do alimento, fluxo da digesta pelo trato gastrintestinal e
260 pela presença de um ou mais metabólitos na corrente sanguínea (CARVA-
261 LHO et al., 2004). Gabbi et al. (2009), utilizaram uma mistura comercial de
262 óleos essenciais (alho, cebola, linhaça, canela e cravo-da-índia) e observaram

263 uma redução no tempo de ingestão do alimento e atribuíram esse aumento na
264 velocidade de ingestão apenas ao efeito palatilizante do aditivo.

265 Um ponto que muito ainda se questiona é o nível ideal a ser utilizado
266 destes aditivos, a partir da resposta produtiva que se quer alcançar. Parte
267 deste questionamento envolve ainda a falta de dados sobre aspectos da res-
268 posta animal ao uso dos óleos essenciais em diferentes condições de produ-
269 ção. Entre estas condições, podemos destacar a carência de trabalhos avali-
270 ando o uso destes aditivos na dieta de bovinos em pastejo, sistema base da
271 produção de carne no Brasil (PAULINO et al., 2008).

272 Os capítulos seguintes foram elaborados seguindo as normas do Jou-
273 nal of Animal Science.

274

275 **3. OBJETIVOS**

276

277 **3.1 Objetivo geral**

278 Avaliar a digestibilidade, parâmetros ruminais e metabólicos e o com-
279 portamento de garrotes Nelore em pastejo recebendo diferentes níveis de óleos
280 essenciais.

281

282 **3.2 Objetivos específicos**

283 a) Estimar consumo de garrotes Nelore em pastejo recebendo diferen-
284 tes níveis de óleos essenciais.

285 b) Avaliar os coeficientes de digestibilidade aparente de garrotes Nelo-
286 re em pastejo recebendo diferentes níveis de óleos essenciais.

287 c) Avaliar o metabolismo de garrotes Nelore em pastejo recebendo di-
288 ferentes níveis de óleos essenciais.

289 d) Quantificar as visitas diárias no comedouro e bebedouro por garrotes
290 Nelore em pastejo recebendo diferentes níveis de óleos essenciais, através do
291 sistema eletrônico Intergado®.

292 e) Quantificar o tempo por visita no comedouro e bebedouro de garro-
293 tes Nelore em pastejo recebendo diferentes níveis de óleos essenciais, através
294 do sistema eletrônico Intergado®.

295 f) Avaliar as atividades comportamentais diurnas de garrotes Nelore em
296 pastejo recebendo diferentes níveis de óleos essenciais.

297

298 **4. REFERÊNCIAS**

- 299 Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne [ABIEC]. 2011.
300 Perfil da pecuária brasileira. Disponível em:
301 <<http://www.abiec.com.br/Sumario.aspx>>. Acesso em: 29 Mai. 2017.
- 302 BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects
303 of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446–475,
304 2008.
- 305 BENCHAAAR, C.; McALLISTER, T.A.; CHOUINARD, P.Y. Digestion, ruminal
306 fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy
307 cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or *Yucca schi-*
308 *digerasaponin* extracts. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v. 91, n. 12, 4765-4777,
309 2008.
- 310 BERTIPAGLIA, L. M. A. Suplementação protéica associada a monensina sódi-
311 ca e *Saccharomyces cerevisiae* na dieta de novilhas mantidas em pasta-
312 gens de capim-marandu. 2008. 102f. Tese (Doutorado em Zootecnia) –
313 Curso de Pósgraduação em Ciências Agrárias e Veterinárias, Universida-
314 de Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.
- 315 BRASIL, 2008. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Disponível
316 em:<[http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentação/aditivos/aditivosaut](http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentação/aditivos/aditivosautorizados)
317 [orizados](http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentação/aditivos/aditivosautorizados)>. Acesso em 29 Mai. 2017.
- 318 BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.;
319 LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A. MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH,
320 J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. C. Antimicrobial activity of the essential oil
321 from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazili-*
322 *an Journal of Medical and Biological Research*, 40: 349-356, 2007.
- 323 CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P.W; CASTILLEJOS, L.; FER-
324 RET, A. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fer-
325 mentation. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 90, p. 2580-2595,
326 2007.
- 327 CARVALHO, G.G.P.; PIRES, A.J.V.; SILVA, F.F.; VELOSO, C.M.; SILVA, R.R.;
328 SILVA, H.G.O.; BONOMO, P.; MENDONÇA, S.S. Comportamento ingestivo
329 de cabras leiteiras alimentadas com farelo de cacau ou torta de dendê.
330 *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília. v.39, n.9, p.919-925. set. 2004
- 331 CARVALHO, T.B; ZEN, S.D. A cadeia de Pecuária de Corte no Brasil: evolução
332 e tendências. *Revista iPecege*; 2017.V.3, p.85-99, 2017.

- 333 Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada [CEPEA]. 2016. PIB
334 agronegócio. Disponível em: <<http://cepea.esalq.usp.br/pib/>>. Acesso em:
335 29 Mai. 2017.
- 336 DORMAN, H.J.D; DEANS,S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial
337 activity of plant volatile oils. *J. of Applied Microb.*, Oxford, v. 88, p.308-316,
338 2000.
- 339 EMBRAPA, Uso de Aditivos na Dieta de Bovinos de Corte. Documentos 106,
340 out., 2001.
- 341 FERRAZ, J. B. S.; FELÍCIO, P. E. D. Production systems - an example from
342 Brazil. *Meat Science*, Barking, v.84, n.2, p. 238-243, fev. 2010
- 343 FERRO, M. M.; MOURA, D.C.; GERON, L.J.V. Óleos essenciais em dietas
344 para bovinos. *Rev. Cienc. Agroamb.*, v.14, n.2, 2016.
- 345 GABBI, A.M. et al. Desempenho produtivo e comportamento de novilhas sub-
346 metidas a dietas com aditivo fitogênico. *Revista Brasileira de Saúde e*
347 *Produção Animal*, Salvador, v.10, n.4, p.-62, 2009.
- 348 GALLUCCI, M. N.; OLIVA, M.; CASERO, A. C.; DAMBOLENA, J.; LUNA, A.;
349 ZYGADLOB, J.; DEMO, M. Antimicrobial combined action of terpenes
350 against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus*
351 *aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour and Fragrance Journal*, 24: 348–354,
352 2009
- 353 GIANNENAS, I.; SKOUFOS, J.; GIANNAKOPOULOS, C.;WIEMANN, M.;
354 GORTZI, O.; LALAS, S.; KYRIAZAKIS, I. Effects of essential oils on milk
355 production, milk composition, and rumen microbiota in Chios dairy ewes.
356 *Journal of Dairy Science*, v.94, p.5569-5577, 2011.
- 357 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [IBGE]. 2016. Produção da pecuá-
358 ria municipal. Disponível em:
359 <www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/>. Acesso em: 29 Mai.
360 2017.
- 361 MARINO, C. T; MEDEIROS, S. R. Aditivos alimentares na nutrição de bovinos
362 de corte.Cap.7. p.97- 106. 2015
- 363 MACITELLI, F., BERCHIELLI, T.T.; MORAIS, J.A.S. et al. Desempenho e ren-
364 dimento de carcaça de bovinos mestiços alimentados com diferentes vo-
365 lumosos e fontes protéicas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, n.6,
366 p.1917-1926, 2007.
- 367 MCINTOSH, F. M.; WILLIAMS, P.; LOSA, R.; WALLACE, R. J.;BEEVER, D.
368 A.;NEWBOLD, C. J. Effects of essential oils on ruminal microorganisms

- 369 and their protein metabolism. Applied and Environmental Microb., Aber-
370 deen, 69:5011, 2003.
- 371 MESCHIATTI, M. A. P; PELLARIN, L. A; BATALHA,C.D.A; ACEDO, T.S. ;
372 TAMASSIA, L.F.M. ; CORTINHAS,C.S. ; GOUVEA, V.D. ; SANTOS, F.A.P
373 ; DÓREA, J.R. Effects of essential oils and exogenous enzymes on intake,
374 digestibility, and rumen fermentation in finishing Nelore cattle. In: Joint An-
375 nual Meeting - Animals and science: big solutions for grand challenges.
376 2016. Salt Lake City. Periodicals... Salt Lake City : American Society of
377 Animal Science, Journal of Animal Science. v.94, E-Supplement 5, p. 746,
378 2016.
- 379 MEYER, N. F.; ERICKSON, G. E.; KLOPFENSTEIN, T. J.; GREENQUIST, M.
380 A.; LUEBBE, M. K.; WILLIAMS, P.; ENGSTROM, M. A. Effect of essential
381 oils, tylosin, and monensin on finishing steer performance, carcass char-
382 acteristics, liver abscesses, ruminal fermentation, and digestibility. Journal
383 of Animal Science, Champaign, v. 87, p.2346-2354, 2009.
- 384 MINGOTI, R. D. Desempenho produtivo, digestão e metabolismo em vacas
385 leiteiras alimentadas com diferentes concentrações de quitosana nas die-
386 tas. 2013. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de
387 Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassu-
388 nunga, 2013.
- 389 MOORE, J.E.; BRANT, M.H.; KUNKLE, W.E.; HOPKINS, D.I. Effects of sup-
390 plementation on voluntary forage intake, diet digestibility, and animal per-
391 formance. Journal of Animal Science. Savoy, v.77. suppl. 2, p.122-
392 135.1999
- 393 MOURO, G. F. et al. Fontes de carboidratos e ionóforo em dietas contendo
394 óleo vegetal para ovinos: digestibilidade, balanço de nitrogênio e fluxo
395 portal de nutrientes. Revista Brasileira de Zootecnia, v.35, n.5, p.2144-
396 2153, 2006.
- 397 NEVES, Ana Paula. Ensaio sobre controle do carrapato *Rhipicephalus micro-*
398 *plus* através de processos agroecológicos. Dissertação (Mestrado em
399 Agroecossistemas) – Curso de Pós-Graduação em Agroecossistemas,
400 Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,
401 Florianópolis, Santa Catarina, 2009.
- 402 NEWBOLD, C. J.; McINTOSH, F. M.; WILLIAMS, P.; LOSA, R.; WALLACE, R. J.
403 Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermenta-
404 tion. Anim. Feed Sci. Technol. Aberdeen, 114:105–112, 2004.
- 405 NOSTRO, A.; ROCCARO, A. S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI,
406 M. A.; PIZZIMENTI, F. C.; CIONI, P. L.; PROCOPIO, F.; BLANCO, A. R.
407 Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and

- 408 Staphylococcus epidermidis biofilms. Journal of Medical Microbiology, 56:
409 519–523, 2007.
- 410 OLIVEIRA, J. S.; ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M. Uso de aditivos na nutrição
411 de
412 ruminantes. Revista Eletrônica de Veterinária, v.6, n.11, p.1695-7504, Nov.,
413 2005.
- 414 Oliveira, H. B. N. I. Óleos Essenciais Na Dieta De Vacas Em Lactação. 2013.
415 42p. Universidade Federal Dos Vales Do Jequitinhonha E Mucuri. Disserta-
416 ção (mestrado em Zootecnia). Diamantina MG. 2013
- 417 PAULINO, Mário Fonseca. Estratégias de suplementação para bovinos em
418 pastejo. Anais... SIMCORTE – Simpósio de Produção de Gado de Corte,
419 Viçosa, 1999.
- 420 PAULINO, M. F.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C. Suplementação
421 animal em pasto: energética ou protéica In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO
422 ESTRATÉGICO DA PASTAGEM, Viçosa. Anais... Viçosa: DZO – URV,
423 p.359-392, 2006.
- 424 PAULINO, M.F.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. 2008. Bovinocultura
425 funcional nos trópicos. In: VI SIMCORTE SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE
426 GADO DE CORTE. 2008. Viçosa, MG. Anais... Viçosa, DZO/UFV. p.275-
427 306.
- 428 PENGELLY, A. The Constituents of Medicinal Plants: An introduction to the
429 chemistry and therapeutics of herbal medicine. Segunda edição, Al-
430 len&Unwin, Austrália, 2004.
- 431 REIS, R.A. RODRIGUES, L. R. A. PEREIRA, J.R.A. Suplementação como es-
432 tratégia para o manejo das pastagens. In: Simpósio sobre manejo das
433 pastagens. Piracicaba, 1997. Anais...Piracicaba: FEALQ
- 434 REIS, R.A., RUGGIERI, A.C., OLIVEIRA, A.A., AZENHA, M.V., ASAGRANDE,
435 D.R. Suplementação como Estratégia de Produção de Carne de Qualida-
436 de em Pastagens Tropicais. Revista Brasileira de Saúde e Produção Ani-
437 mal, v.13, n.3, p.642-655, 2012.
- 438 REIS, R. A. et al. Semiconfinamento para produção intensiva de bovinos de
439 corte. In: Simpósio Matogrossense de Bovinocultura de Corte, Cuiabá,
440 p.195-224, ago., 2011.
- 441 REIS, R.A.; BARBERO, R.P.; KOSCHECK, J.F.W. Manejo de pastagens tropi-
442 cais e suplementação alimentar para bovinos. In: CONGRESSO LATINO-
443 AMERICANO DE NUTRICAÇÃO ANIMAL, VI, 2014, Sao Pedro, SP. Anais...
444 Sao Pedro, SP, 2014.

- 445 RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J. Mini Review. Effect of ionophores on ruminal
446 fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 55, p. 1-6, 1989.
- 447 RUSSELL, J.B. Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition. Ithaca; p.
448 119, 2002.
- 449 SEGABINAZZI, L. R. Aditivo a base de extratos vegetais como alternativa à
450 monensina sódica na dieta de vacas de corte terminadas em confinamen-
451 to. 2008. 84f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Fede-
452 ral de Santa Maria, Santa Maria, 2008.
- 453 SOUZA, F, M. TERMINAÇÃO DE BOVINOS À PASTO. Goiânia: Universidade
454 UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS - ESCOLA DE VETERINÁRIA E
455 ZOOTECNIA, 2011. 39p. Seminário (disciplina Seminários Aplicados do
456 Programa de Pós-graduação em Ciência Animal). Universidade Federal
457 de Goiás., 2011.
- 458 TASSOUL, M. D.; SHAVER, R. D. Effect of a mixture of supplemental dietary
459 plant essential oils on performance of periparturient and early lactation
460 dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 92, p. 1734-1740,
461 2009.
- 462 TURNER, G.; GERSHENZON, J.; NIELSON, E. E.; FROEHLICH, J. E.; CRO-
463 TEAU, R. Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene
464 biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secreto-
465 ry cells. *Plant Physiologists*, v. 120, p. 879- 886, 1999.
- 466 ULTEE, A.; BENNIK, M.H.J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of
467 carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus*
468 *cereus*. *Applied Environmental Microbiology*, v.68, p.1561-1568, 2002.
- 469 ULTEE, A.; KETS, E.P.W.; SMID, E.J. Mechanisms of action of carvacrol on the
470 food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied Environmental Microbiology*.
471 65, 4606–4610, 1999.
- 472 VARGA, G.; BLOCK, E.; WILLIAMS, P.; CASSIDY, T.W.; LOSA, R. Effect os
473 CRINA RUMINANTS®, a mixture of essential oil components, on continu-
474 ous culture fermentation and milk production of lactating cows. *Journal of*
475 *Animal Science*, Champaign, v.82, suppl.1, p.334, 2004.
- 476 VENDRAMINI, T. H. A. Avaliação de aditivos na alimentação de vacas leiteiras.
477 Pirassununga: Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina Vete-
478 rinária e Zootecnia, 2014. 81p. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Pro-
479 dução Animal). Universidade de São Paulo, 2014.
- 480 WALLACE, R.J. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *The*
481 *Proceedings of the Nutrition Society*, London, v. 63, n. 4, p. 621-629, 2004.

482 **CHAPTER 2 LEVELS OF CRINA RUMINANTS® IN PROTEIN SUPPLEMEN-**
483 **TATION ON NUTRITIONAL CONDITIONS OF GRAZING NELLORE**
484 **STEERS**

485

486 **ABSTRACT:** To evaluate the effects of different doses of Crina Ruminants® in protein
487 supplements on the nutritional conditions of grazing steers, we used five Nellore steers,
488 average BW of $395 \pm 30,6$ kg, fistulated in rumen, housed in one paddock of B. brizan-
489 tha containing automatic feeders and drinkers (Intergado®). Animals received one of
490 five treatments in the supplement: Control (without additives) and 400, 800, 1,200 and
491 1,600 mg of Crina Ruminants®/100 kg BW (CRINA). Treatments were assigned to the
492 animals according to a 5 x 5 Latin square design. Intake, VFA, ruminal ammonium ni-
493 trogen and pH, digestibility, blood metabolites, urine urea nitrogen and microbial crude
494 protein production were evaluated. Once a significant effect of treatment was observed,
495 mean of each CRINA treatment was compared to the Control treatment by a Dunnett's
496 test. The linear and quadratic effects of the level of CRINA were also evaluated. We
497 used PROC MIXED of the SAS University and alpha of 5% was adopted. There was no
498 significant difference in additive use on digestibility and metabolism of the diet of the
499 animals. The level of Crina Ruminants® that maximizes ($P < 0.05$) ruminal microbial
500 protein synthesis and SUN was around 1,000 mg/100 kg BW.

501 **Key words:** beef cattle, essential oils, nutritional evaluation

502

503

INTRODUCTION

504 The use of protein supplements is the main alternative available to supplement
505 the diet of grazing animals, promoting increment in performance and assisting in pas-
506 ture management (Reis et al., 2014).

507 Essential oils are a natural alternative to the use of ionophore additives
508 (Calsamiglia et al., 2007). The main effect of the essential oils is the reduction of rumen
509 protein degradation. According to Calsamiglia et al. (2007), their use may reduce the
510 cost of feed, improve animal performance and reduce the environmental pollution due
511 urea (NH_3) loss.

512 The objective with this work was to evaluate the effect of different doses of Cri-
513 na Ruminants® as an additive in protein supplements of grazing Nellore steers on the
514 nutritional conditions of the animals.

515 MATERIALS AND METHODS

516 All animal care and handling procedures were ethically standardized and ap-
517 proved by the Animal Care and Use Committee of DSM - Produtos Nutricionais Brasil
518 S.A, protocol number 003/2017. Field study was conducted at the I&AS Beef Center,
519 Fazenda Caçadinha, Rio Brilhante, MS, Brazil, from April to June, 2018.

520 Five Nellore steers, with initial average weight of $395 \pm 30,6$ kg, with 18 months
521 old, ruminal fistulated were used. The animals were housed in a pasture of *B. brizantha*,
522 cv. Marandú. The pasture had a system of five electronic feeders (Intergado®, Betin,
523 MG, Brazil), which just allowed the access of an animal to its respective feeder.

524 Treatments were randomly assigned to the animals according to a 5 x 5 Latin
525 square design: Control (protein supplementation without additives), 400 (protein sup-
526 plement containing 400 mg of Crina Ruminants®/100 kg BW), 800 (protein supplement
527 containing 800 of Crina Ruminants®/100 kg BW), 1,200 (protein supplement contain-
528 ing 1,200 mg of Crina Ruminants®/100 kg BW), or 1,600 (protein supplementation
529 containing 1600 mg of Crina Ruminants®/100 kg BW). The protein supplement was
530 offered daily to the animals at the level of 1g/kg BW.

531 Experiment had five periods, each one with 15 d. In each experimental period,
532 the first 9 d were destined to adapt the animals to the treatments. From the 4th to the
533 13th d animals received, via ruminal cannula, 10 g of chromic oxide to estimate of fecal
534 excretion. Between the 10th and 14th d, to estimate intake and digestibility, feces were

535 collected directly in the animals' rectum, once a day, at 10h00, 12h00, 14h00, 17h00 and
536 7h00, respectively.

537 Individual intake of supplement was recorded daily using the Intergado® elec-
538 tronic system.

539 Between 9th and 10th d, a sample the forage was taken to estimate total DM/ha,
540 by cutting, close to the ground, ten areas randomly selected. Samples were collected
541 using a metallic square of 0.5 x 0.5 m (McMeniman, 1997). Samples were weighed and
542 homogenized. These samples were proportionally sub-sampled to a pooled forage sam-
543 ple to determine DM content (Figure 1). Simultaneously, hand plucked samples of the
544 pasture were taken to estimate the quality of the pasture consumed by the animals.
545 Samples of the supplement provided and leftovers were collected twice in each period,
546 on the 10th and 15th d. Samples of forage, feces and supplement were frozen for further
547 laboratory analysis.

548 The protein supplement used is the commercial Fosbovi Protein 35® product
549 which has in its basic composition the following ingredients: Carbo amino sulfofoque-
550 late sulfur; Calcium carbonate; Sodium chloride (common salt) (12.04%); Ventilated
551 sulfur (sulfur flower); Soybean meal; Dicalcium phosphate; Ground whole corn; Car-
552 bamino cobalt phosphocellate; Carboamino copper phosphocellate; Carbamino iron
553 phosphoquelate; Carbo amino manganese phosphocellate; Selenium carbo amino phos-
554 phocellate; Carb amino zinc phosphocellate; Calcium iodate; Livestock urea; Vitamin
555 A; Kaolin (max 4%). The chemical composition of the pastures and supplement used is
556 presented in Table 1.

557 On the 14th d of each period, we collected individual urine spot samples (10 mL),
558 approximately 4h after supplementation. Urine samples were immediately diluted in 40

559 mL of H₂SO₄ 0.036 N and frozen at -20° for analysis of the levels of creatinine, purine
560 derivatives and urea (Valadares et al., 1999).

561 Blood samples were also collected on the 14th d, 4h after supplementation, im-
562 mediately after urine collection, to evaluate blood levels of glucose, urea, albumin, and
563 total blood protein. Two blood samples were collected from each animal via the jugular
564 vein with vacuum tubes. One of the samples was collected in tubes with clot activator
565 and separator gel (BD Vacutainer® SST II Plus, São Paulo, Brazil) to analyze the ni-
566 trogenous components of the blood. For glucose analysis, we used sample collected in a
567 second tube, with EDTA and sodium fluoride (BD Vacutainer® Fluoride/EDTA, São
568 Paulo, Brazil). Samples were immediately centrifuged at 3,600 × g for 20 min. Serum
569 and plasma were then frozen at -20°C.

570 Ruminal fluid samples were collected on the 15th d of each experimental period
571 to evaluate ruminal pH, ruminal ammoniacal nitrogen concentration (RAN) and volatile
572 fatty acid concentration (VFA). Samples were collected manually at 6h00, 12h00,
573 18h00 and 00h00 in the interface liquid:solid of the ruminal environment, filtered on
574 gauze and submitted to immediate pH evaluation, using a digital potentiometer (Figuei-
575 ras et al., 2015).

576 Subsequently, ruminal liquid samples were separated into two aliquots. The first
577 one, a 40 mL aliquot, was fixed with 1 mL of H₂SO₄ (1:1) and frozen (-20°C) for quan-
578 tification of RAN concentration. The second aliquot (10 mL) was immediately frozen in
579 liquid nitrogen and subsequently maintained at -20°C for quantification of the VFA
580 concentration (Figueiras et al., 2015).

581 Pasture, feces and supplement samples, after dried in forced ventilated oven
582 (65°C for 72 h), were processed in a mill (1 mm screen) and sent to the laboratory. The

583 dry matter analyzes (DM INCT-CA G-003/1 method), mineral matter (MM, INCT-CA
584 method M-001/1), crude protein (CP, INCT-CA method M-002/1), ether extract (EE,
585 INCT-CA G-005/1), neutral detergent insoluble fiber (NDF, INCT-CA method F-002/1)
586 adjusted for contaminating protein (NDFP, INCT-CA method N-004/1), were per-
587 formed as proposed by Detmann et al. (2012).

588 From the fecal excretion data, the indigestible neutral detergent fiber (iNDF) was
589 used as an internal marker for direct estimation of total DM intake and indirect estima-
590 tion of digestibility of the diet (iNDF method - INCT-CA F-009/1, as recommended by
591 Detmann et al. (2012). The DM intake of pasture was obtained by the difference be-
592 tween the total DM intake and the supplement DM intake.

593 The blood glucose (Ref. number K082, Bioclin® Quibasa, Belo Horizonte, Bra-
594 zil) and urea (Ref. Number K056, Bioclin® Quibasa, Belo Horizonte, Brazil) were
595 quantified by the enzymatic-colorimetric method. Total protein (Ref. Number K031,
596 Bioclin® Quibasa, Belo Horizonte, Brazil) and albumin (Ref. Number K040, Bioclin®
597 Quibasa, Belo Horizonte, Brazil) by the colorimetric method. Serum ureic nitrogen
598 (SUN) was estimated as 46.67% of total serum urea. All metabolites were analyzed ac-
599 cording to the manufacturer's recommendations in automatic biochemical analyzer
600 (Mindray BS200E, Shenzhen, China).

601 The RAN concentration was evaluated by the method proposed by Chaney and
602 Marbach (1962). Analyzes of VFA in ruminal fluid were performed by high perfor-
603 mance liquid chromatography (HPLC) as described by Figueiras et al. (2015).

604 The intake of the diet components and their respective apparent digestibility coef-
605 ficients (DC) were obtained by the intake of pasture and supplement, and the composi-
606 tion of the pasture, supplements and feces. The DC of each component of the diet was

607 calculated by the difference between the total ingested and the total excreted by the fe-
 608 ces, divided by the amount ingested.

609 Urine volume was estimated using creatinine concentration as a marker and as-
 610 suming daily creatinine excretion (mg/d) of $34.5 \times SBW^{0.9491}$ (Silva et al., 2012). Mi-
 611 crobial N synthesis was estimated using the technique of the purine derivatives in urine.
 612 Allantoin was estimated by colorimetry as proposed by Chen and Gomes (1992). The
 613 urinary concentrations of creatinine and uric acid were obtained by colorimetric and
 614 enzymatic-colorimetric methods, respectively. The analyses of creatinine and uric acid
 615 were performed in an automatic biochemistry analyzer (Mindray BS200E, Shenzhen,
 616 China) using comercial kits (Ref. Number K067 for creatinine and K139 for uric acid,
 617 Bioclin® Quibasa, Belo Horizonte, Brazil).

618 Excretion of the purine derivatives in urine was calculated by the sum of the al-
 619 lantoin and uric acid excretions, which were obtained by the product between their con-
 620 centrations in urine by the daily urinary volume. Absorbed purines were calculated from
 621 the excretion of purine derivatives (Barbosa et al., 2011), as follows:

$$622 \quad Y = \frac{x - 0.301 \times BW^{0.75}}{0.8}$$

623 where Y = absorbed purines (mmol/d), x = excretion of purine derivates
 624 (mmol/d), 0.8 = recovered absorbed purines. The $0.301 \times BW^{0.75}$ value = endogenous
 625 excretion of purine derivates.

626 Ruminal synthesis of nitrogen compounds was calculated as a function of the
 627 absorbed purines (Barbosa et al., 2011):

$$628 \quad Z = \frac{70 \times Y}{0.93 \times 0.137 \times 1000}$$

652 Supplement intake accounted for about 2.1% of total DM intake, but about
653 10.7% of the MM intake. Due to the low supplement intake (below that recommended
654 by the manufacturer of 1 g/kg BW), the total diet consumed by the animals presented
655 11.0% of CP, 60.6% of NDF, 16.5% of NFC and 1.6% of EE, quite similar to the aver-
656 age composition of the pasture during the trial.

657 Similarly to what was observed for the intake variables, no effect of the treat-
658 ments on the ruminal pH was observed ($P>0.05$; Figure 2). Considering that the sup-
659 plements were offered at 8h00, a pH decline was observed in the following 10 h (up to
660 18h00). This declining, however, did not lead to pH values below 6.4, indicating that
661 there were no ruminal conditions that would impair the ruminal fermentation. Stating
662 18h00, increasing pH values were observed, reaching the highest values at 06h00,
663 around 6.8.

664 The use of Crina Ruminants® as an additive in the supplement, or the variation
665 in its level, was not able to significantly affect the total VFA production, the proportion
666 of each VFA or the ratio between acetate and propionate in the ruminal fluid ($P>0.05$;
667 Table 3). However, there was a tendency towards a linear increase in VFA production
668 as the inclusion level of Crina Ruminants® in the supplement increased ($P<0.10$).

669 The ruminal ammoniacal nitrogen (RAN) concentrations of the animals receiv-
670 ing Control supplement or supplements with different levels of Crina Ruminants® did
671 not present significant differences ($P>0.05$, Figure 3).

672 Similarly to intake and ruminal parameters, the inclusion or the level of Crina
673 Ruminants® in the supplement did not significantly influenced the apparent coefficient
674 of digestibility (CD) of dry matter or any components of the diet ($P>0.05$; Table 4).

675 Among all the evaluated nutritional parameters, only the CD EE presented a
676 numerically large variation (although not significant) among the animals receiving Cri-
677 na Ruminants® and those of the Control treatment (increase of 49% of the observed
678 value).

679 Another aspect to be highlighted regarding digestibility of components of the di-
680 et, is the similarity between the observed values of digestible organic matter (DOM) and
681 TDN. This difference between TDN and DOM ranged from 2.3 to 2.5% in all evaluated
682 treatments.

683 Treatments here evaluated did not affect the metabolic parameters of the blood
684 ($P>0.05$). However, we observed a tendency of a quadratic effect of Crina Ruminants®
685 levels on serum N urea content ($P<0.10$; Table 5).

686 The urinary excretion of N urea did not present significant difference among
687 treatments (in g/d or as mg/kg BW - $P>0.05$; Table 6). The microbial crude protein pro-
688 duction in the rumen was not influenced by the presence or the level of Crina Rumi-
689 nants® in the supplement ($P>0.05$). We observed, however, lower efficiency of ruminal
690 microbial protein synthesis when 1,600 mg of Crina Ruminants®/100kg BW was added
691 to the supplement ($P<0.05$). In addition, it was possible to identify a tendency of a quad-
692 ratic effect of the additive level in the supplement on the efficiency of microbial synthe-
693 sis ($P<0.10$).

694

DISCUSSION

695 Meschiatti et al. (2019) used five Nellore steers in confinement to evaluate dif-
696 ferent additives and their associations: Monensin (26 mg/kg); a blend of essential oils
697 (90 mg/kg); a blend of essential oils and Monensin (90 mg/kg + 26 mg/kg); a blend of
698 essential oils and exogenous α -amylase (90 mg/kg + 560 mg/kg); a blend of essential

699 oils and exogenous α -amylase and exogenous protease (90 mg/kg + 560 mg/kg + 840
700 mg/kg, respectively). These authors observed higher DM intake just when the animals
701 received the blend of essential oils associated with exogenous α -amylase (9.77 kg/d). As
702 observed in this study, the intake of the animals fed just with essential oils as additive
703 (8.15 kg/d) showed no difference to the other treatments. This positive result of the
704 combination of the blend of essential oils with exogenous α -amylase can be associated
705 to the high non-fibrous carbohydrate content in the confinement diets evaluated in that
706 study.

707 Similarly, Vendramini (2014) evaluated different additives in diets for confined
708 dairy cows: Crina Ruminants® (1 g/cow/d), Chitosan (150 mg/kg BW), and Monensin
709 (24 mg/kg DM). The author did not observe a significant difference between the inclu-
710 sion of the additives in relation to the control (without additive) or the type of additive
711 tested on intake of the DM or the constituents of the diet, corroborating the results here
712 observed. Oliveira (2013) studying confined dairy cows receiving a commercial blend
713 of essential oils, also did not observe significant variation in the relative intake (g/kg
714 BW) of DM or NDF.

715 Despite the lack of significance, the intake of DM and NDF here observed for
716 animals receiving additives in the supplement (20.8 and 12.6 g/kg BW, respectively)
717 were more consistent with that preconized by the literature to growing animals
718 (Mertens, 1987), compared to the intake of animals receiving the Control treatment
719 (17.0 and 10.3 g/kg BW, respectively).

720 The lack of significance of the increase in pasture intake here observed by the
721 animals receiving Crina Ruminants® in the supplement (around 24% increase compared
722 to Control) can be explained by the great variation observed among experimental units,
723 which makes difficult to accept a difference as statistically significant.

724 Evaluated together, the ruminal fermentation parameters here studied (pH, pro-
725 duction of VFA and their proportion, and ruminal ammoniacal N), showed that the in-
726 clusion or the level of Crina Ruminants® in the supplement did not affected the ruminal
727 environment or fermentation.

728 The production of VFA's here observed (ranging from 8 to 10 mmol/dL ruminal
729 liquid) is similar to the results presented by Figueiras et al. (2015), who evaluated graz-
730 ing beef cattle receiving protein supplementation, similar to this experiment. Also the
731 proportions of each VFA (76% acetic acid, 15% propionic acid and 7% butyric acid)
732 were similar to the results observed by those authors.

733 The proportion of VFA is highly influenced by diet composition, so that when
734 the amount of dietary fiber decreases, the acetate:propionate ratio also decreases. On
735 the other hand, when cellulose and hemicellulose levels increase, relative to soluble
736 carbohydrates and starch, the acetate:propionate ratio increases (Ishler et al., 1998).
737 The high acetic acid content observed here is in agreement with the diet used in the pre-
738 sent experiment: grazing animals with high fiber content (60.6% NDF) and low non-
739 fibrous carbohydrate content (16.5% CNF).

740 Animals that received 1,200 mg/100 kg BW of Crina Ruminants® had a peak of
741 RAN at 18h00, while those that received the other treatments showed their highest con-
742 centrations at 00h00. This variation is probably related to the hours of higher intake of
743 the supplement by the animals.

744 The RAN levels here observed are lower than those reported by Costa et al.
745 (2011), who also worked with grazing animals with protein supplementation. High con-
746 centrations of RAN combined with the high amount of urea in the supplement (garan-
747 tee levels around 11%) may have acted as an inhibitor of supplement intake.

748 The rumen is the first organ of the digestive system that signals to the central
749 nervous system any change in metabolic state or risk of toxicity due to ingested diet
750 (Forbes, 2000; Oliveira 2017). With high RAN levels, ingestion of a high urea supple-
751 ment may lead to metabolic disturbances or even toxicity from excess rumen ammonia.
752 The availability of pasture during the experimental period is shown in Figure 1. Since
753 the diet consisted mainly of pasture, supplement intake could be suppressed if and when
754 intake could cause ruminal or metabolic discomfort.

755 The digestibility coefficients of the DM or of the diet components were not af-
756 fected by any of the treatments. Similarly, other authors did not observe changes in di-
757 gestibility when they used the same blend of essential oils in different experimental
758 conditions: confined dairy cows at 1 g/d - Vendramini (2014), in vitro - Castillejos et al.
759 (2004), and beef cattle in the feedlot at the dose of 90 mg/kg diet - Meschiatti et al.
760 (2019). This lack of effect of the essential oils on the digestibility of dietary components
761 may be associated to the fact that they do not influence the DM intake, not affecting the
762 ruminal passage rate and the degradation of the diet (Oliveira, 2013).

763 The similarity between the levels of DOM and TDN and, especially, the low var-
764 iability of the difference between these values (ranging from 1.43 to 1.58 times the EE
765 content of the diet consumed) indicate that, in the case of diets with low EE, the DOM
766 can be an estimator of the energy content of the diet as efficiently as TDN. The ad-
767 vantage of using the DOM instead of the TDN is in the fact that the DOM is more easily
768 determined and dispenses the use of chemical reagents aggressive to the environment,
769 normally used in the laboratory analyzes to determine the TDN. This alternative has
770 previously been suggested by Detmann et al. (2006).

771 The concentration of blood metabolites here evaluated are in agreement with bo-
772 vine reference ranges: 45 to 75 mg/dL for glucose, 23 to 58 mg/dL for serum urea nitro-

773 gen (SUN), 6.7 to 7.4 g/dL for total protein, and 3.0 to 3.6 g/dL for albumin (Gregory et
774 al, 2004). Silva (2017) using a blend of essential oils for dairy cows, verified that there
775 was no influence of it on the concentration of blood metabolites. The results observed
776 by this author (glucose levels ranging from 67.3 to 62.2 mg/dL and urea ranging from
777 16.6 to 20.8 mg/dL) are similar to those observed in the present study.

778 A possible excess of absorbed RAN would lead to high values of SUN, which
779 was not observed in this experiment. Inhibition of supplement intake may have been
780 responsible for avoiding this. Among animals receiving Crina Ruminants® in the sup-
781 plement, SUN presented a quadratic tendency, reaching the point of maximum concen-
782 tration with the supply of 994 mg/100 kg BW. Since there was no variation in PC intake
783 in animals or in the RAN level near the time of blood collection, this effect may also be
784 related to a variation in metabolic protein utilization by animals.

785 Costa et al. (2011) evaluated the effect of different relationships between true
786 protein and non-protein nitrogen on grazing cattle supplementation during the rain sea-
787 son. They observed an average urinary nitrogen excretion of 22.8 g N/d. This value is
788 very higher than that here observed. This points to a lower loss of N absorbed here than
789 in that experiment. According to Moraes (2010), the excessive production of ammonia
790 and its ruminal absorption increase the excretion of nitrogen via urine. Thus, the low
791 NUU excretion corroborates the non-occurrence of excess of RAN in the present exper-
792 iment.

793 The efficiency of microbial protein synthesis suggested by the NRC (2000,
794 2016) is about 130 g of microbial CP / kg NDT, lower than that found in the present
795 study which was around 200 g of microbial CP / kg NDT. Although significant just at
796 the inclusion level of 1,600 mg/100 kg BW, the presence of Crina Ruminants® in the
797 supplement led to a reduction of approximately 20% in the efficiency of ruminal micro-

822 the synthesis of ruminal microbe protein and urea nitrogen serum is around 1000 mg /
823 100 kg body weight of the additive. The use of this additive is not feasible under the
824 conditions of the present study, where there was quantity and quality in the pastures,
825 being necessary to evaluate the additive under adverse conditions.

826

827

LITERATURE CITED

828 Barbosa, A.M.Valadares R. F.D. Valadares Filho S.C.et al. Endogenous fraction
829 and urinary recovery of purine derivatives obtained by diferente methods in Nellore
830 cattle.2011. **J. Anim. Sci.** 2011. 89:510–519 doi:10.2527/jas.2009-2366

831 Castillejos, L. Calsamiglia, S. Ferret, A, Losa. R. Effects of a specific blend of
832 essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutri-
833 ent flow from a continuous culture system 2004. **Anim. Feed Sci.** 20040377:8401
834 doi:10.1016.2004.

835 Calsamiglia, S. Busquet, M. Cardozo, P.W. Castillejos, L. Ferret, A. Invited
836 review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. 2007. **J. Dairy Sci.**
837 90:2580–2595 doi:10.3168/jds.2006-644.

838 Chaney, A. L., and E. P. Marbach. 1962. **Modified reagents for determination**
839 **of urea and ammonia.** Clin. Chem. London. 8:130-132.

840 Chen, X.B. Gomes, M.J. **Estimation of microbial protein supply to sheep and**
841 **cattle based on urinary excretion of purine derivatives – an overview of technical**
842 **details (occasional publication).** International feed Resources Unit. Bucksburnd Aber-
843 deen: Rowett Research Institute 1992, 21p.

844 Costa,V. A.C. Detmann, E. Paulino, M. F. Valadares Filho, S. C. Henriques, L.
845 T. Carvalho, I. P. C. Digestibilidade total e parcial e balanço nitrogenado em bovinos

846 em pastejo no período das águas recebendo suplementos com nitrogênio não-proteico
847 e/ou proteína verdadeira.2011. **Rev. Bras. Zootec.**,40, .12.2815-2826, 2011.

848 Detmann, E; Valadares Filho, S. C. Pina, Douglas.S; Campos,J. M. S; Paulino,
849 Mário. F; Oliveira, A.S; Silva, Polyana. A. Estimação da digestibilidade do extrato eté-
850 reo em ruminantes a partir dos teores dietéticos: desenvolvimento de um modelo para
851 condições brasileiras.2006. **Rev. Bras. Zootec.** 35, 4. 1469-1478, 2006.

852 Detmann, E. Pina, D. S. Valadares Filho, S. C. Campos, J. M. S. Paulino, M. F.
853 Oliveira, A. S. Silva, P. A. Henriques, L. T. Estimação da fração digestível da proteína
854 bruta em dietas para bovinos em condições brasileiras. 2006. **Rev. Bras. Zootec.**35.5.
855 2101-2109. 2006.

856 Detmann, E. Souza, M.A. Valadares Filho, S.C. Queiroz, A.C. Berchielle, T.T.
857 Saliba, E.O.S. Cabral, L.S. Pina, D.S. Ladeira, M.M. E Azevedo, J.A.G. (Eds.). 2012.
858 **Métodos para análise de alimentos.** Suprema. Visconde do Rio Branco. Brasil. 214p.
859 2012.

860 Dias, H. L. C. Valadares Filho, S.C. Silva, J.F.C. Paulino, M.F. Cecon,P.R.
861 Leão,M.I. Oliveira, R.V. Consumo e Digestões Totais e Parciais em Novilhos F1 Li-
862 mousin x Nelore Alimentados com Dietas contendo Cinco Níveis de Concentrado.2000.
863 *Rev. bras. zootec.*, 29(2):545-554.

864 Figueiras, J.F. Detmann, E. Valadares Filho, S.C. Paulino, M.F. Batista, E.D.
865 Rufino, L.M.A. Valente, T.N.P. Reis, W.L.S. E Franco, M.O. Desempenho nutricional
866 de bovinos em pastejo durante o período de transição seca-águas recebendo
867 suplementação protéica. 2015. **Arch. Zootec.** 64. 247: 269-276. 2015

868 Forbes Jm. Provenza Fd. Integration of learning and metabolic signals into a
869 theory of dietary choice and food intake. In: Cronjé PB. (Ed.). **Ruminant physiology,**
870 **digestion, metabolism, growth and reproduction.** CAB international, p. 03-19, 2000.

871 Gregory, L., Birgel Junior, E. H. D'angelino, J.L., Benesi, F. J,Araújo, W. P;
872 Birgel, E. H. Valores de referência dos teores séricos da ureia e creatinina em bovinos
873 da raça Jersey criados no estado de São Paulo. Influência dos fatores etários, sexuais e
874 da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico.** 71, 3,
875 339-345. 2004.

876 Ishler, V. Heinrichs, J. Varga, G. **From feed to milk: understanding rumen**
877 **functions.** 1998. 72p.

878 Mcmeniman, N. P. Methods of estimating intake of grazing animals. In: reunião
879 anual da sociedade brasileira de zootecnia, simpósio sobre tópicos especiais em zootec-
880 nia, 34. 1997, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Sociedade Brasileira de Zootecnia,
881 p.131-168, 1997.

882 Meschiatti, M. A. P. Gouvêa,V. N. Pellarin , L. A. Batalha, C. D. A. Biehl, M.
883 V. Acedo, T. S. Dórea, J. R. R. Tamassia, L. F. M. Owens, F. N. Santos , F. A. P. Feed-
884 ing the combination of essential oils and exogenous α -amylase increases performance
885 and carcass production of finishing beef cattle. 2019. **J. Anim Sci.** manuscript.2019

886 Mertens, D. R. Predicting intake and digestibility using mathematical models of
887 ruminal function. 1987. **J. Anim. Sci.** 1987.64:1548-1558

888 Moraes, E. H. B.K; Paulino.M.F ; Valadares,S.C.F; Moraes,K. A. K; Detmann,
889 E; Souza. Avaliação nutricional de estratégias de suplementação para bovinos de corte
890 durante a estação da seca. **R. Bras. Zootec.,** 39, 3.608-616, 2010

891 NRC.2000. **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. 7a rev. ed. Nat. Acad.
892 Press, Washington, DC.

893 NRC.2016. **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. 8 a rev. ed. Nat. Acad.
894 Press, Washington, DC.

895 Oliveira, H. B. N. I. Óleos Essenciais Na Dieta De Vacas Em Lactação. 2013.
896 42p. Universidade Federal Dos Vales Do Jequitinhonha E Mucuri. **Dissertação** (mes-
897 trado em Zootecnia). Diamantina MG. 2013

898 Oliveira, B. C. Caetano, G.A.O. Caetano Junior, M.B;Martins, T.R; Olivei-
899 ra,C.B. Mecanismos reguladores de consumo em bovinos de corte. Fatores físicos, fato-
900 res químicos, fatores psicogênicos, ingestão de água. 2017. **Nutritime**. 14, doi: 1983-
901 9006. 04. 2017

902 Reis, R.A. Barbero, R.P.; Koscheck, J.F.W. Manejo de pastagens tropicais e
903 suplementação alimentar para bovinos. In: Congresso Latino-Americano De Nutricao
904 Animal, VI, 2014, Sao Pedro, SP. **Anais...** Sao Pedro, SP, 2014.

905 Silva, A.G. Grão de soja em suplementos múltiplos para novilhas de corte em
906 pastejo. 2012.57p. Universidade Federal de Viçosa. **Dissertação** (Mestrado- Programa
907 de Pós- graduação em Zootecnia). Lavras MG. 2012.

908 Silva, R.B. Suplementação de vacas leiteiras com óleos essenciais. 2017. 162p
909 Universidade Federal de Lavras. **Tese** (Doutorado em Produção e nutrição de ruminan-
910 tes). Lavras – MG. 2017.

911 Valadares, R.F.D. Broderick, G.A. Valadares Filho, S.C. et al. Effect of replac-
912 ing alfafa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from
913 excretion of total purine derivatives. **J. Dairy Sci.** 82. 12., 2686-2696, 1999.

- 914 Vendramini, T. H. A. Avaliação de aditivos na alimentação de vacas leiteiras.
915 2014. 81p. Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
916 **Dissertação** (Mestrado em Nutrição e Produção Animal). Pirassununga –SP. 2014.

917 *Tables*

918

919 Table 1 Composition of the pasture and the supplements used in experiment

Component	Pasture	Protein Supplement
DM, % NM	33.7±6.21	91.66±0.58
MM, % DM	9.74±1.09	54.19±0.64.
CP, % DM	10.5±0.517	30.74±1.33
EE, % DM	1.58±0.315	0.961±0.09
NDFp, % DM	66.3±2.10	22.3±1.75

920

921

922

923 Table 2 Daily intake of steers receiving protein supplementation with different levels of Crina Ruminants®

Daily intake	Treatment					P-value Effect	
	Level of Crina Ruminants®, mg/100kg BW					of Crina level	
	Control	400	800	1200	1600	Linear	Quadratic
	<i>Intake, kg/d</i>						
DM pasture	6.72±0.822	8.47±0.823	7.97±0.823	8.01±0.823	9.04±0.823	0.377	0.325
DM supplement	0.188±0.021	0.181±0.021	0.165±0.021	0.192±0.021	0.147±0.021	0.453	0.342
DM Total	6.91±0.826	8.65±0.826	8.12±0.826	8.20±0.826	9.19±0.826	0.383	0.333
MM pasture	0.651±0.081	0.815±0.081	0.776±0.081	0.780±0.081	0.879±0.081	0.421	0.359
MM supplement	0.101±0.011	0.095±0.011	0.087±0.011	0.104±0.012	0.075±0.011	0.267	0.187
MM Total	0.751±0.084	0.910±0.084	0.863±0.084	0.884±0.084	0.954±0.084	0.487	0.431
OM	6.15±0.756	7.74±0.756	7.27±0.756	7.31±0.756	8.23±0.756	0.487	0.431
EE	0.111±0.019	0.140±0.019	0.129±0.019	0.130±0.019	0.142±0.019	0.328	0.309
CP	0.779±0.099	0.946±0.099	0.890±0.099	0.908±0.099	0.998±0.099	0.428	0.376
NDF	4.17±0.577	5.26±0.577	4.93±0.577	4.95±0.577	5.58±0.577	0.359	0.314

NFC	1.13±0.121	1.41± 0.121	1.35±0.121	1.35±0.121	1.54±0.121	0.387	0.322
	<i>Intake, g/kgBW</i>						
DM	17.0±2.01	21.2±2.01	19.8±2.01	20.1±2.01	22.4±2.01	0.358	0.308
NDF	10.3± 1.42	12.9± 1.42	11.9±1.42	12.2±1.42	13.6±1.42	0.343	0.296

924 Means in the same row, followed by a capital letter "A" differ from the Control treatment, by the Dunnett test at the 5% level.

925

926 Table 3 Ruminal volatile fatty acids (VFA) of steers receiving protein supplementation with different levels of Crina Ruminants®

Item	Treatment					P-value Effect of Crina level	
	Control	Level of Crina Ruminants®, mg/100kg BW				Linear	Quadratic
		400	800	1,200	1,600		
VFA, mmol/dL	8.85±1.60	9.64±1.59	9.27±1.60	7.89±1.59	10.0±1.60	0.096	0.100
Acetic, % VFA	76.6±0.563	76.5±0.559	76.0±0.563	76.3±0.559	76.5±0.568	0.182	0.154
Propionic, % VFA	15.4±0.516	15.3±0.513	15.8±0.516	15.4±0.513	15.3±0.520	0.217	0.184
Butyric, % VFA	6.94±0.163	6.98±0.161	7.12±0.163	7.06±0.161	6.93±0.165	0.186	0.154
Rel. Acetic/Propionic	5.01±0.210	5.02±0.209	4.89±0.210	5.00±0.209	5.03±0.211	0.333	0.294

927 Means in the same row, followed by a capital letter "A" differ from the Control treatment, by the Dunnett test at the 5% level.

928

929

930

931 Table 4 Coefficient of digestibility (CD, %) of the diet components, TDN (%DM) and Digestible Organic Matter (DOM, %DM) of the diet of
 932 steers receiving protein supplementation with different levels of Crina Ruminants®

Item	Treatment					P-value Effect of Crina level	
	Control	Level of Crina Ruminants®, mg/100kg BW				Linear	Quadratic
		400	800	1.200	1.600		
CD DM	0.600±0.012	0.604±0.012	0.593±0.013	0.584±0.012	0.598±0.012	0.126	0.149
CD EE	0.152±0.121	0.272±0.121	0.248±0.121	0.176±0.121	0.206±0.121	0.386	0.524
CD CP	0.706±0.015	0.715±0.015	0.696±0.015	0.703±0.015	0.695±0.015	0.479	0.605
CD NDF	0.622±0.012	0.624±0.012	0.616±0.012	0.607±0.012	0.627±0.012	0.150	0.145
CD NFC	0.735±0.019	0.714±0.019	0.706±0.019	0.701±0.019	0.695±0.019	0.815	0.930
CD OM	0.627±0.012	0.627±0.012	0.619±0.012	0.610±0.012	0.622±0.012	0.203	0.236
TDN	0.582±0.012	0.585±0.012	0.578±0.012	0.568±0.012	0.581±0.012	0.175	0.205
DOM	0.558±0.011	0.560±0.011	0.553±0.011	0.544±0.011	0.557±0.011	0.180	0.203

933 Means in the same row, followed by a capital letter "A" differ from the Control treatment, by the Dunnett test at the 5% level.

934

935

936

937 Table 5 Blood metabolites of steers receiving protein supplementation with different levels of Crina Ruminants®

Item	Control	Treatment				P-value Effect	
		Level of Crina Ruminants®, mg/100kg BW				of Crina level	
		400	800	1200	1600	Linear	Quadratic
Glucose, mg/dL	65.0±1.39	66.7±1.39	66.4±1.39	68.0±1.39	65.2±1.39	0.381	0.332
Serum N urea, mg/dL	17.0±1.80	18.3±1.80	20.3±1.80	21.8±1.80	18.3±1.80	0.088	0.090
Albumin, g/dL	2.77±0.168	2.71±0.168	2.34±0.168	2.76±0.168	2.81±0.168	0.191	0.130
Total Protein, g/dL	7.27±0.236	6.80±0.236	7.42±0.236	7.19±0.236	7.27±0.236	0.155	0.212

938 Means in the same row, followed by a capital letter "A" differ from the Control treatment, by the Dunnett test at the 5% level.

939

940

941 Table 6 Urine Urea Nitrogen (UUN), Microbial Crude Protein Production (mCP), Microbial Crude Protein Production (mCPef) efficiency in
 942 relation to NDT consumption of steers receiving protein supplementation with different levels of Crina Ruminants®

Item	Treatment				P-value Effect		
	Control	Level of Crina Ruminants®, mg/100kg BW				of Crina level	
		400	800	1.200	1.600	Linear	Quadratic
UUN,							
g/d	9.45 ±0.835	9.62±0.835	9.53±0.835	8.80±0.835	8.78±0.835	0.774	0.947
mg/kg BW	114 ±10.2	117±10.2	117±10.2	107±10.2	108±10.2	0.829	0.984
mCP, g/d	926±41.9	887±41.9	988±41.9	867±41.9	873±41.9	0.401	0.326
mCPef, g/kgTDN	238±22.4	179±22.4	219±22.4	197±22.4	170A±22.4	0.106	0.085

943 Means in the same row, followed by a capital letter "A" differ from the Control treatment, by the Dunnett test at the 5% level.

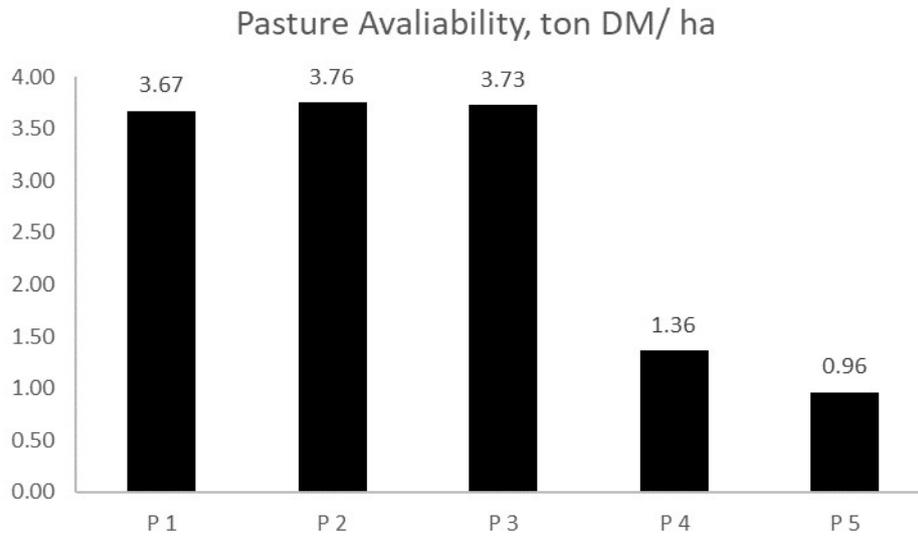
944

945

946

947 **Figures**

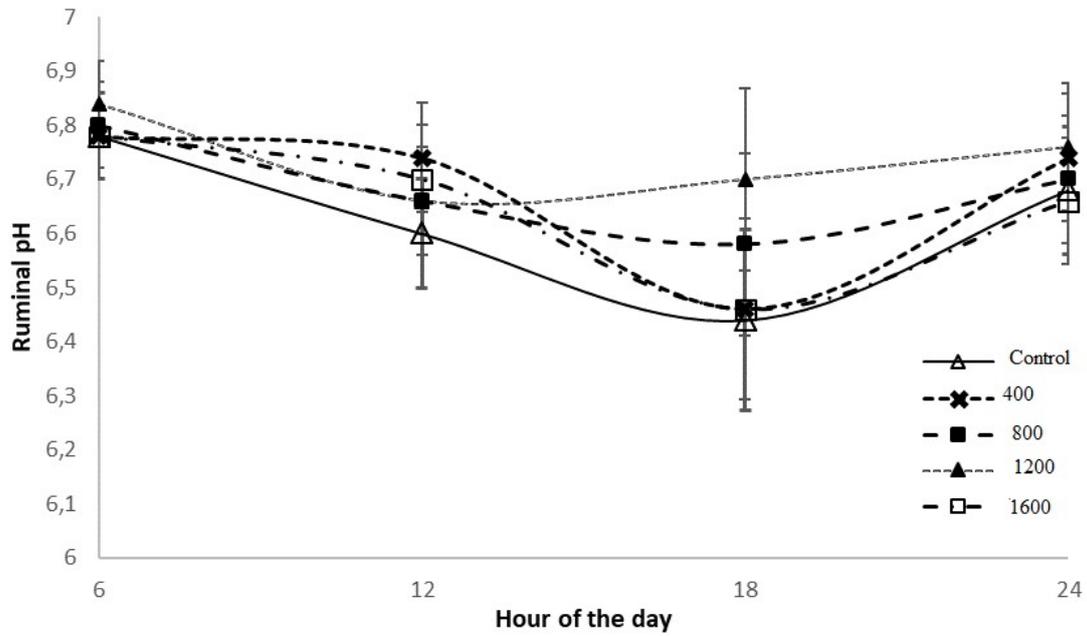
948



949

950 Figure 1 Pasture availability during the experimental periods (ton DM/ha).

951



952

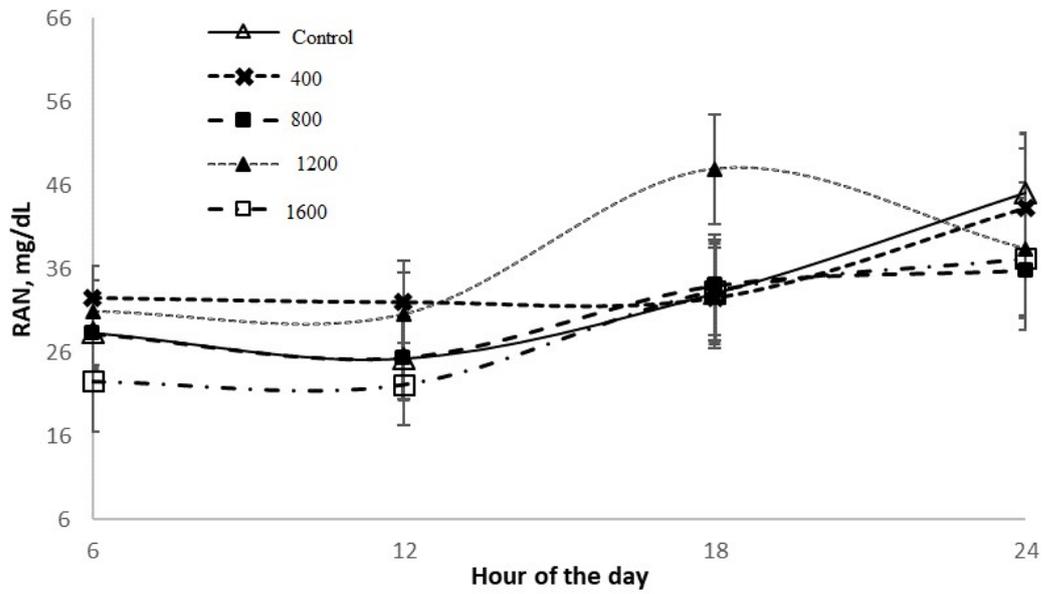
953

954

Figure 2 Ruminal pH of steers receiving protein supplementation with different levels of Crina Ruminants® at different hours of the day.

955

956



957

958 Figure 3 Ruminal ammonium nitrogen (RAN) of steers receiving protein supplementa-
959 tion with different levels of Crina Ruminants® at different hours of the day.

960

961

962

963

964

965

966

967

968

969

970

971 **CHAPTER 3 - LEVELS OF CRINA RUMINANTS® IN PROTEIN SUPPLE-**
972 **MENTATION ON THE BEHAVIOR OF GRAZING NELLORE STEERS**

973

974 **ABSTRACT:** To evaluate effects of different doses of Crina Ruminants® in protein
975 supplements on the behavior of grazing steers, we used 162 Nellore steers with initial
976 BW around 323 ± 20.6 kg. Animals were housed in six paddocks of *B. brizantha* con-
977 taining automatic feeders and drinkers (Intergado®). Animals received one of six treat-
978 ments in supplement: Control (without additives), Monensin (30 mg Monensin®/100 kg
979 BW), and 400, 800, 1,200 and 1,600 mg of Crina Ruminants®/100 kg BW (CRINA).
980 We used data from the automatic feeders and drinkers (during all the experimental peri-
981 od), and from the observation of 60 (10 from each treatment) animal's daytime behavior
982 in eight non-sequential days, in two distinct months. All data from the Intergado® sys-
983 tem (considering the weekly data as repeated measures) were analyzed according to a
984 completely randomized design. Daytime behavior was analyzed according to a random-
985 ized block design, considering the month as a block and the day as repeated measures.
986 Once a significant effect of treatment was observed, mean of each CRINA treatment
987 was compared to the Control and to the Monensin treatments by a Dunnet's test. The
988 linear and quadratic effects of the level of CRINA were also evaluated. We used PROC
989 MIXED of the SAS University. The alpha of 5% was adopted. Animals receiving
990 Monensin showed ($P < 0.05$) longer feeder time and more time lying down. The level of
991 Crina Ruminants® that minimize ($P < 0.05$) the time in feeders is similar to the level
992 that: increases time grazing and reduces time lying down (around 1,000 mg/100 kg
993 BW).

994 **Key words:** animal behavior, beef cattle, essential oils

995

996

INTRODUCTION

997 The use of additives in the nutritional supplements of grazing animals may im-
998 prove feed efficiency, stimulate growth or benefit animal health and metabolism (Reis
999 et al., 2011).

1000 In this sense, Monensine has been commonly used as a feed additive in ruminant
1001 production (Mouro et al., 2006). Its use is intended to increase the average daily gain
1002 and feed efficiency (Bertipaglia, 2008). According to the author, its use for grazing an-
1003 imals can improve the digestive process and minimize nutrient losses.

1004 Essential oils have thus appeared as a natural alternative to the use of ionophore
1005 additives for animal feeding (Calsamiglia et al., 2007) due the growing concern about
1006 the environmental effects of ruminant production (Vendramini, 2014) and possible de-
1007 velopment of microbial resistance to these additives.

1008 Despite the works that have already evaluated the inclusion of essential oils in
1009 ruminant feed, one point that is still questioned is the best level of these additives, espe-
1010 cially in the diet of grazing cattle, with is the main system for beef production in Brazil
1011 (Paulino et al., 2008). Thus, the objective with this work was to evaluate the effect of
1012 increasing doses of Crina Ruminants® as an additive in protein supplements of grazing
1013 Nellore steers on the behavior of the animals.

1014 MATERIALS AND METHODS

1015
1016 All animal care and handling procedures were ethically standardized and ap-
1017 proved by the Animal Care and Use Committee of DSM - Produtos Nutricionais Brasil
1018 S.A, protocol number 003/2017.

1019 Field study was conducted at the I&AS Beef Center, Fazenda Caçadinha, Rio
1020 Brilhante, MS, Brazil, from February to June, 2018.

1021 We used 162 Nellore steers 18 mo old with average initial body weight (BW) of
1022 323 ± 20.6 kg. Animals were housed in six paddocks of *B. brizantha*, cv. Marandú, with
1023 7.0 ha each one, containing automatic feeders and drinkers (Intergado®, Betim, MG,
1024 Brazil). Each animal randomly received one of six treatments: Control (protein supple-
1025 mentation without additives – negative control), Monensin (protein supplementation
1026 containing 30 mg Monensin®/100 kg BW - positive control), and 400 (protein supple-
1027 ment containing 400 mg Crina Ruminants®/100 kg BW), 800 (protein supplement con-

1028 taining 800 mg Crina Ruminants®/100 kg BW), 1,200 (protein supplement containing
1029 1,200 mg Crina Ruminants®/100 kg BW), or 1,600 (protein supplement containing
1030 1,600 mg Crina Ruminants®/100 kg BW) (CRINA treatments).

1031 The trial lasted 125 d. The daily amount of supplement provided was adjusted
1032 every 15 d in order to provide an amount corresponding to 1g/kg BW on natural matter
1033 basis. Weekly supplement samples were collected and frozen (-20°C) for further evalua-
1034 tion of the chemical composition. In order to eliminate possible effects of dry matter
1035 availability and/or quality of pastures on the performance of the animals, we rotate the
1036 groups of animals among the pastures every week.

1037 Supplement consumption and water intake were measured daily using the Inter-
1038 gado® electronic system. At the beginning of the trial, ten animals were randomly se-
1039 lected in each treatment and individually identified on the body side, using hair dye.

1040 After 30 days of adaptation to management and experimental area, during the
1041 daytime in eight non-sequential days, in two different months (four days each month)
1042 we evaluated the daytime behavior of the animal. Observations were made every five
1043 minutes, at distance, in elevated observation stations, using binoculars, by three pairs of
1044 trained observers who took turns during the 12 h period of observation. We respected a
1045 period of thirty minutes prior to the first observation to the adaptation of the animals to
1046 the presence of the observers.

1047 Animal's activities were classified into: standing, lying, walking, grazing, drink-
1048 ing water and consuming supplement. The observed behavior for each animal was con-
1049 sidered uniform in the five minutes between two consecutive observations.

1050 The individual behavior of the animals consuming supplement and water was al-
1051 so evaluated using the Intergado® electronic system, during the entire experiment. We

1052 evaluated: the number of visits to the feeder and to the water drinker, and the time spent
1053 in front of each one.

1054 At every 28 d, we sampled the forage to estimate the total mass of DM/ha (Figure
1055 1), by cutting close to the ground five areas randomly selected in each pasture (thirty
1056 samples in total). The samples were collect using a met)allic square of 0.5 x 0.5 m
1057 (McMeniman, 1997). Samples were weighted and homogenized. From these samples, a
1058 composite sample was taken to determine the DM content. Simultaneously, we collect-
1059 ed hand plucked samples of the pasture to estimate the quality of the pasture consumed
1060 by the animals (Table 1).

1061 Pasture and supplement samples were dried in oven with forced ventilation (65°C
1062 for 72 h). After that, they were processed in a mill (1 mm screen) and sent to the labora-
1063 tory. The dry matter analyzes (DM INCT-CA G-003/1 method), mineral matter (MM,
1064 INCT-CA method M-001/1), crude protein (CP, INCT-CA method M-002/1), ether ex-
1065 tract (EE, INCT-CA G-005/1), neutral detergent insoluble fiber (NDF, INCT-CA meth-
1066 od F-002/1) adjusted for contaminating protein (NDFP, INCT-CA method N-004/1),
1067 were performed as proposed by Detmann et al. (2012).

1068 Data from the daytime behavior of the animals were analyzed according to a ran-
1069 domized block design, considering the observation month as a block, and the daily ob-
1070 servations as repeated measures in the animal. Data from the Intergado® system were
1071 analyzed according to a completely randomized design, considering the weekly data as
1072 repeated measures in each animal. When treatment effect was significant, we compared
1073 the mean of each CRINA level to the Control treatment (without additive) and to the
1074 Monensin treatment, using a Dunnett test. The linear and quadratic effects of the level

1075 of CRINA used in the supplement were also evaluated. A significance level of 0.05 was
1076 adopted.

1077 **RESULTS**

1078 Intergado® system data records showed that the use of high doses of Crina Ru-
1079 minants® (treatments 1,200 and 1,600) increased the number of visits to the feeder
1080 compared to the Control and Monensin treatments ($P < 0.05$), without increasing perma-
1081 nence time in the feeder in relation to the Control treatment ($P > 0.05$; Table 2). In con-
1082 trast, the animals of the treatments 1,200 and 1,600 presented a shorter permanence time
1083 in the feeders, compared to the Monensin treatment. The levels of Crina Ruminants®
1084 affected in a quadratic way both, the number of visits and the time spent in the feeder (P
1085 < 0.05).

1086 Number of visits to the water drinker were higher in the Control and 400 treat-
1087 ments ($P < 0.05$). The higher levels of inclusion of Crina Ruminants® and the use of
1088 Monensin reduced the number of visits to the water drinker by 10%. The time spent
1089 daily in the water drinker did not follow this behavior, so that the animals of the treat-
1090 ment 400 had a longer permanence time in the drinker, compared to the Control
1091 ($P < 0.05$), and those of the treatment 800 had a shorter time, compared to the Monensin
1092 ($P < 0.05$). The most significant variation observed in water intake behavior is related to
1093 Monensin treatment. Animals in this treatment presented a lower number of visits to the
1094 drinker and the longer time spent in the water drinker. The different levels of Crina Ru-
1095 minants® in the supplement showed a quadratic effect on both, the number of visits to
1096 the water drinker and on the time spent in front of it ($P < 0.05$).

1097 The diurnal evaluation of animal behavior (Table 3) showed that, with the ex-
1098 ception of drinking water behavior, which did not differ between treatments ($P > 0.05$),

1099 the inclusion of additives (Crina Ruminants® and monensin) in the supplement influ-
1100 enced all other variables. behaviors evaluated ($P < 0.05$;) Animals that received Crina
1101 Ruminants® at levels of 1,200 and 1,600 mg/100kg CP walked for about more 6
1102 minutes during the day, when compared to Control animals ($P < 0.05$). On the other
1103 hand, grazing time of the Control animals was higher than that of the animals that re-
1104 ceived the additive ($P < 0.05$), except for those who received the 1,600 dose of Crina
1105 Ruminants®. Animals receiving treatments 1,200 and 1,600, as well as Control animals,
1106 grazed more than the animals receiving the Monensin treatment ($P < 0.05$). The level of
1107 Crina Ruminants® also led to a quadratic effect of the levels of this additive on grazing
1108 time ($P < 0.05$).

1109 Animals that received the Control treatment spent about 25 minutes less standing
1110 than those that received any type or level of additives ($P < 0.05$), which did not differ
1111 among each other ($P > 0.05$). The animals of the Monensin treatment, on the other hand,
1112 spent about 50 minutes more lying down when compared to all other treatments
1113 ($P < 0.05$). Among the treatments with Crina Ruminants® as an additive, just the animals
1114 receiving the treatment 1,600 had less time lying than the Control animals ($P < 0.05$).
1115 The level of Crina Ruminants® affected in a quadratic way the time spent lying by the
1116 animals ($P < 0.05$).

1117 The animals that received the treatment 400 had time of supplement intake
1118 greater than those receiving the Control and Monensin treatments ($P < 0.05$). The level of
1119 Crina Ruminants® in the supplement also affected in a quadratic way the time of sup-
1120 plement intake by the animals ($P < 0.05$).

1121

1122

DISCUSSION

1123 Higher levels of Crina Ruminants® caused an increase in the number of visits to
1124 the feeders, with a lower staying time. This may be caused by a reduction in palatability
1125 of the supplement with these levels of additive. This low palatability would cause ani-
1126 mals to divide the intake throughout the day. Data here observed project a maximum
1127 number of visits to the feeders with an inclusion level of 1,500 mg of Crina Rumi-
1128 nants®/100 kg BW, with a minimum time in feeders with a dose of 1,000 mg/100 kg
1129 BW in the supplement.

1130 Compared to the Control, high levels of inclusion of Crina Ruminants® in the
1131 supplement led to a reduction in the number of visits to the water drinker, without af-
1132 fecting time spent drinking water, while the use of low levels of this additive (treatment
1133 400) maintained the number of visits and increased time spent drinking

1134 Quadratic effect on the number of visits to the water drinker and the drinking
1135 time showed a minimum number of visits when using 1,167 mg of Crina Rumi-
1136 nants®/100 kg of BW, and a minimum drinking time with 1,200 mg/100 kg BW.

1137 In general, we observed that the inclusion of low levels of Crina Ruminants® or
1138 inclusion of Monensin in the supplement led to a reduction in grazing time and an in-
1139 crease in leisure time (standing or lying down). Gabbi et al. (2009), evaluating a com-
1140 mercial mixture of essential oils at a dose of 1g/d for confined animals, observed a re-
1141 duction in the time of roughage ingestion of 76.3 min in the diet without additive to
1142 66.5 min in the diet with additive. From the data obtained here, it is estimated that the
1143 grazing time of the animals receiving Crina Ruminants® reached a minimum point
1144 when supplied with 596 mg/100 kg BW, and that the maximum time spent in lying
1145 down would be observed when the animals received 513 mg/100 kg BW of this addi-
1146 tive.

1147 Rosa (2016), evaluating the behavior of grazing cattle supplemented with con-
1148 centrated or mineral in the growing phase, observed that the animals supplemented with
1149 concentrate spent about 116 more minutes with leisure activities. On the other hand, the
1150 animals that received only mineral supplementation remained about 8% more of the
1151 diurnal period (58.3 min) grazing. The author stated that this pattern of behavior could
1152 allow that animals receiving concentrated supplementation spend less energy during the
1153 day (reducing maintenance energy requirements), which may contribute to their better
1154 performance, since more nutrients would be directed for weight gain.

1155 Similar behavior to that observed by Rosa (2016) was also observed here for the
1156 animals receiving Monensin. These animals showed less grazing time and longer time
1157 lying down. On the other hand, when the main nutrient source of the animals is pasture,
1158 a reduction in grazing time, with increased leisure time, may lead to lower DM intake,
1159 affecting animal performance. In this regard, high doses of Crina Ruminants® led to a
1160 longer grazing, walking and standing times and a less lying down time.

1161 Visual evaluation of the time of the animals in the feeders showed a similar be-
1162 havior to those estimated by the automatic system (Intergado®), with emphasis to a
1163 longer time spent with intake of supplement for the animals receiving treatments 400
1164 and Monensin®. The difference between the times estimated by the two systems of be-
1165 havioral evaluation methods is probably due to the fact that the visual evaluation was
1166 performed during the 12 h of the daytime period and the evaluation of the Intergado®
1167 system was during the 24 h of the day.

1168 The results obtained in the visual evaluation of the daytime behavior allow us to
1169 estimate that the minimum time spent with supplement intake would be reached with a
1170 dose close to 1,221 mg/100 kg BW.

1171 On the other hand, the evaluation of the Intergado® system was able to identify
1172 an increase in time in the water drinker of the animals receiving the treatment 400 com-
1173 pared to Control, and a quadratic effect of the Crina Ruminants® level in the supple-
1174 ment, not indicated by the visual evaluation. This may be due to the short time spent by
1175 the animals with this behavior (less than 5 min, which makes it difficult to identify them
1176 with the visual evaluation every 5 min), and/or a higher frequency of visits to the water
1177 drinker at night, not evaluated by the visual evaluation.

1178

1179

CONCLUSION

1180 The animals that received Monensina presented longer feeding and laying time,
1181 the higher inclusions of Crina Ruminants® decreased time in feeders and increased
1182 grazing time. The dosage of 1000mg / 100kg body weight minimizes feeder time, in-
1183 creases grazing time and reduces resting time.

1184

LITERATURE CITED

1185 Bertipaglia, L. M. A. Suplementação protéica associada a monensina sódica e *Sac-*
1186 *charomyces cerevisiae* na dieta de novilhas mantidas em pastagens de capim-marandu.
1187 2008. 102p., Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Tese (Doutora-
1188 do em Zootecnia Pós - graduação em Ciências Agrárias e Veterinárias). São Paulo -
1189 SP.2008.

1190 Calsamiglia, S. Busquet, M. Cardozo, P.W. Castillejos, L. Ferret, A. Invited review:
1191 Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. 2007. **J. Dairy Sci.**
1192 90:2580–2595 doi:10.3168/jds.2006-644.

1193 Detmann, E. Souza, M.A. Valadares Filho, S.C. Queiroz, A.C. Berchielle, T.T.
1194 Saliba, E.O.S. Cabral, L.S. Pina, D.S. Ladeira, M.M. E Azevedo, J.A.G. (Eds.). 2012.

- 1195 **Métodos para análise de alimentos.** Suprema. Visconde do Rio Branco. Brasil. 214p.
1196 2012.
- 1197 Gabbi, A.M. Moraes, R. S. Skonieski, F. R. Viégas. J. Desempenho produtivo e
1198 comportamento de novilhas submetidas a dietas com aditivo fitogênico. **Bras. Saúde**
1199 **Prod. An.** 10, 4. 62, 2009.
- 1200 Mcmeniman, N. P. Methods of estimating intake of grazing animals. In: reunião
1201 anual da sociedade brasileira de zootecnia, simpósio sobre tópicos especiais em zootec-
1202 nia, 34. 1997, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Sociedade Brasileira de Zootecnia,
1203 p.131-168, 1997.
- 1204 Mouro, G. F. et al. Branco. A. F. Harmon. D. L. Maia. F. J. Coneglian. S.M.
1205 Ribeiro. T.F.M. Fontes de carboidratos e ionóforo em dietas contendo óleo vegetal para
1206 ovinos: digestibilidade, balanço de nitrogênio e fluxo portal de nutrientes. 2006. **R.**
1207 **Bras. Zootec.**35. 5.2144-2153, 2006.
- 1208 Paulino, M.F. Detmann, E. Valadares Filho, S.C. 2008. Bovinocultura funcional nos
1209 trópicos. In. VI SIMCORTE Simpósio de Produção de Gado de Corte. 2008. Viçosa,
1210 MG. **Anais.** Viçosa, DZO/UFV. P. 275-306.
- 1211 Reis, R. A. et al. Semiconfinamento para produção intensiva de bovinos de corte.
1212 In: Simpósio Matogrossense de Bovinocultura de Corte, **Anais...** Cuiabá, p.195-224,
1213 ago., 2011.
- 1214 Rosa, E. P. Estratégias de suplementação alimentar para produção de bovinos de
1215 corte em pastejo. 2016. 62p. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul Unidade
1216 Universitária de Aquidauana. **Dissertação** (Programa De Pós-Graduação Em Zootecnia.
1217 Aquidauana, MS). 2016.

- 1218 Vendramini, T. H. A. Avaliação de aditivos na alimentação de vacas leiteiras. 2014.
- 1219 81p. Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, **Dis-**
- 1220 **sertação** (Mestrado em Nutrição e Produção Animal). Pirassununga –SP. 2014.

1221 *Tables*

1222 Table 1 Composition of the pasture and the supplements used in the experiment

Component	Pasture	Protein Supplement
DM, % NM	31.9±6.14	84.6±0.870
MM, % DM	8.62±0.423	54.4±1.22
CP, % DM	9.97±2.11	33.7±2.96
EE, % DM	1.24±0.603	0.840±0.109
NDFp, % DM	66.4±2.34	27.4±0.955

1223 Means in the same row, followed by a capital letter "A" differ from the Control treatment,
 1224 and by the lower case letter "b" differ from Monensin treatment, by the Dunnett test at the
 1225 5% level.
 1226

1227

1228

1229

1230

1231

1232 Table 2 Number of daily visits and time spent in front of feeders and water drinkers by steers receiving protein supplementation with different
 1233 levels of Crina Ruminants® or Monensin

Item	Treatment					<i>P</i> -value Effect of Crina level		
	Control	Level of Crina Ruminants®, mg/100kg BW				Monensin	Linear	Quadratic
		400	800	1200	1600			
Visits to the feeders	4.91±0.117	4.91±0.117	5.01±0.117	6.07±0.117Ab	5.41±0.118Ab	4.76±0.119	<.001	0.003
Time spent in feeders, min	8.91±0.189b	9.95±0.189 ^a	9.01±0.189b	8.82±0.189b	8.94±0.190b	9.91±0.192A	0.006	0.011
Visits to the water drinkers	2.45±0.023	2.43± 0.035b	2.26±0.0238A	2.26±0.0238A	2.29±0.0238A	2.28±0.024A	<.001	<.001
Time spent in water drinkers, min	2.72±0.071	2.98±0.074 A	2.64±0.071b	2.70±0.071	2.69±0.072	2.93±0.072	0.011	0.019

1234 Means in the same row, followed by a capital letter "A" differ from the Control treatment, and by the lower case letter "b" differ from Monensin treatment, by the Dunnett test
 1235 at the 5% level.
 1236

1237

1238

1239

1240

1241

1242 Table 3 Behavior of steers receiving protein supplementation with different levels of Crina Ruminants® or Monensin

Behavior, min	Treatment						<i>P</i> -value Effect of Crina level	
	Control	Level of Crina Ruminants®, mg/100kg BW				Monensin	Linear	Quadratic
		400	800	1.200	1.600			
Walking	28.7±1.53	33.9±1.56	33.9±1.53	35.2±1.62A	34.5±1.53A	32.2±1.53	0.657	0.809
Grazing	436±4.92b	388±4.99A	395±4.92A	408±5.22Ab	450±4.92b	383±4.92A	<0.001	<0.001
Standing	90.9±4.55b	119±4.62A	117±4.55A	124±4.83A	111±4.55A	111±4.55A	0.272	0.152
Lying	161±5.14b	170±5.22b	170±5.14b	150±5.45b	120±5.14Ab	189±5.14A	<0.001	0.003
Supplement intake	2.95±0.768	6.88±0.780Ab	2.92±0.768	2.26±0.815	2.73±0.768	3.35±0.768	<0.001	0.004
Drinking water	0.974±0.306	1.15±0.311	1.73±0.306	1.06±0.324	1.37±0.306	1.24±0.306	0.983	0.664

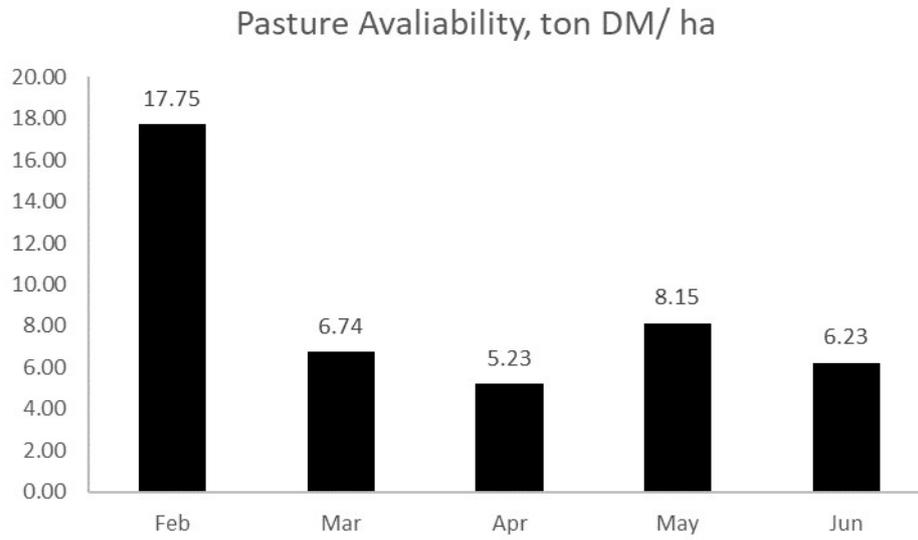
1243 Means in the same row, followed by a capital letter "A" differ from the Control treatment, and by the lower case letter "b" differ from Monensin treatment, by the Dunnett test
 1244 at the 5% level.

1245

1246

1247 **Figures**

1248



1249

1250 Figure 1 Pasture availability during the experimental period (ton DM/ha).

1251

1252 CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

1253

1254 Os animais que receberam Monensina apresentaram maior tempo de
1255 alimentação e maior tempo deitados.

1256 A dose de inclusão de Crina Ruminants ® para maximizar a síntese de
1257 proteína microbiana ruminal e nitrogênio sérico ureico foi em torno de 1.000
1258 mg/100 kg de peso corporal do aditivo.

1259 Essa dosagem também minimiza o tempo nos alimentadores, aumenta o
1260 tempo de pastejo e reduz o tempo de repouso.

1261

1262

1263