



RAYANA BRITO DA SILVA

**SUPLEMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS COM ÓLEOS
ESSENCIAIS**

LAVRAS - MG

2017

RAYANA BRITO DA SILVA

SUPLEMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós - Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e nutrição de ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira

Orientador

LAVRAS – MG

2017

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

Silva, Rayana Brito da.

Suplementação de vacas leiteiras com óleos essenciais / Rayana Brito da Silva. - 2017.

161 p. : il.

Orientador: Marcos Neves Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Capsaicina. 2. Monensina. 3. Taxa de sudação. I. Pereira, Marcos Neves. II. Título.

RAYANA BRITO DA SILVA

SUPLEMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS

SUPPLEMENTATION OF DAIRY COWS WITH ESSENTIAL OILS

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós - Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e nutrição de ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 21 de julho de 2017.

Prof. Dr. Antônio Carlos Cunha Lacrete Júnior

UFLA

Prof. Dr. Márcio André Stefanelli Lara

UFLA

Dr. Rafael Canonenco de Araújo

GRASP

Dra. Renata Apocalypse Nogueira Pereira

EPAMIG

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira

Orientador

LAVRAS – MG

2017

“O discípulo não é maior que o seu mestre...”
(Mateus 10:24)

“A fé é o fundamento da esperança, é uma certeza a respeito do que não se vê...”
(Hebreus 11:1)

“...que eu tenha sabedoria e disciplina, que minhas obras não sejam inúteis e que minha fadiga produza frutos...”
(Sabedoria 3:11)

RESUMO GERAL

A inclusão de óleos essenciais em dietas de vacas leiteiras pode melhorar a eficiência da fermentação ruminal e o desempenho, devido às suas propriedades antimicrobianas e terapêuticas. Dois experimentos foram conduzidos para investigar a inclusão de uma mistura de óleos essenciais microencapsulados composta pelo carvacrol, cinamaldeído, eugenol e capsaicina (MOE) sobre o desempenho leiteiro, digestibilidade dos nutrientes, perfil fermentativo ruminal, comportamento ingestivo, balanço ácido-básico venoso, termorregulação corporal, perfil de ácido graxo na gordura do leite, análise sensorial do leite e variáveis sistêmicas de vacas em lactação. No experimento 1, 28 vacas foram alocadas à um grupo não suplementado (CTL) ou MOE (150 mg/kg de MS da dieta) por 56 d. No experimento 2, 30 vacas foram distribuídas nos tratamentos: CTL, MOE (200 mg/kg de MS da dieta) ou monensina (MON. 15 mg/kg de MS da dieta) por 58 d. Em ambos os experimentos os aditivos foram incluídos à dieta total 2 x/d. No experimento 1, MOE aumentou a eficiência alimentar (1,53 vs. 1,62) com redução de 600 g/d no consumo de matéria seca e acréscimo de 700 g/d na produção de leite. Vacas alimentadas com MOE selecionaram à favor de partículas curtas da dieta no período da manhã. O tratamento MOE reduziu a relação entre acetato e propionato no rúmen. A suplementação com MOE tendeu a aumentar a digestibilidade da matéria orgânica não FDN e o tamanho da refeição e reduziu a secreção diária do 18:2 *trans*-10, *cis*-12 e 18:0 *iso* no leite. Na avaliação sensorial do leite, 58,7 % dos provadores identificaram corretamente a amostra de leite de vacas alimentadas com MOE. No experimento 2, a produção de proteína no leite e o peso corporal foram melhorados pelo MOE. A suplementação com MOE tendeu a aumentar a produção de leite (33,0 vs. 34,4 kg/d) comparado ao CTL e o leite corrigido para energia (31,3 vs. 32,6 kg/d) comparado à MON. A proporção molar de acetato foi aumentada, ao passo que, o butirato e metil butirato foram reduzidos pelo MOE. O tratamento MON deprimiu a síntese de proteína microbiana e tendeu a reduzir a relação entre acetato e propionato no rúmen comparado ao MOE. Os aditivos alimentares promoveram aumento da área e do diâmetro da artéria caudal. Vacas alimentadas com MOE tenderam a reduzir o tempo de ruminação e aumentaram o número de refeições no período da tarde. O nitrogênio ureico no plasma foi maior em vacas MOE quatro horas após a primeira alimentação do dia comparado ao CTL. Em ambos os experimentos, a inclusão de MOE aumentou o teor de oxigênio no sangue e a taxa de sudorese. Houve queda na proporção de vacas com temperatura retal $\geq 39,2$ °C às 1400 e 2000 h no experimento 1 e às 1600 e 2200 h no experimento 2. A temperatura retal tendeu a ser menor em vacas MOE às 1400 h comparado ao CTL no experimento 2. A suplementação com MOE melhorou o desempenho leiteiro em comparação às vacas não suplementadas, promoveu queda da taxa de sudorese e da temperatura corporal de vacas leiteiras.

Palavras-chave: Capsaicina. Monensina. Taxa de sudorese. Termorregulação.

GENERAL ABSTRACT

The inclusion of essential oils in diets of dairy cows may improve rumen fermentation efficiency and performance, due to its antimicrobial and therapeutic properties. Two experiments were conducted to investigate the inclusion of a Blend of microencapsulated essential oils (BEO) composed of carvacrol, cinnamaldehyde, eugenol and capsaicin on lactation performance, nutrient digestibility, ruminal fermentation profile, ingestive behavior, blood acid-base balance, body thermoregulation, fatty acid profile in milk, sensorial analysis of milk and systemic variables of dairy cows. In experiment 1, 28 cows were allocated to a group either CTL (No feed additive) or MOE (150 mg/kg of TMR DM) for 56 d. In experiment 2, 30 cows were distributed among the treatments: CTL, BEO (200 mg/kg of TMR DM) or monensin (MON. 15 mg/kg of TMR DM) for 58 d. In both experiments the additives were included in the TMR twice a day. In experiment 1, BEO increased feed efficiency (1.53 vs. 1.62) with a decrease of 600 g/d in dry matter intake and an increase of 700 g/d in milk yield. Cows fed BEO sorted in favor of short feed particles in the morning. The BEO reduced the ratio between acetate and propionate in rumen. The supplementation with BEO tended to increase the digestibility of non-NDF organic matter and meal size, and reduced the daily secretion of 18:2 *trans*-10, *cis*-12 and 18:0 *iso* fatty acids in milk. In the milk sensorial evaluation, 58.7 % of the consumers correctly identified the milk sample from cows fed BEO. In experiment 2, milk protein yield and body weight were improved by BEO. The supplementation with BEO tended to increase milk yield from 33.0 to 34.4 kg/d in comparison to CTL and energy-corrected milk from 31.3 to 32.6 kg/d compared to MON. The proportion of acetate was increased, whereas the butyrate and methyl butyrate were reduced by BEO. The MON depressed the microbial protein synthesis and tended to reduce acetate to propionate ratio in the rumen relative to BEO. The feed additives promoted an increase in the area and diameter of the caudal artery. Cows fed BEO tended to reduce rumination time and increased the number of meals in the afternoon. Blood urea nitrogen was highest in BEO cows four hours after the first feeding of the day comparing to CTL. In both experiments, the inclusion of BEO increased the oxygen content in the blood and the sweating rate. There was a decrease in the proportion of cows with rectal temperature ≥ 39.2 °C at 1400 and 2000 h in experiment 1 and at 1600 and 2200 h in experiment 2. Rectal temperature tended to be lowest in BEO cows at 1400 h relative to CTL in the experiment 2. Supplementation with BEO improved lactation performance relative to non-supplemented cows, and promoted a decrease in the sweating rate and body temperature of dairy cows.

Key words: Capsaicin. Monensin. Sweating rate. Thermoregulation.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Fórmula estrutural do carvacrol.....	17
Figura 2 - Estrutura química do carvacrol metil éster (A) e cimene (B).....	18
Figura 3 - Fórmula estrutural do cinamaldeído.....	21
Figura 4 - Fórmula estrutural do eugenol.....	24
Figura 5 - Fórmula estrutural da capsaicina.....	26
Figura 6 - Efeito do TRPV1 em resposta à capsaicina e ao calor sobre a termorregulação corporal.....	31
Figura 7 - Fórmula estrutural da monensina.....	49
Figura 8 - Mecanismo proposto para a vasodilatação do vaso sanguíneo promovido pela capsaicina.....	56
Figura 9 - Ativação de canais de cálcio via composto secundário de planta através de receptores de potencial transitório (TRP) em células imunes.....	61

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Figure 1. Temperature-Humidity Index (THI) inside the tie stall during the experiment. 2688 recordings at 30-min intervals. THI: 70.8 ± 4.68 (mean \pm SD). Proportion $>$ THI 68: 68.6 % of time. Temperature: 22.7 ± 4.2 °C. Humidity: 82.0 ± 14.4 %.....	120
Figure 2. Mean daily temperature (line) and humidity (column) during the 56-d experimental period.....	121
Figure 3. Feed efficiency (Milk/DMI) on treatments Control (---○---) or Blend of Essential Oils (—●—) and the mean daily Temperature-Humidity Index (THI) (■) during the experiment. $P < 0.01$ for treatment, $P < 0.01$ for day, and $P = 0.46$ for the interaction between treatment and day. Slice option of SAS: ^a $P \leq 0.05$, ^b $P \leq 0.10$, and ^c $P \leq 0.15$	121

- Figure 4. Dry matter intake (DMI) and milk yield (Milk) on treatments Control (---○---) or Blend of Essential Oils (—●—). DMI: $P = 0.05$ for treatment, $P < 0.01$ for day, and $P = 0.70$ for the interaction between treatment and day. Milk: $P = 0.04$ for treatment, $P < 0.01$ for day, and $P = 0.61$ for the interaction between treatment and day. cv = covariate (DMI $P = 0.40$ and Milk $P = 0.22$). Slice option of SAS: ^a $P \leq 0.05$, ^b $P \leq 0.10$, and ^c $P \leq 0.15$ 122
- Figure 5. Relationship between fecal viscosity (cP) and DM concentration (% of fresh). Fecal viscosity = $-12.722 + 2.9395$ Fecal DM, $r^2 = 0.43$, $P = 0.03$ 122
- Figure 6. Blood urea nitrogen (BUN) over time on treatments Control (---○---) or Blend of Essential Oils (—●—). $P = 0.96$ for treatment, $P < 0.01$ for hour, and $P = 0.16$ for the interaction between treatment and hour. 123
- Figure 7. Proportion of assessors who correctly identified a milk sample from cows fed a blend of essential oils (BEO) and the incorrect identifications. Two samples of control and 1 sample of BEO were presented to 63 assessors. Parameter estimate generated with the GENMOD procedure of SAS using logistic regression for binomial data. Control is zero. $P = 0.05$. Standard error = 0.36. Profile likelihood 95 % confidence interval = 0.001 - 1.424. 123

ARTIGO 2

- Figure 1. Temperature-Humidity Index (THI) inside the tie stall during the experiment. 2784 recordings at 30-min intervals. Mean THI 68.2 ± 4.44 (mean \pm SD). Proportion $>$ THI 68: 47.9 % of time. Temperature: $20.7 \pm 3.8^\circ\text{C}$. Humidity: 81.8 ± 11.3 %. 160
- Figure 2. Rectal temperature at 1600 h on treatments Control (CTL) (---○---), Blend of Essential Oils (BEO) (—●—), or Monensin (—■—) (MON). $P = 0.27$ for treatment, $P < 0.01$ for day, and $P = 0.18$ for the interaction between treatment and day. Slice option of SAS: a = CTL vs. BEO $P \leq 0.04$; b = BEO vs. MON $P = 0.04$; and c = BEO vs. MON $P \leq 0.12$. Temperature-Humidity Index (THI) inside the tie stall (■). 161

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1 - Consumo de matéria seca (CMS) e produções de leite (PL), gordura (Gord.) e proteína (Prot.) de vacas leiteiras suplementadas com óleos essenciais (OE).	42
Tabela 2 - Características fermentativas ruminais <i>in vivo</i> de bovinos de leite e de corte suplementados com óleos essenciais.	44
Tabela 3 - Consumo de matéria seca (CMS), produção de leite (PL), de gordura (PG) e de proteína (PP) de vacas leiteiras suplementadas com óleos essenciais (OE) ou monensina (MON).	53
Tabela 4 - Valores de taxa de sudção ($\text{g/m}^2/\text{h}$) de vacas leiteiras em estresse por calor.	58

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Table 1. Diet composition (% of DM) and particle size distribution (% of as fed) on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO)	110
Table 2. Intake, lactation performance, SCC, MUN, feed efficiency, BCS, and BW on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO)	111
Table 3. Total tract apparent digestibility of DM, OM, NDF, and non-NDF OM, urinary allantoin excretion and volume, and fecal viscosity and DM concentration on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO) ..	112
Table 4. Molar VFA proportions and total protozoa concentration in ruminal fluid on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO)	112
Table 5. Chewing activity and ingestion behavior on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO).....	112
Table 6. Proportion of intake in periods of the day and feed sorting behavior on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO)	113
Table 7. Skin surface and rectal temperatures and respiration rate on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO).....	114
Table 8. Proportion of cows with rectal temperature ≥ 39.2 °C at 0800, 1400, 2000, and 0200 h on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO). Observations/treatment = 112 (14 cows during 8 weeks)	114

Table 9.	Rectal and shoulder blade and rump skin surface temperatures at 1400 h and sweating rate on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO)...	115
Table 10.	Jugular blood acid-base balance at 1600 h on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO).....	116
Table 11.	Plasma glucose concentration 12 h post-feeding on d 14, 28, and 53 on treatments Control or Blend Essential Oils (BEO).....	116
Table 12.	Concentration of fatty acids in milk fat (% of total fatty acids) on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO).....	117
Table 13.	Milk fatty acids secretion (g/d) on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO).....	118
Table 14.	Milk odd-and branched-chain fatty acids (OBCFA) as a proportion of milk fatty acids and as daily secretion on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO).....	119

ARTIGO 2

Table 1.	Diet composition (% of DM) and particle size distribution (% of as fed) on treatments Control (CTL), Blend of Essential Oils (BEO), or Monensin (MON)	152
Table 2.	Intake, lactation performance, MUN, SCC, feed efficiency, BCS, and BW of dairy cows on treatments Control (CTL), Blend of Essential Oils (BEO), or Monensin (MON)	153
Table 3.	Total tract apparent digestibility of DM, OM, NDF, non-NDF OM (% of intake), and urinary allantoin (mmol/d) on treatments Control (CTL), Blend of Essential Oils (BEO) or Monensin (MON).....	154
Table 4.	Molar VFA proportions (% of total VFA) and total protozoa concentration ($\times 10^5$ /mL) in ruminal fluid on treatments Control (CTL), Blend of Essential Oils (BEO), or Monensin (MON).....	154
Table 5.	Proportion of intake in periods of the day (% of daily intake), feed particles sorting behavior (Observed/Predicted, %), and orts (% of offered TMR) on treatments Control (CTL), Blend of Essential Oils (BEO), or Monensin (MON)	155
Table 6.	Chewing activity and ingestion behavior on treatments Control (CTL), Blend of Essential Oils (BEO), or Monensin (MON).....	156

Table 7.	Skin surface and rectal temperatures and respiration rate on treatments Control (CTL), Blend of Essential Oils (BEO), or Monensin (MON).....	156
Table 8.	Proportion of cows (%) with rectal temperature $\geq 39.2^{\circ}\text{C}$ at 0800, 1600, and 2200 h on treatments Control (CTL), Blend of Essential Oils (BEO), or Monensin (MON). Observations/treatment: CTL and MON =160, and BEO = 144.....	157
Table 9.	Surface area, sweating rate, stored heat, body temperature, and evaporative heat loss (EHL) on treatments Control (CTL), Blend of Essential Oils (BEO), or Monensin (MON)	157
Table 10.	Blood flow, and diameter and area of the caudal artery on treatments Control (CTL), Blend of Essential Oils (BEO), or Monensin (MON)	158
Table 11.	Jugular blood acid-base balance 9 h post-feeding on treatments Control (CTL), Blend of Essential Oils (BEO), or Monensin (MON)	158
Table 12.	Blood urea-N (BUN) and plasma glucose at 0, 4, and 12 h post-feeding, and BHBA, D-lactate, aspartate aminotransferase (AST), and gamma glutamyl transferase (GGT) at 12 h post-feeding on treatments Control (CTL), Blend of Essential Oils (BEO), or Monensin (MON).....	159

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	13
1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Óleos essenciais: definição e caracterização química	15
2.2	Efeito antimicrobiano, uso como composto único na alimentação de ruminantes e propriedades terapêuticas	16
2.2.1	Carvacrol	16
2.2.2	Cinamaldeído	20
2.2.3	Eugenol	23
2.2.4	Capsaicina	25
2.3	Efeito da capsaicina sobre a temperatura corporal	29
2.4	Interações entre os óleos essenciais	32
2.5	Ação dos óleos essenciais sobre os microrganismos do rúmen	33
2.6	Efeito dos óleos essenciais sobre o metabolismo ruminal	36
2.7	Suplementação de ruminantes com óleos essenciais	40
2.8	Transferência dos óleos essenciais para o leite	47
2.9	Vias de excreção dos óleos essenciais do corpo	48
2.10	Monensina	49
2.11	Estudos comparativos: vacas leiteiras suplementadas com óleos essenciais ou monensina	51
2.12	Efeito do carvacrol, cinamaldeído, eugenol, capsaicina e monensina sobre a vasodilatação periférica	54
2.13	Taxa de sudação em bovinos	57
2.14	Frequência respiratória, temperatura retal e balanço do equilíbrio ácido-básico na avaliação da termorregulação corporal	59
2.15	Efeito dos óleos essenciais sobre a saúde de ruminantes	60
	REFERÊNCIAS	63
	ARTIGO 1 - SUPPLEMENTATION OF LACTATING DAIRY COWS WITH A BLEND OF ESSENTIAL OILS	80
	ARTIGO 2 - SUPPLEMENTATION OF LACTATING COWS WITH A BLEND OF ESSENCIAL OILS OR MONENSIN	124

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A inclusão de aditivos alimentares é uma prática comum na nutrição de ruminantes. Essa medida é adotada como estratégia para promover o uso eficiente de nutrientes pelos microrganismos ruminais e para minimizar as perdas de energia e de proteína durante a fermentação. Os ionóforos têm mostrado ser uma estratégia bem sucedida para melhorar a eficiência de produção de vacas leiteiras (DUFFIELD *et al.*, 2008). Entretanto, sua inclusão em dietas de ruminantes tem sido alvo de críticas, devido à possibilidade de resíduos em produtos de origem animal (OLIVER *et al.*, 2011). A União Europeia banuiu em janeiro de 2006, por cautela, o uso dos ionóforos na alimentação animal pelo regulamento 1831/2003/CEE. À partir dessa proibição, pesquisas com compostos secundários de plantas também chamados de óleos essenciais (OE) foram incentivadas em animais domésticos com o objetivo de conhecer seu potencial de uso.

O cinamaldeído, extraído da canela, o carvacrol do orégano, o eugenol do cravo da índia e a capsaicina da pimenta vermelha possuem ação antimicrobiana e podem manipular a fermentação ruminal (CALSAMIGLIA *et al.*, 2007). Em estudos *in vitro*, os OE promovem efeitos semelhantes à monensina, com redução da relação entre acetato e propionato, da concentração de amônia e da produção de metano (KLEVENHUSEN *et al.*, 2012). Efeito aditivo e sinérgico podem ocorrer entre os OE (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2011), portanto esses compostos geralmente são utilizados em combinação para potencializar seu efeito antimicrobiano.

Os OE podem impactar o desempenho animal independentemente da função ruminal, pois atuam de forma sistêmica (DURMIC e BLACHE, 2012; OH *et al.*, 2017c), após absorção gastrointestinal e respiratória (LEJONKLEV *et al.*, 2013). Os OE apresentam propriedades antioxidante (OH *et al.*, 2013), anti-inflamatória (OH *et al.*, 2015) e atuam sobre o metabolismo de glicose (OH *et al.*, 2017b) de vacas leiteiras. A capsaicina age sobre os mecanismos que promovem a termorregulação corporal (HORI, 1984) e seu efeito pode ser benéfico para animais propensos ao estresse térmico por calor.

O desempenho de ruminantes suplementados com OE não possui padrão de resposta específico (KHIAOSA-ARD e ZEBELI, 2013) e a ampla variedade de compostos e de doses utilizadas na experimentação animal torna desafiador a comparação de resultados. Grande parte dos estudos sobre a inclusão de OE em dietas de vacas leiteiras foram conduzidos *in vitro* (KLEVENHUSEN *et al.*, 2012), a curto prazo (BENCHAAR *et al.*, 2008;

SPANGHERO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2010; TAGER e KRAUSE, 2011) e poucos avaliaram comparativamente o uso de OE e monensina (BENCHAAR *et al.*, 2006; BENCHAAR, 2015; VENDRAMINI *et al.*, 2016; DRONG *et al.*, 2016a).

Duas estratégias foram realizadas para investigar a inclusão de uma mistura de OE microencapsulados composta pelo carvacrol, cinamaldeído, eugenol e capsaicina em dietas de vacas leiteiras. Objetivou-se com o primeiro experimento avaliar o consumo, desempenho leiteiro, eficiência alimentar, digestibilidade dos nutrientes no trato total, perfil de fermentação ruminal, comportamento ingestivo, termorregulação corporal, balanço ácido-básico venoso, perfil de ácido graxo na gordura do leite e análise sensorial do leite. No segundo experimento foi avaliado o desempenho leiteiro, comportamento ingestivo e de seleção de partículas da dieta, digestibilidade dos nutrientes no trato total, termorregulação corporal, balanço ácido-básico venoso e variáveis sistêmicas de vacas leiteiras suplementadas com OE ou monensina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Óleos essenciais: definição e caracterização química

Os OE são compostos oriundos de plantas que variam em volatilidade e podem ser obtidos por destilação a vapor ou por processos mecânicos (SCHMIDT, 2010). Óleos produzidos por outros métodos de extração, como solventes orgânicos ou dióxido de carbono supercrítico, são considerados resinas ou oleorresinas e não são OE verdadeiros (KUBECZKA, 2010). O termo “óleo” é devido às suas características lipofílicas, e “essencial” deriva da sua propriedade aromatizante. Os OE são também chamados de fitonutrientes, compostos bioativos, extrato de plantas ou compostos secundários de plantas.

Em uma única planta podem ser encontrados vários compostos e sua composição pode variar de acordo com o tipo de solo, com as estações do ano e com a localização geográfica (COSENTINO *et al.*, 1999). Os OE podem ser sintetizados a partir de metabólitos de reserva provenientes de compostos primários em excesso e não estão envolvidos nos processos bioquímicos primários, como crescimento ou reprodução da planta (GOTTLIEB, 1990). Esses compostos são sintetizados e armazenados por várias estruturas epidermais, tais como raízes, folhas, flores, pétalas, sementes, caules e frutos, os quais são liberados pelas glândulas secretoras ou pelos tricomas glandulares (RODRIGUEZ *et al.*, 1984). Esses compostos apresentam função de proteção contra predadores, insetos ou herbívoros e atuam como atrativo para animais polinizadores.

Existe grande diversidade de OE na natureza. Estima-se que haja 3.000 compostos, sendo 300 comercialmente importantes (VAN de BRAAK e LEIJTEN, 1999). Esses compostos possuem grande aplicação na aromaterapia como ferramenta terapêutica (HERZ, 2016; KAZEMZADEH *et al.*, 2016), na medicina humana (LUDY *et al.*, 2012; RANASINGHE *et al.*, 2013) e na conservação de alimentos (ULTEE *et al.*, 1998). Portanto, devido à grande utilização dos OE na indústria farmacêutica e alimentícia, muitos são sintetizados artificialmente em forma purificada e são denominados compostos idênticos ao natural, sintéticos ou OE reconstituídos.

Os OE são classificados de acordo com sua estrutura química em dois grandes grupos, os terpenos e os fenilpropanos, ambos com baixo peso molecular (AKTHAR *et al.*, 2014) e os alcalóides, que são aminas cíclicas com um átomo de nitrogênio e apresentam menor volatilidade comparado aos outros grupos (SELL, 2010). Os alcalóides são biossinteticamente provenientes de aminoácidos.

Os terpenos são sintetizados a partir de intermediários do ciclo do ácido cítrico, pelas vias do mevalonato ou deoxixilulose fosfato (DEWICK, 2002). Estes compostos apresentam grande variedade de hidrocarbonetos alifáticos, podendo ser saturados ou insaturados, com estruturas lineares ou ramificadas, com funções de ácido, álcool, aldeído ou éster e alguns compostos contêm nitrogênio ou enxofre (DORMAN e DEANS, 2000). Os terpenos são sintetizados nos plastídios das plantas e derivam da fusão repetitiva de unidades de isopentenil pirofosfato e seu isômero dimetilalil pirofosfato (unidade isopreno, C₅H₈) pela enzima fenil pirofosfato sintase. As reações subsequentes são catalisadas pela enzima 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato para a formação de moléculas de pirofosfato de prenila e posteriormente de várias famílias terpênicas, como monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅) e diterpenos (C₂₀) (SANGWAN *et al.*, 2001).

O grupo dos fenilpropanos, que são menos comuns na natureza, refere-se a compostos com uma cadeia de três carbonos ligados a um composto aromático que é originado majoritariamente do aminoácido fenilalanina e em menor extensão da tirosina. Esses compostos originam-se de intermediários da glicólise e da via das pentoses, via ácido chiquímico. A sequência das reações metabólicas são catalisadas pela enzima 3-deoxi-D-heptulosanato-7-fosfato sintase e pela enzima amônia fenilalanina. Posteriormente, o ácido cinâmico é convertido à molécula de chavicol, que dará origem aos fenilpropanos (SANGWAN *et al.*, 2001).

A volatilidade dos OE está relacionada ao baixo peso molecular e à presença de grupos funcionais que reagem com fatores do ambiente como luz, oxigênio, temperatura e umidade. A microencapsulação é uma tecnologia que visa reduzir as perdas por volatilização por meio da estabilização dos componentes, promovendo o prolongamento da atividade biológica e o aumento da vida de prateleira (WANG *et al.*, 2016). Os processos de encapsulação de substâncias voláteis são geralmente patenteados e as principais técnicas descritas relatam a utilização de oligossacarídeos, goma arábica, quitosana, alginato, polímeros hidrofílicos, dentre outros (KARLSEN, 2010).

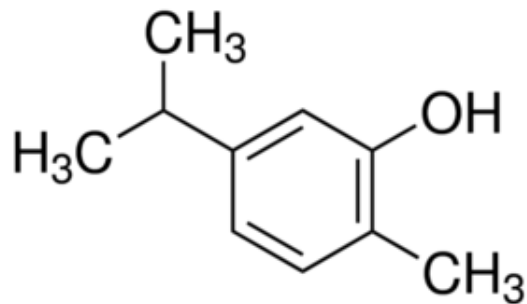
2.2 Efeito antimicrobiano, uso como composto único na alimentação de ruminantes e propriedades terapêuticas

2.2.1 Carvacrol

O carvacrol, 2-metil-5-(1 metiletil)-fenol (FIGURA 1) pertence ao grupo dos monoterpenos. É um OE encontrado principalmente em plantas de orégano (*Origanum vulgare*), porém também esta presente em outras plantas, como no alecrim pimenta (*Lippia*

sidoides) (PEIXOTO-NEVES *et al.*, 2010). O efeito antimicrobiano do carvacrol foi relacionado ao grupamento fenólico na estrutura química, que tem efeito bacteriostático e que atua sobre a permeabilidade da membrana dos microrganismos (HEIPIEPER *et al.*, 1991). A toxicidade está relacionada com a hidrofobicidade e com a capacidade de alteração da proporção de proteínas e de lipídeos na membrana plasmática (KEWELOH *et al.*, 1990). La Storia *et al.* (2011) comprovaram por microscopia de força atômica que a membrana externa de diferentes espécies bacterianas tratadas com carvacrol diferiram significativamente na estrutura da superfície celular, com diminuição do diâmetro e do comprimento dos microrganismos.

Figura 1 - Fórmula estrutural do carvacrol.

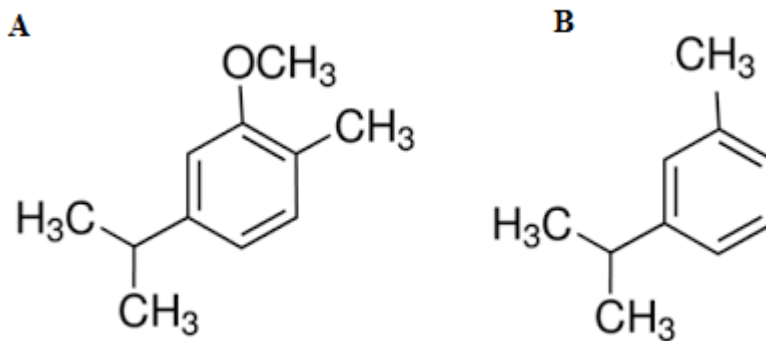


As propriedades antimicrobianas foram elucidadas em estudos realizados com a bactéria gram-positiva *Bacillus cereus*. O carvacrol modifica o potencial de membrana, causa queda do pH intracelular e age como um carreador transmembrana de cátions monovalentes por meio da troca do próton da hidroxila por outro íon. O carvacrol não dissociado difunde-se pela membrana para o citoplasma da célula, ocorre dissociação com a liberação do próton (H^+) e ligação a outro íon, como o potássio (K^+). O composto retorna ao meio extracelular na forma não dissociada, onde ocorre a liberação do cátion. Dessa forma, ocorre alteração do *pool* de H^+ nos meios intra e extracelular da bactéria, o que ocasiona esgotamento energético e comprometimento das funções primordiais da célula (ULTEE *et al.*, 1999).

Posteriormente, Ultee *et al.* (2002) investigaram a ação do timol, carvacrol, carvacrol metil éster, mentol e cimene sobre o crescimento da bactéria *Bacillus cereus* e concluíram que a atividade antimicrobiana do carvacrol é devida à presença do grupo hidroxila na estrutura fenólica, que expande e desestabiliza a membrana celular e também a um sistema de deslocamento de elétrons, que facilita a dissociação do H^+ da hidroxila. O carvacrol metil éster e o cimene (FIGURA 2) que não possuem em sua estrutura a hidroxila não alteraram a

taxa de crescimento bacteriano. A posição da hidroxila pode influenciar a configuração estrutural das membranas celulares, porém esse fato é menos impactante sobre a ação antimicrobiana (DORMAN e DEANS, 2000).

Figura 2 - Estrutura química do carvacrol metil éster (A) e cimene (B).



Há relatos de outros mecanismos de ação do carvacrol sobre a célula bacteriana, como: alteração da força próton-motriz das atividades celulares, o que pode promover o vazamento de constituintes intracelulares vitais (JUVEN *et al.*, 1994); rompimento da camada de lipopolissacarídeos de bactérias gram-negativas, resultando na redução dos níveis de ATP intracelular e aumento do ATP extracelular (HELANDER *et al.*, 1998) e prejuízo no sistema enzimático, com alteração na produção de energia para síntese de componentes estruturais da célula (ULTEE *et al.*, 2000).

Em experimentação com bovinos leiteiros, a partir de dados obtidos *in vitro* por Tekippe *et al.* (2010) na qual o carvacrol apresentou maior potencial de redução de produção de metano ruminal, Tekippe *et al.* (2011) utilizaram oito vacas leiteiras, sendo seis fistuladas no rúmen para avaliar o efeito da suplementação de 500 g/d de folhas de orégano sobre o desempenho leiteiro e a produção de metano. O teste foi conduzido em *crossover* com dois períodos de 21 d. As amostras de fluido ruminal foram obtidas durante dois dias consecutivos na terceira semana experimental. O extrato das folhas de orégano continha 90,8 % de carvacrol. Não houve efeito sobre a produção de leite (43,8 kg/d), mas a inclusão de folhas de orégano melhorou a eficiência alimentar quando a produção de leite foi corrigida para 3,5 % de gordura (1,54 vs. 1,64), pois houve aumento na produção de gordura do leite (1,37 vs. 1,45 kg/d). A concentração de nitrogênio no plasma (8,8 vs. 9,5 mg/100 mL) e a concentração de amônia ruminal (4,5 vs. 5,5 mM) foram aumentadas e a produção de metano (31,8 vs. 18,8 g/h) e o nitrogênio urinário foram reduzidos (240 vs. 230 g/d) em vacas suplementadas com

folhas de orégano. Os autores discutiram que a queda no nitrogênio urinário pode indicar melhor utilização pós ruminal do nitrogênio em vacas suplementadas com orégano.

Hristov *et al.* (2013) alocaram oitos vacas em quadrado latino 4 x 4 com períodos de 20 d para estudar a suplementação de 0, 250, 500, 750 g/d de folhas de orégano. As coletas foram realizadas nos últimos seis dias de cada período experimental. Os tratamentos foram misturados a uma pequena porção da dieta. A produção de leite média foi de 44 kg/d sem efeito de tratamento. Porém, houve queda linear no consumo de matéria seca (CMS) com consequente aumento na eficiência alimentar das vacas suplementadas. A produção de metano (g/d), as concentrações de butirato e isobutirato (mM) no rúmen e a concentração de nitrogênio ureico no leite foram reduzidos pelo aditivo. A população da bactéria fibrolítica *Ruminococcus flavefaciens* foi aumentada de forma quadrática na dose de 250 g/d e caiu com a inclusão de 750 g/d. Houve queda de duas unidades percentuais na digestibilidade da FDN em vacas suplementadas com folhas de orégano.

O carvacrol também apresenta efeito inseticida. Estudos têm demonstrado que o carvacrol age sobre artrópodes por inibição da enzima acetilcolinesterase, importante na quebra da acetilcolina (ANDERSON e COATS, 2012). O composto também apresenta efeito inibitório da ligação [14C]-nicotina nas membranas de moscas, que ocasiona a ligação com os receptores nicotínicos da acetilcolina (TONG *et al.*, 2013).

A atividade anti-inflamatória do carvacrol foi relacionada com a supressão da enzima ciclooxigenases-2 e ativação dos receptores proliferadores de peroxissoma α e γ (HOTTA *et al.*, 2010), com a diminuição da produção de interleucina-1 β e *prostaglandina* E₂, através da liberação de interleucina-10 (LIMA *et al.*, 2013) e com o receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1), canal não seletivo envolvido na liberação de mediadores pro-inflamatórios e relacionados com a liberação de neutrófilos (LIMA *et al.*, 2013). Em adição, a ativação do TRPA1 também pode explicar a pungência do orégano, pois este receptor é também encontrado na língua e no nariz (XU *et al.*, 2006).

O carvacrol apresenta atividade ansiolítica e antidepressiva, provavelmente pelo estímulo dos receptores dopaminérgicos D1 e D2, que estão envolvidos no controle dos movimentos do corpo e das emoções (MELO *et al.*, 2010). Esses autores administraram em camundongos doses de 12,5; 25 e 50 mg de carvacrol e 1 ou 2 mg de diazepam por kg de peso vivo (ansiolítico da classe das benzodiazepinas) por via oral. Os testes de labirinto de cruz elevado e campo aberto foram realizados para a avaliação da atividade ansiolítica. A atividade motora foi mensurada pelo teste de rota-ord. O carvacrol e o diazepam diminuíram a ansiedade, porém os animais tratados com carvacrol não apresentaram alteração na atividade

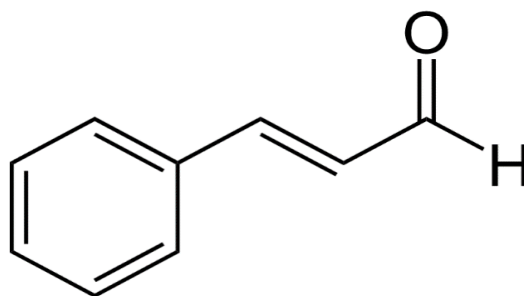
locomotora. Os resultados demonstraram que o efeito ansiolítico do composto está relacionado com a ação no receptor do ácido gama aminobutírico A, neurotransmissor envolvido com os processos de ansiedade.

O efeito protetor contra o estresse oxidativo do carvacrol foi relatado por Samarghandian et al. (2016). Diariamente foram injetados em ratos 20, 30 ou 40 mg/kg de peso vivo por via intraperitoneal durante 21 d. Houve queda do teor do marcador do estresse oxidativo, o malondialdeído e aumento dos níveis da atividade da glutathiona reduzida, da dismutase superóxido, da glutathiona peroxidase e da catalase. Os resultados indicaram que esse composto pode inibir o estresse crônico oxidativo induzido no cérebro, no fígado e nos rins. De encontro a estes resultados, Aristatile et al. (2010) avaliaram o efeito do carvacrol sobre a peroxidação lipídica celular induzida pelos raios ultravioletas B em linfócitos humanos. O tratamento com carvacrol 30 min antes da exposição aos raios ultravioletas resultou em declínio significativo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e dos hidroperóxidos de lípidos, que promovem danos em proteínas e no DNA. O carvacrol também possui efeito antitumoral, com evidências de redução da apoptose em células de carcinoma no fígado (YIN et al., 2012). Alguns achados sugerem que essa atividade não é devida exclusivamente à sua citotoxicidade, mas possivelmente à prevenção da adição de uma molécula hidrofóbica a uma proteína (ZEYTINOGLU *et al.*, 2003).

2.2.2 Cinamaldeído

O cinamaldeído (3-fenil-2-propenol fenol. Figura 3) pertence ao grupo dos fenilpropanos, OE encontrado principalmente em árvores de canela (*Cinnamomum* spp.). O cinamaldeído é um aldeído reativo devido à α , β insaturação em sua cadeia lateral e esta característica estrutural tem mostrado ser essencial para sua atividade antibactericida (BAE *et al.*, 1992). Esse composto apresenta efeito antimicrobiano sobre uma variedade de bactérias e também sobre fungos, como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nididans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus terreus*, dentre outros (RANASINGHE *et al.*, 2013). O óleo de *Cinnamomum zeylanicum* também apresenta ação mosquicida contra o *Culex quinquefasciatus*, o *Anopheles tessellatus* e o *Aedes aegypti* (SAMARASEKERA *et al.*, 2005).

Figura 3 - Fórmula estrutural do cinamaldeído.



Chang *et al.* (2001) avaliaram o extrato de folhas de dois clones (A e B) de plantas de canela (*Cinnamomum osmophloeum*) e suas principais substâncias purificadas sobre o crescimento de cinco bactérias gram-positivas e quatro gram-negativas. Os compostos purificados avaliados foram o cinamaldeído (CIN), benzaldeído (BEN), linalol (LIN), α terpineol (TER), geraniol (GER), eugenol (EUG), cinnamil acetato (CINA) e coumarin (COU). Os extratos A e B continham respectivamente: 8,35 e 76 % CIN; 0,93 e 3,2 % de BEN; 9,83 e 0,24 % de LIN; 4,62 e 0 % de TER; 4,73 e 2,9 % de GER; 0 e 1 % de EUG; 9,04 e 0,51 % de CINA e 0 e 0,26 % de COU. O extrato B apresentou eficácia antimicrobiana contra todas as bactérias avaliadas, enquanto o extrato A apresentou efeito apenas sobre o *Staphylococcus aureus* e *Vibrio parahemolyticus*. A potência da atividade bacteriana seguiu a ordem de CIN > CINA > COU > TER = GER = EUG, não foram observados efeitos do LIN em forma pura.

A ação antimicrobiana da molécula de cinamaldeído está relacionada com a ligação dupla conjugada e à sua cadeia de CH fora do anel aromático (CHANG *et al.*, 2001). Esse composto pode promover a inibição da captação e da utilização de glicose pelos microrganismos em meio de cultivo. Cepas de *L. monocytogenes* foram tratadas com 40 mM de cinamaldeído e foi relatada ausência de aumento de ATP celular quando as células foram expostas ao tratamento antes da energização com glicose e queda acentuada de ATP celular quando foram primeiramente energizadas e depois tratadas. Os resultados sugerem que ocorre interação do cinamaldeído com as membranas celulares bacterianas. Essa interação implica em rompimento suficiente para alterar a força próton motriz causando o escape de pequenos íons sem promover o vazamento dos componentes celulares (GILL e HOLLEY, 2004).

As paredes celulares bacterianas contêm várias enzimas com atividade ATPase, como proteínas transportadoras dependentes de ATP e F1F0 ATPase que estão relacionadas com a geração de energia e com a regulação de pH intracelular (SHABALA *et al.*, 2002). Existem vários relatos da ação inibitória do cinamaldeído sobre a atividade enzimática de bactérias.

Meades *et al.* (2010) evidenciaram que o oxigênio do grupo carbonila do trans-cinamaldeído liga-se ao sítio de ligação da biotina e inibe a enzima acetil coA carboxilase em *Escherichia coli*, enzima responsável pela produção de malonil coA para a biossíntese de ácidos graxos. A síntese de parede celular em *B. cereus* foi reduzida com 2,36 mM de cinamaldeído em meio de cultivo (KWON *et al.*, 2003).

O cinamaldeído alterou a estrutura secundária da enzima hidrolítica β -galactosidase, presente em células vegetais e animais (WANG *et al.*, 2017) e inibiu a biossíntese da enzima histidina descarboxilase em *Enterobacter aerogenes* (WENDAKOON e SAKAGUCHI, 1995). Gil e Holley (2006) relataram queda de 84 % na atividade da enzima ATPase em *Escherichia coli* e de 12 % em *L. monocytogenes*, ambas tratadas com 10 mM de cinamaldeído. Também em pesquisas com *Escherichia coli* foi observada inibição da proteína FtsZ e da taxa de hidrólise da GTPase em resposta à adição de cinamaldeído no meio de cultivo. O cinamaldeído se ligou à FtsZ inibindo a função da GTPase, enzima responsável pela diferenciação celular durante os processos de divisão, biossíntese de proteínas e no transporte de vesículas (DOMADIA *et al.*, 2007).

Bezerras leiteiras desmamadas foram suplementadas com cinamaldeído (0, 1, 2, 3 ou 4 mg/kg de peso vivo) durante 14 d. Os tratamentos foram fornecidos com milho moído e o teste de preferência alimentar foi avaliado pelo ranqueamento do CMS. Os resultados indicaram que o cinamaldeído não alterou o consumo de alimento, mas que possui potencial para melhorar a saúde animal e a utilização de nutrientes no trato digestivo total (CHAPMAN *et al.*, 2016).

Em estudos com novilhos de corte, Yang *et al.* (2010a) avaliaram a suplementação de cinamaldeído sobre o consumo de alimento e digestibilidade dos nutrientes. As doses testadas foram 0, 400, 800 e 1.600 mg/animal/d. Houve aumento quadrático no CMS e queda linear no peso corporal, na digestibilidade da matéria orgânica (MO) e da fibra em detergente neutro (FDN) em resposta ao aditivo. O consumo de matéria orgânica fermentável no rúmen (kg/d) diminuiu de forma quadrática com a suplementação de cinamaldeído. Yang *et al.* (2010b) confinaram 70 novilhos durante 112 d e os mesmos tratamentos fornecidos por Yang *et al.* (2010a) foram administrados, mas com um tratamento adicional, a monensina. Os tratamentos foram fornecidos uma vez ao dia sobre a dieta oferecida. A suplementação com cinamaldeído aumentou de forma quadrática o CMS e não alterou as características de carcaça dos animais. Houve queda linear na eficiência alimentar e aumento quadrático do ganho diário médio dos novilhos suplementados com cinamaldeído até o dia 28 do período experimental. Não houve efeito da monensina sobre o desempenho dos animais. As concentrações plasmáticas de

ácidos graxos não esterificados caiu 22 % e o nitrogênio ureico aumentou em novilhos alimentados com cinamaldeído ou monensina comparado ao grupo controle.

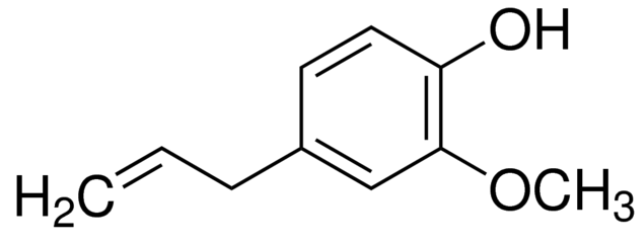
Chaves *et al.* (2011) utilizaram 48 borregos para investigar a suplementação com cinamaldeído durante 18 semanas sobre o desempenho e características de carcaça. Os tratamentos foram: 0, 100, 200 e 400 mg de cinamaldeído/kg MS da dieta. Não foi observado efeito de tratamento sobre o CMS (1,03 kg/d), ganho diário de peso (237 g/d), características da carcaça, perfil fermentativo do rúmen e análise sensorial da carne. Houve tendência de aumento da concentração de amônia ruminal (18,7 vs. 27.1 mM) em borregos alimentados com cinamaldeído. A concentração sérica de nitrogênio ureico foi reduzida pela dose de 200 mg de cinamaldeído.

Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que o cinamaldeído tem efeito benéfico sobre a saúde humana, como efeito anti-úlceras no estômago, anti-inflamatório, hipoglicêmico, redutor da pressão sanguínea, hipocolesterolêmico, inibidor da doença de Alzheimer e da osteoclastogênese (RANASINGHE *et al.*, 2013). A administração de extrato de *Cinnamomum zeylanicum* (0,01, 0,05 e 0,1 g por kg de peso vivo) por 28 d reduziu o impacto da toxicidade do tetracloreto de carbono sobre os marcadores séricos de lesão hepática (aspartato transaminase e alanina aminotransferase). Além disso, o tratamento com extrato aumentou acentuadamente os teores das enzimas superóxido dismutase e catalase em hepatócitos de ratos (EIDI *et al.*, 2012). Rao e Lakshmi (2012) induziram diarreia em camundongos usando sulfato de magnésio e observaram que extrato de *Cinnamomum zeylanicum* nas doses de 100 e 200 mg por kg de peso vivo reduziram a ocorrência da diarreia em até 80 %.

2.2.3 Eugenol

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol. Figura 4) é um composto volátil pertencente ao grupo dos fenilpropanos, sendo o principal constituinte do óleo extraído do cravo da Índia (*Eugenia caryophyllata*). O composto possui amplo espectro inibidor do crescimento de bactérias gram-positivas e negativas (DORMAN e DEANS, 2000). O efeito antimicrobiano do eugenol talvez explique porque a pulverização com fungicidas em sementes de cravo não melhora a germinação (MAEDA *et al.*, 1991). O eugenol exerce atividade antimicrobiana pela interação com a membrana celular, com atuação sobre o transporte de elétrons e reações dependentes de enzima.

Figura 4 - Fórmula estrutural do eugenol.



A hidroxila do eugenol se liga às proteínas nas células e essa interação causa queda na ação enzimática de bactérias gram-positivas (WENDA KOON e SAKAGUCHI, 1995). Gill e Holley (2004) sugeriram que o mecanismo antimicrobiano estaria relacionado com a inibição de enzimas glicolíticas que impedem a utilização de glicose pela célula bacteriana. A atividade da enzima ATPase em membranas de *Escherichia coli* foi diminuída pela presença de 10 mM de eugenol no meio de cultivo, ocasionando baixa taxa de crescimento bacteriano (GILL e HOLLEY, 2006).

Benchaar *et al.* (2012) avaliaram a suplementação de eugenol sobre a digestão, características fermentativas do rúmen e o perfil de ácidos graxos na gordura do leite de vacas leiteiras em diferentes dietas. A dose avaliada foi de 50 mg de eugenol/kg de MS da dieta. As dietas continham 65 % ou 35 % de forragem na MS. Quatro vacas fistuladas no rúmen foram utilizadas em quadrado latino 4 x 4 com tratamento fatorial 2 x 2. Os períodos experimentais foram de 28 d com mensurações na quarta semana. A adição do eugenol às dietas não afetou o CMS, a produção de leite (31,6 kg/d) e a digestibilidade dos nutrientes. Não foi observada interação entre dieta e suplementação. Houve aumento da proporção molar de isobutirato e isovalerato no fluido ruminal de vacas alimentadas com eugenol.

Benchaar *et al.* (2015) alocaram oito vacas canuladas no rúmen em quadrado latino 4 x 4 para avaliar doses crescentes de eugenol (0, 25, 50 e 75 mg/kg de MS da dieta) sobre o desempenho, a produção de metano e o metabolismo de nitrogênio de vacas leiteiras. Os períodos experimentais foram de 28 d com mensurações na quarta semana. A produção de leite (35,8 kg/d) e o CMS foram similares entre os tratamentos. A produção de gordura no leite foi reduzida de forma quadrática com a suplementação com eugenol. Houve tendência de aumento linear crescente na concentração de protozoários no fluido ruminal e no consumo de nitrogênio em vacas alimentadas com o aditivo. A proporção molar de isobutirato e isovalerato no fluido ruminal reduziu linearmente em vacas suplementadas com eugenol. Não houve efeito de tratamento sobre a produção de metano. A suplementação com eugenol afetou

fracamente o perfil de ácidos graxos na gordura do leite. Houve tendência de queda linear na proporção de 4:0 e aumento linear de 18:1 *trans*-16, 18:1 *trans*-9 e 18:2 *trans*-9, *trans*-12.

Além de bactericida, estudos evidenciaram que o eugenol tem atividade nematocida (TSAO e YU, 2000), inseticida (EL-HAG *et al.*, 1999), antiviral (YUKAWA *et al.*, 1996) e fungicida (DELESPAUL *et al.*, 2000). O eugenol é também utilizado como analgésico bucal em odontologia (OHKUBO *et al.*, 1997).

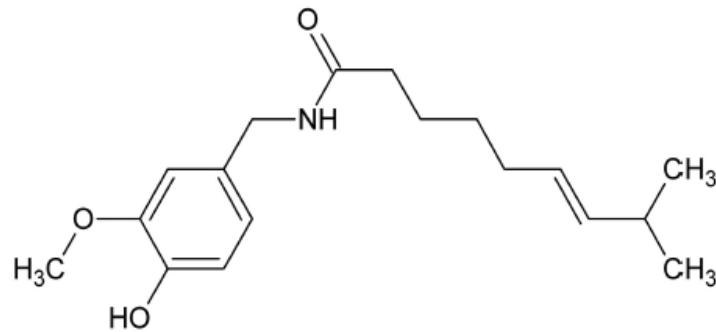
Em camundongos, o eugenol diminuiu a expressão da ciclooxygenase 2 em macrófagos ativados por lisofosfatidilcolina (KIM *et al.*, 2003) e suprimiu a atividade da lipooxygenase-5 em células polimorfonucleares humanas (RAGHAVENRA *et al.*, 2006), apresentando efeito pró-inflamatório. Em adição, o eugenol bloqueia a secreção de fatores de necrose tumoral alfa e *interleucina 1 beta*, resultados observados através de incubações *in vitro* de macrófagos alveolares porcinos (LIU *et al.*, 2015). A atividade antioxidante do eugenol decorre da estrutura metóxi-fenólica que é capaz de inibir a peroxidação lipídica por radicais intermediários de espécies reativas de oxigênio (RANASINGHE *et al.*, 2013).

2.2.4 Capsaicina

A capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida. Figura 5) é um alcalóide fenólico de carácter lipofílico encontrado em pimentas vermelhas (*Capsicum* ssp.), também conhecida como capsaicinóide. O ardor da pimenta é devido à presença do NH na molécula, tipos de pimenta que possuem oxigênio no lugar de NH não apresentam essa característica e são chamadas pimentas doces ou não pungentes (IWAI *et al.*, 2003).

A atividade antimicrobiana dessa molécula deve-se basicamente ao composto fenólico em sua composição química (MANAIA, 2011). Kalia *et al.* (2012) observaram *in vitro* que a capsaicina reduziu a concentração inibitória mínima do antibiótico ciprofloxacina e a invasão intracelular do *Staphylococcus aureus* em macrófagos de camundongos. Ainda neste estudo, a capsaicina reduziu a bomba de efluxo, que é o bombeamento ativo de antimicrobianos do meio intracelular para o meio extracelular e que promove a resistência bacteriana. Apesar de ser prejudicial à mucosa gástrica, a capsaicina apresentou ação bactericida para *Helicobacter pylori*, bactéria que provoca úlcera crônica em humanos.

Figura 5 - Fórmula estrutural da capsaicina.



A capsaicina possui alta taxa de absorção intestinal (SURESH e SRINIVASAN, 2010). Além disso, seus receptores são encontrados na cavidade oral, ou seja, eles podem ser ativados sem passar pelo trato digestivo (INOUE *et al.*, 2007; LUDY *et al.*, 2012). Em animais domésticos, a ação ruminal desse composto foi relatada como insignificante (CARDOZO *et al.*, 2004; CASALMIGLIA *et al.*, 2007). Porém, os efeitos pós ruminais são os que ganham destaque na experimentação com ruminantes, como observado em estudos recentes (WALL e BRAVO, 2016; STELWAGEN *et al.*, 2016; OH *et al.*, 2017a) que avaliaram o efeito da capsaicina protegida no rúmen (CAP_{PR}) sobre o metabolismo e desempenho animal.

Wall e Bravo (2016) dividiram 196 vacas em estágios lactacionais (1 a 99, 100 a 199 e > 200 dias em lactação) e avaliaram a suplementação de uma mistura composta pela CAP_{PR} e por um adoçante comercial (100 mg/d) durante 10 semanas. Todas as vacas receberam 300 mg/d de monensina. Houve interação entre paridade e tratamento para a produção de leite. A produção de leite foi reduzida em vacas primíparas (34,7 vs. 32,1 kg/d) e aumentada em vacas multíparas (41,4 vs. 44,6 kg/d) em resposta ao aditivo. A secreção de gordura do leite (1,6 kg/d) e de proteína (1,2 kg/d) não foi afetado pelos tratamentos. Houve aumento no peso das vacas primíparas suplementadas com CAP_{PR} com menos de 100 dias em lactação (590 vs. 616 kg), sem resposta para as vacas multíparas. A prevalência de cetose subclínica, indicada pela proporção de gordura e de proteína do leite, foi diminuída pelo aditivo (20 vs. 15 %).

Stelwagen *et al.* (2016) suplementaram vacas holandesas (1 a 100 dias em lactação) com 100 mg/d de CAP_{PR}. Os animais foram mantidos a pasto durante o período experimental. Houve aumento na produção de leite de vacas suplementadas com CAP_{PR}. Entretanto, o efeito foi evidenciado a partir dos 35 dias pós-parto (25,7 vs. 27,7 kg/d). Ainda neste tratamento foi observado aumento da produção de gordura, de proteína e de lactose no leite.

Não houve diferença no peso corporal. Houve queda na proporção de vacas com cetose no grupo CAP_{PR}, baseado na relação gordura e de proteína no leite.

Oh *et al.* (2017a) investigaram os efeitos da CAP_{PR} sobre o desempenho leiteiro e resposta ao teste de tolerância à glicose em vacas leiteiras. Nove vacas holandesas foram utilizadas em delineamento quadrado latino 3 x 3 com períodos de 28 d. A capsaicina tendeu a aumentar a produção de leite (42,8; 44,7 e 43,9 kg/d) para as doses de 0, 100 e 200 mg/d, respectivamente. Houve aumento linear na eficiência alimentar (1,48; 1,52 e 1,57). A digestibilidade da MS, da MO e da FDN foram aumentadas de forma linear e a concentração de leptina sérica tendeu ser menor em vacas suplementadas. Durante o desafio com administração intravenosa de glicose, houve queda na concentração de insulina em resposta à capsaicina, mas a concentração de glicose não foi afetada pelo aditivo. Os autores propõem que houve redirecionamento de glicose para a síntese de lactose no leite em vacas alimentadas com CAP_{PR}.

Ainda em pesquisas com vacas em lactação, dose de 2 g/d de extrato de *Capsicum frutescens* L. e *Capsicum anum* L. var. *Concooides* contendo 6 % de capsaicina administrado no abomaso diminuiu o desempenho leiteiro (OH *et al.*, 2013). Oh *et al.* (2015) avaliaram doses crescentes de capsaicina sobre o desempenho de vacas leiteiras. Oito vacas multíparas, sendo três canuladas no rúmen foram utilizadas em quadrado latino 4 x 4. O período experimental foi de 25 d, sendo 14 de adaptação e 11 de coletas. Os tratamentos foram fornecidos sobre a dieta total. A produção de leite tendeu a variar de forma quadrática (50,5; 51,9; 51,5 e 50,3 kg/d), com o aumento da dose de capsaicina (0, 250, 500 e 1.000 mg/d) respectivamente. O consumo de matéria seca, a eficiência alimentar e o peso corporal não foram alterados pela capsaicina. A produção de gordura no leite, a produção de leite corrigido para 4 % de gordura e o leite corrigido para energia aumentaram em vacas suplementadas com capsaicina quando comparado ao grupo controle.

Rodríguez-Prado *et al.* (2012) estudaram doses de capsaicina (0, 125, 250 e 500 mg/d) sobre o consumo de alimento e o perfil fermentativo de novilhos alimentados com dieta de alto grão. Foram utilizados quatro novilhos (438 ± 71 kg) fistulados no rúmen em delineamento quadrado latino 4 x 4 com períodos de 25 d. O pH ruminal variou de 5,84 a 6,03 durante os dias de amostragem. Foram observados aumento linear no CMS e queda no pH ruminal em resposta ao aumento da dose do aditivo. Houve redução na proporção molar de acetato ruminal e aumento na concentração de N-amoniaco no rúmen, ambos de forma linear. Não houve efeito de tratamento sobre a proporção molar de propionato, butirato e lactato no fluido ruminal de novilhos alimentados com capsaicina.

As pimentas são frequentemente utilizadas como aditivo alimentar e para fins terapêuticos. Um estudo prospectivo com adultos com idade média de 18,9 anos mostrou que o consumo frequente de pimenta vermelha reduziu em 13 % o risco de morte súbita e tendeu reduzir doenças vasculares (CHOPAN e LITTENBERG, 2017). O efeito antioxidante e anti-inflamatório da capsaicina pode reduzir doenças crônicas (CHEN *et al.*, 2001; HALVORSEN *et al.*, 2006), incidência de câncer (AGGARWAL *et al.*, 2009), hipertensão, doenças cardiovasculares, obesidade e diabetes tipo 2 em humanos (LEE *et al.*, 2011).

Ahuja *et al.* (2006) conduziram um experimento com humanos para avaliar o efeito pós prandial da inclusão de uma dieta contendo 30 g de uma mistura de pimentas durante quatro semanas. Os autores sugeriram que a quantidade de insulina necessária para controlar o aumento pós-prandial de glicose é menor em pessoas que consomem pimenta. Em camundongos, a capsaicina reduziu o nível de glicose (OKUMURA *et al.*, 2012) e a resistência à insulina em condições de obesidade induzida (KANG *et al.*, 2011). Os genes relacionados com a insulina, tais como substrato de receptor de insulina e transportador de glicose 4 apresentaram maior expressão no grupo tratado com capsaicina. Os efeitos benéficos sobre a intolerância à glicose foram associados com a sua ação sobre os receptores proliferadores de peroxissoma α e γ e na expressão e ativação do TRPV1 (receptor vaniloide de potencial transitório sub tipo 1) no fígado e no tecido adiposo (KANG *et al.*, 2009). Ainda neste estudo, a capsaicina suprimiu as respostas inflamatórias, reduziu os níveis de fatores de necrose tumoral, interleucina 6 e monócitos 1 e aumentou os níveis de adiponectinas em ambos os tecidos.

A enzima lipase lipoproteica (LPL) desempenha papel importante sobre a homeostase energética e sobre o acúmulo de gordura no tecido adiposo. Em dieta de alta energia, o aumento da atividade dessa enzima reduziu o acúmulo de gordura corporal em ratos tratados com capsaicina. A aplicação tópica com capsaicina também em ratos foi capaz de aumentar o gasto energético celular pela regulação do gene de proteína desacopladora 2, transportadores de ácido graxo 1, acil coA sintetase no tecido adiposo e no fígado e LPL, que agem contra a obesidade visceral (LEE *et al.*, 2012). A capsaicina dietética tem sido relacionada com menor obesidade em humanos, como consequência do aumento do metabolismo energético e da termogênese (KAWADA *et al.*, 1986). A análise histológica do tecido adiposo de ratos demonstrou que as gotículas de lipídeos no fígado de ratos não suplementados com capsaicina eram maiores que daqueles recebendo capsaicina (KANG *et al.*, 2011).

A liberação de catecolaminas (epinefrina, norepinefrina e dopamina) via sistema nervoso simpático pode aumentar a lipólise nos adipócitos pelo estímulo da atividade da

enzima lipase hormônio sensível e da glicogenólise hepática. Iwai *et al.* (2003) evidenciaram que o aumento da secreção de catecolaminas induzido pela capsaicina é mediado por ativação do sistema nervoso central. A capsaicina excita os neurônios aferentes primários do cérebro. Esses estímulos são transmitidos para a medula espinhal que aumenta a atividade dos nervos aferentes simpáticos adrenais, causando maior secreção de catecolaminas a partir da medula adrenal. Estas reagem no sangue com receptores β -adrenérgicos aumentando o metabolismo energético e conseqüentemente a produção de calor (MATSUMOTO *et al.*, 2000). Ohnuki *et al.* (2001) estudaram o metabolismo energético de ratos e observaram maiores concentrações de adrenalina sérica e ácidos graxos livres no sangue e maior consumo de oxigênio em animais que consumiram 10 mg de capsaicina por kg de peso vivo.

A capsaicina pode reduzir o cansaço após a atividade física. Hsu *et al.* (2016) alocaram 32 camundongos com oito semanas de idade nos tratamentos controle (CTL), 205 (CAP 1X), 410 (CAP 2X) e 1025 mg de capsaicina por kg de peso vivo (CAP 5X) durante quatro semanas. Os tratamentos foram administrado 1 x/d através de alimentação forçada. As amostras sanguíneas foram obtidas após o teste de desempenho na natação. O peso corporal não foi alterado pelos tratamentos. O consumo de água e de alimento foi menor no CAP 2X quando comparado ao CTL. O tempo de natação foi maior para a dose CAP 5X (47 min) quando comparado ao CTL (9,3 min), CAP 1X (11,0 min) e CAP 2X (11,3 min). As concentrações séricas de lactato, N-amoniaco e da enzima creatinina quinase foram reduzidas e a glicose foi aumentada em ratos alimentados com capsaicina. O nitrogênio ureico no sangue foi reduzido apenas na dose CAP 5X.

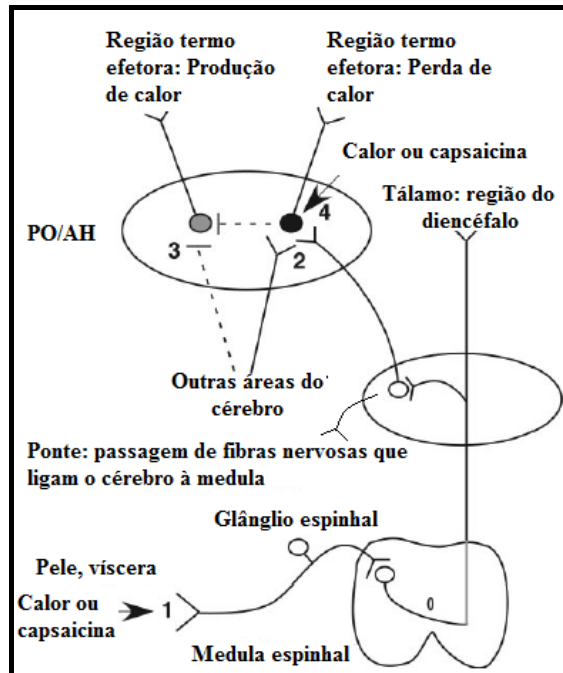
2.3 Efeito da capsaicina sobre a temperatura corporal

O sistema de controle da temperatura corporal situa-se no hipotálamo. Quando os impulsos térmicos excedem a faixa limiar de temperatura, respostas termorreguladoras autonômicas ocorrem com a finalidade de manter a temperatura do corpo dentro da amplitude fisiológica ótima (GYTON, 1996). A capsaicina desencadeia respostas termorregulatórias coordenadas, ou seja, ativação de respostas em defesa do calor, que inclui a vasodilatação periférica, a transpiração e a salivação simultaneamente à supressão da resposta de defesa ao frio (HORI, 1984). Injeções subcutâneas ou intra hipotalâmicas de capsaicina promoveram hipotermia em ratos neonatos. Porém, injeções repetidas em altas doses resultaram em dessensibilização à capsaicina e hipertermia prolongada (HORI e TSUZUKI, 1981). Neste caso, ocorre um desequilíbrio entre os sinais dos receptores do calor e do frio o que eleva a temperatura corporal após a administração da capsaicina (HORI, 1984).

Os receptores da família TRP (Receptores de Potencial Transitório) são canais de cátions não seletivos, permeáveis ao cálcio e estão envolvidos em estímulos relacionados à transdução de sinais extracelulares, como luz, calor e frio (BAYLIE e BRAYDEN, 2011). O TRPV1 é o receptor ativado pela capsaicina, por pH abaixo de 6,8 e por temperaturas maiores que 43 °C. A temperatura afeta a mobilidade dos íons e, por conseguinte, ocorre redução na condutância dos canais iônicos, que é um fenômeno relatado não só para TRPV1, mas também para outros receptores de potencial transitório (CHUNG e WANG, 2011). A capsaicina provoca sensação de calor através da ativação de TRPV1, assim como o mentol produz uma sensação de frio através da ativação da TRPM8, receptores que provocam termo sensação oposta em células humanas (TAKAISHI *et al.*, 2016).

Os neurônios pré-ópticos integram informações térmicas centrais e periféricas. O resultado dessa integração sensorial é a excitação da resposta termorregulatória relacionada à condição térmica do corpo e do ambiente. Além disso, os neurônios pré-ópticos termossensíveis são também afetados por substâncias endógenas (BOULANT, 2000) como a capsaicina (HORI, 1984). Os canais da TRPV1 agem sobre a área pré-óptica e do hipotálamo anterior, o que desencadeia mecanismos que atuam sobre a regulação da temperatura corporal (CATERINA, 2007). Os possíveis mecanismos do TRPV1 sobre a hipotermia mediada pelo calor ou pela capsaicina estão apresentados na Figura 6. Em ratos, Nakayama *et al.* (1978) relataram que injeção de capsaicina por via subcutânea excitou unidades de calor e inibiu unidades do frio na área pré-óptica e do hipotálamo anterior. A dose de 1 mg/kg de peso vivo foi capaz de excitar 17 de 21 unidades de calor e inibiu todas seis unidades do frio.

Figura 6 - Efeito do TRPV1 em resposta à capsaicina e ao calor sobre a termorregulação corporal.



1) A ativação da TRPV1 nos terminais periféricos de fibras cutâneas ou viscerais sensíveis ao calor resulta em estímulo dos neurônios através do glânglio espinhal. Os neurônios enviam impulsos para a ponte e projeções seguem para a região pré-óptica e do hipotálamo anterior (PO/AH), que ativam neurônios sensíveis ao calor e/ou inibem neurônios sensíveis ao frio. 2 e 3) A ativação da TRPV1 nos terminais pré-sinápticos a partir da ponte ou de outro local que age sobre a PO/AH, essa ativação leva ao aumento da liberação de neurotransmissores excitatórios em neurônios sensíveis ao calor (2) ou aumenta a liberação de neurotransmissores inibitórios em neurônios sensíveis ao frio (3). 4) Sustâncias vaniloides circulantes podem penetrar o cérebro e agir diretamente sobre os neurônios sensíveis ao calor, dentro do hipotálamo. Linhas sólidas indicam efeito excitatório e linhas tracejadas indicam ação inibitória. Adaptado de Caterina (2007).

A capsaicina induz simultaneamente a perda e produção de calor de maneira independente. O aumento da perda de calor foi observado pela vasodilatação cutânea em ratos após a administração de capsaicina. Além disso, houve aumento da temperatura superficial da pele, o que provavelmente contribuiu para a diminuição da temperatura corporal. Contudo, a capsaicina também aumentou o consumo de oxigênio, indicando ativação da produção de calor. O efeito sobre a temperatura superficial da pele foi observado até 2 h pós injeção, ao passo que, o maior consumo de oxigênio ocorreu por 10 h pós injeção (KOBAYASHI *et al.*, 1998). A produção de calor promovida pela capsaicina relaciona-se com a região do tronco cerebral e a perda de calor com o encéfalo frontal (LEE *et al.*, 2000). Hachiya *et al.* (2007) investigaram o efeito da capsaicina sobre a termogênese induzida pela dieta em humanos. Houve aumento da temperatura superficial da pele (+ 0,2 °C) comparado ao controle. A pressão sanguínea e a frequência cardíaca foram aumentadas no grupo que consumiu pimenta.

Lee *et al.* (2000) administraram 5 mg de capsaicina por kg de peso vivo por via intraperitoneal em camundongos e relataram maior consumo de oxigênio, após 71 min da injeção. Houve queda gradual do consumo pós pico, porém esse permaneceu mais alto, quando comparado aos valores basais de camundongos não tratados com capsaicina até o final de quatro horas de observação. Também foi observada maior temperatura superficial da pele (27,7 vs. 31,9 °C) e menor temperatura corporal (37,1 vs. 36,8 °C) nos camundongos tratados com capsaicina. O maior consumo de oxigênio e consequentemente a maior produção de calor foram associados ao aumento na secreção de catecolaminas.

2.4 Interações entre os óleos essenciais

Efeitos aditivos, sinérgicos e antagônicos podem ocorrer entre os OE (CALSAMIGLIA *et al.*, 2007). O efeito aditivo ocorre quando o efeito combinado dos compostos é igual à soma dos efeitos individuais, o sinergismo é registrado quando as atividades das substâncias combinadas é maior do que a soma dos compostos isolados e no antagonismo a atividade dos compostos combinados é inferior ao efeito isolado (FALEIRO, 2011). Combinações binárias de carvacrol e timol; de timol e eugenol e do composto ternário de carvacrol, timol e eugenol tiveram efeito sinérgico sobre a inativação *in vitro* da bactéria *Listeria innocua* (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2011). Em ensaio de inibição interativa foi observado sinergismo entre o cinamaldeído, carvacrol e timol e efeito aditivo entre o carvacrol e o timol sobre a atividade da enzima β -galactosidase *in vitro* (WANG *et al.*, 2017).

Michiels *et al.* (2007) também relataram atividade antimicrobianas sinérgica entre o carvacrol e o timol em simulação de fermentação *in vitro* de trato digestivo de suínos. Estes compostos combinados apresentaram maior efeito antimicrobiano sobre *Escherichia coli* e lactobacilos. A atividade microbiana não depende apenas do princípio ativo, mas também de suas interações, o que ocasiona um aumento na permeabilidade da membrana plasmática dos microrganismos.

Frações de óleo de coentro, aneto e eucalipto, cada um contendo vários componentes em sua composição, quando misturados em diferentes combinações resultaram em efeitos aditivos, sinérgicos e antagônicos. O eucalipto apresentou resultados antimicrobianos satisfatórios para todas as bactérias em teste. Quando coentro e eucalipto foram combinados foi observado efeito antimicrobiano aditivo contra bactérias gram-positivas e *S. cerevisiae*; em contraste, houve efeito antagônico sobre o crescimento de bactérias gram-negativas (DELAQUIS *et al.*, 2002).

Em ruminantes, a maioria dos trabalhos *in vivo* são avaliados em associações com dois ou mais OE, sugerindo que o uso combinado pode resultar em efeito aditivo e ou sinérgico para melhorar a fermentação ruminal e o desempenho (BENCHAAR e GREATHEAD, 2011). Nesse caso, mais de um mecanismo de ação pode estar envolvido no efeito antimicrobiano dos OE sobre os microrganismos do rúmen. A atividade de um componente principal pode ser modulada por outras moléculas menores (FRANZIOS *et al.*, 1997), portanto, o conceito do uso combinado parece ser mais justificável. Em muitos produtos comerciais os OE são combinados, porém poucas pesquisas comparativas estão disponíveis sobre o efeito potencial individual e sinérgico entre eles. A mistura de cinamaldeído e eugenol foi a combinação mais utilizada em estudos com bovinos de leite (KHIAOSA-ARD e ZEBELI, 2013).

2.5 Ação dos óleos essenciais sobre os microrganismos do rúmen

O efeito dos OE sobre a população microbiana ruminal tem sido avaliado *in vitro*. Oh *et al.* (1967) avaliaram o efeito dos OE de Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*), espécie nativa da América do Norte, sobre a atividade microbiana ruminal em ovinos e cervos fistulados. A conífera continha em sua composição α -pineno, β -pineno, limoneno, mirceno, canfeno, Δ^3 -carene e terpinemo. Os monoterpenos apresentaram ação inibitória sobre a microbiota ruminal, efeito observado pela menor produção de gás. A taxa de inibição da atividade microbiana variou de acordo com a estrutura química dos compostos testados. Monoterpenos oxigenados e aldeídos apresentaram maiores taxas de inibição do metabolismo microbiano ruminal, ao passo que, monoterpenos hidrocarbonados inibiram fracamente e em algumas avaliações estimularam o crescimento dos microrganismos.

A ação antimicrobiana difere entre os compostos de OE, mas basicamente relaciona-se às alterações nas membranas plasmáticas dos microrganismos (AKTHAR *et al.*, 2014). O efeito das concentrações inibitórias mínimas de 91 extratos etanólicos de plantas colhidas no oeste da Austrália foram avaliadas sobre as espécies bacterianas ruminais e 37 extratos apresentaram efeito inibitório seletivo *in vitro* para *Clostridium proteoclasticum* e seis para *Butyrivibrio fibrisolvens* (DURMIC *et al.*, 2008).

As bactérias ruminais hiper-produtoras de amônia *Peptostreptococcus anaerobius* e *Clostridium sticklandii* são consideradas sensíveis à presença da mistura composta pelo timol, eugenol, valinina e limonemo *in vitro* (WALLACE *et al.*, 2002). Os óleos essenciais do *Allium sativum* L., *Eucalyptus globulus*, *Eugenia* spp, *Eucalyptus globulus*, *Mentha piperita* L, *Origanum* spp, *Thymus capitatus* L também parecem afetar negativamente *in vitro* a

abundância das bactérias *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus flavefaciens* (PATRA e YU, 2012).

O *Fusobacterium necrophorum* é uma bactéria anaeróbia que pertence ao grupo dos *Bacteroidaceae*, agente patogênico dos abscessos hepáticos em gado de corte (NAGARAJA e LECHTENBERG, 2007). Samii *et al.* (2016) avaliaram o efeito de crescentes doses de limoneno (0, 10, 20, 40 e 80 mg/kg MS da dieta) ou 180 mg/kg de MS da dieta de uma mistura de timol, eugenol, a valinina e o limonemo com adicional de 11 % de limoneno (Crina L. DSM. Parsippany, NJ) sobre a população de *Fusobacterium necrophorum* no rúmen de novilhos de corte. O limonemo reduziu linearmente a concentração da bactéria, enquanto o Crina L não apresentou efeito.

Bactérias ruminais com parede celular delgada e camada espessa de peptidoglicano podem ser menos susceptíveis à ação bactericida dos OE, pois possuem uma membrana externa envolvendo a parede celular, o que pode restringir a difusão dos compostos hidrofóbicos através da camada de lipopolissacarídeos (VAARA, 1992). Porém, Deans *et al.* (1995) enfatizaram que a ocorrência da reação de gram não determina a susceptibilidade bacteriana aos OE. Dorman e Deans (2000) avaliaram o efeito de 21 compostos de terpenos e fenilpropanos sobre o crescimento de nove cepas de bactérias gram-positivas e 16 gram-negativas e observaram que os OE exibiram efeito inibitório sobre todos os microrganismos avaliados, diferindo somente no grau de inibição do crescimento. As pequenas moléculas dos OE são capazes de atravessar a membrana externa de bactérias gram-negativas via proteínas de transmembrana, como as porinas (BENCHAAAR e GREATHEAD, 2011).

A diversidade de bactérias metanogênicas pode ser modificada pela presença de OE no rúmen (OHENE-ADJEI *et al.*, 2008). Estes autores suplementaram ovinos com cinamaldeído, óleo gálico ou zimbro (0,02 g/kg de MS da dieta) durante 13 semanas. O conteúdo ruminal foi obtido após o abate. Pelo sequenciamento do RNAr 16S foi observado que o número total de Archeas não foi afetado pelos tratamentos, porém a análise filogenética indicou uma tendência de aumento na população da *Methanosphaera stadtmanae* e *Methanobrevibacter smithii*. A suplementação com 500 g/d de folhas de orégano para vacas leiteiras não alterou a população das Archeas (% do isolado total), *Euryarchaeota*, *Methanobrevibacter* e *Methanobacteriaceae* (TEKIPPE *et al.*, 2011). Hristov *et al.* (2013) também relataram ausência de resposta para as bactérias metanogênicas quando avaliaram a suplementação de carvacrol para vacas leiteiras. Contudo, em ovinos houve redução de metanogênicas (% da população bacteriana total) com a suplementação de 0,5 ou 1,0 g/d de uma combinação de proporções iguais de eugenol, carvacrol, citral e cinamaldeído (LIN *et al.*, 2013).

Protozoários são sensíveis aos OE e o mecanismo de ação é semelhante ao da saponina (WALLACE *et al.*, 2002; BUSQUET *et al.*, 2006). As saponinas, são glicosídeos do metabolismo secundário das plantas com propriedades surfactantes (WALLACE *et al.*, 2002). O efeito antiprotozoário está relacionado à capacidade de formação de complexos irreversíveis com o colesterol das membranas celulares (FRANCIS *et al.*, 2002). Em incubação ruminal *in vitro* por 24 h, com adição de 0, 150, 300, 450 e 600 µg/ mL de extrato de *Zataria multiflora* que continha majoritariamente carvacrol e p-cimene, foi observada redução de 50 % na população total de protozoários (TALEBZADEH *et al.*, 2012). Em dose acima de 150 µg/mL do extrato, *Dasytricha* spp. e *Isotricha* spp. não foram identificados, o que pode sugerir maior susceptibilidade dessas espécies de protozoários à presença dos OE.

A dose de OE pode modificar a concentração de protozoários no rúmen. Em doses abaixo de 0,20 g/kg/MS da dieta foi observado aumento desse microrganismo comparado ao grupo controle. Entretanto, dose acima de 0,5 g/kg/MS da dieta os reduziu drasticamente com queda de 30 %, baseado em resposta *in vivo* observada em bovinos de leite, de corte e de pequenos ruminantes (KHIAOSA-ARD e ZEBELI, 2013).

Os OE também possuem capacidade de penetrar na parede celular de fungos e o modo de ação assemelha-se ao mecanismo proposto para bactérias, causando diminuição da diferença no potencial de transmembrana e do pH intracelular, alterando o fluxo de elétrons através das membranas mitocondriais (AKTHAR *et al.*, 2014). Hristov *et al.* (2013) avaliaram crescentes doses de folhas de orégano na dieta de vacas leiteiras e relataram ausência de resposta para os gêneros de fungos *Neocallimastix*, *Systemostrema*, *Candida* e *Saccharomyces* e efeito inibidor sobre *Orpinomyces*.

Rao *et al.* (2010) utilizaram como modelo de estudo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* para investigar a ação antifúngica *in vitro* dos terpenos fenólicos, carvacrol, timol, eugenol, vanilina, guaicol, p-cimene e γ -terpinene. O carvacrol e o eugenol aumentaram o influxo de Ca^{+2} citosólico, por expansão das membranas e abertura dos canais iônicos. O carvacrol aumentou 0,5 unidades no pH vacuolar com acidificação do pH no citosol da levedura. A queda de pH citosólico foi dependente de concentração, solução de 0,01 % de carvacrol causou uma queda modesta, ao passo que 0,05 % resultou em queda acentuada. Essas alterações dificultam o transporte de elétrons e a sobrevivência da célula.

Os OE também apresentam potencial antimicotoxigênico. Os extratos de canela, casca de limão, casca de toranja rosa e branca, folhas de eucalipto e folhas de palmarosa reduziram a concentração da micotoxina zearalerona *in vitro*. O extrato de canela reduziu em 20,0 e 24,7 % após 24 e 72 h de incubação, respectivamente. A degradação dessa micotoxina foi

dependente da concentração do extrato, do tempo e da temperatura de incubação e do pH do meio. Em geral, observou-se redução da concentração da micotoxina em pH de 3, 6 e 9, com evidências de que a degradação aumenta gradualmente com o tempo de incubação e aumento da temperatura (PERCZAK *et al.*, 2016).

Compostos extraídos de plantas de canela, orégano e taramira (1 µL/mL e 5 µL/mL) mostraram atividade antifúngica sobre o crescimento do *A. carbonarius* com inibição da produção de sua micotoxina, ocratoxina A. Os extratos (1 µL/mL) de funcho, cardamomo, camomila, alecrim, anis e aipo afetaram fracamente o crescimento do fungo, porém reduziu a produção de ocratoxina A em 86,6; 74,2; 67,5; 53,7; 78,6 e 76,6 %, respectivamente. A queda na produção da micotoxina foi devido à inibição dos genes *acOTApks* e *acOTAnrps* envolvidos em sua biossíntese (EL KHOURY *et al.*, 2016).

Existem evidências de que os microrganismos ruminais são capazes de se adaptar à presença dos OE, seis dias podem ser suficientes para essa adaptação em trabalhos *in vitro*, com resultados mais evidenciados quando administrados em baixas doses 0,22 mg/L de fluido ruminal (CARDOZO *et al.*, 2004). O estabelecimento desta resposta adaptativa ainda é desconhecida, mas pode explicar a ausência de efeito em pesquisas conduzidas por longo período. Os OE não apresentam seletividade sobre grupos de bactérias ruminais. Por esta razão, o efeito antimicrobiano é considerado não específico e pode ser de difícil mensuração, devido à variabilidade entre os OE e à susceptibilidade dos microrganismos (PAULI e SCHILCHER, 2010).

2.6 Efeito dos óleos essenciais sobre o metabolismo ruminal

Os OE podem ser solubilizados na parte aquosa do fluido ruminal, podendo sofrer bioconversão, interagir com o alimento e ser absorvido pela parede do rúmen (MALECKY e BROUDISCOU, 2009). Parte do produto suplementado pode ser perdido por volatilização, por meio dos processos de ruminação e eructação (CLUFF *et al.*, 1982). O efeito antimicrobiano pode estar relacionado à dissociação iônica e à natureza química das moléculas dos OE. Em geral, monoterpênicos hidrocarbonados são significativamente menos efetivos do que monoterpênicos oxigenados (DORMAN e DEANS, 2000). No rúmen, somente a forma hidrofóbica, ou seja, não dissociada, é capaz de interagir com as bicamadas das membranas celulares dos microrganismos. Em ambiente mais ácido, as moléculas dos OE tendem a não dissociarem, o que facilita seu efeito antimicrobiano (CARDOZO *et al.*, 2006).

Em estudo *in vitro*, Cardozo *et al.* (2005) avaliaram o efeito de seis extratos de plantas (alho, canela, yucca, erva doce, orégano e pimenta) e de três compostos purificados

(cinamaldeído, anetol e eugenol) em pH 5,5 e 7,0 sobre a fermentação ruminal em novilhos de corte alimentados com dieta de alto grão. Cada extrato foi avaliado nas doses 0,3; 3; 30 e 300 mg/L de fluido ruminal. Os novilhos foram alimentados com dieta contendo palha (10 % MS), grãos de milho e de cevada, farelo de soja, mandioca e uma mistura de minerais e vitaminas. A incubação foi realizada à temperatura de 39 °C por 24 h. Houve interação entre pH ruminal e extrato para a concentração de ácido graxo volátil (AGV) total, AGV ramificado e N-amoniacal e para as proporções de acetato, propionato e butirato no rúmen. A dose de 300 mg/L de fluido ruminal em pH 5,5 e 7,0 reduziu a concentração de AVG total em todos os extratos. Em pH 5,5, a razão entre acetato e propionato foi reduzida pela pimenta, cinamaldeído (3 e 30), yucca (0,3; 3 e 30), orégano e alho (30 mg/L de fluido ruminal). O eugenol, o anise, o orégano, a pimenta (0,3; 3 e 30), o alho e a yucca (30 mg/L de fluido ruminal) aumentaram a proporção de butirato. A concentração de AGV ramificado foi reduzida pelo eugenol, alho, orégano, pimenta e cinamaldeído (0,3; 3 e 30 mg/L de fluido ruminal). A concentração de N-amoniacal no rúmen foi reduzida em todos os extratos, exceto no eugenol e no yucca.

Os microrganismos do rúmen são capazes de metabolizar os OE (MALECKY e BROUDISCOU, 2009). Broudiscou *et al.* (2007) avaliaram a degradação *in vitro* de dez monoterpenos e sesquiterpenos de extratos de plantas em inóculo ruminal de caprinos. O mirceno, β -ocimeno, α -pineno, sabineno e α -copaeno apresentaram altas taxas de degradação ruminal, enquanto o timol, baixa taxa. Oleorresina de *Capsicum* foi administrada no rúmen de vacas leiteiras e Cr-EDTA foi utilizado como marcador da taxa de passagem fluida. Amostras de fluido ruminal foram coletadas 0,5; 1; 2; 6; 12 e 24 após inclusão da oleorresina. O desaparecimento ruminal foi de 1,34; 0,91 e 1,50/h para 250, 500 e 1.000 mg de *Capsicum*, respectivamente (OH *et al.*, 2016). Malecky *et al.* (2009) avaliaram durante seis semanas a inclusão de uma mistura de OE composta por linalol, *p*-cimeno, α e β pineno em 12 cabras Saanen canuladas no rúmen e no duodeno. Os animais receberam via cânula ruminal a mistura dos monoterpenos nas doses 0,043 g/kg ou 0,43 g/kg de MS da dieta. Foi observada redução no fluxo duodenal para os quatro compostos. Houve ausência de resposta sobre o CMS (2,7 kg/g), produção de leite (3,2 kg/d) e características de fermentação ruminal. A bioconversão dos terpenos pelas bactérias ruminais foi a principal inferência discutida para explicar a baixa taxa de recuperação.

O metabolismo dos OE no ambiente ruminal ainda não foi elucidado pela literatura. A degradação de monoterpenos em ecossistema anaeróbio pode permitir a transformação desses compostos em outros. Por exemplo, o eucaliptol é biodegradado à terpinoleno e o linanol à

geranial (HYLEMON e HARDER, 1998). As bactérias ruminais podem converter alguns compostos bioativos em substâncias inertes. A maioria das reações envolve mudança na posição da insaturação e dos grupos funcionais e quebra de ligações de compostos cíclicos em linear (MALECKY *et al.*, 2009), como ocorre com o mentol em presença de bactérias anaeróbias desnitrificantes (HYLEMON e HARDER, 1998). No leite de vacas alimentadas com terpenos foi observado aumento da concentração de p-cimene oriundo do carvacrol, confirmando inferências de transformação dos OE no rúmen (LEJONKLEV *et al.*, 2016).

Os extratos das leguminosas *Acacia iteaphylla* e *Kennedia eximia* inibiram o metabolismo do ácido linoleico em fluido ruminal *in vitro* aumentando a proporção de ácido vacênico e diminuído o ácido esteárico, indicando que OE possuem propriedades moduladoras da biohidrogenação de lipídeo insaturado no rúmen (DURMIC *et al.*, 2008). Em fermentadores de fluxo contínuo, Lourenço *et al.* (2008) avaliaram o efeito de quatro OE com diferentes grupos químicos sobre a biohidrogenação ruminal de ácidos graxos poliinsaturados de forragem. A quercentina, o eugenol e as saponinas afetaram fracamente esse processo. Entretanto, o cinamaldeído na dose de 500 mg/L de fluido ruminal provocou maior alteração na biohidrogenação do 18:2 n6 com conseqüente aumento de 18:1 *trans*-10 e 18:2 *trans*-10, *cis*-12. A seqüência do catabolismo proteico no fluido ruminal de ovinos suplementados com 100 mg/d de uma mistura composta pelo timol, eugenol, valinina e limoneno foi estudado por McIntosh *et al.* (2003). A formação de amônia foi reduzida somente no último passo, na deaminação dos aminoácidos e não foram observadas diferenças para os processos envolvendo a quebra de oligopeptídeos e dipeptídeos.

Em trabalho pioneiro, a adição de 1 mg de timol por mL de fluido ruminal resultou em acúmulo de aminoácidos e redução na concentração de N-amoniacoal *in vitro* (BORCHERS, 1965). Achados similares foram obtidos por McIntosh *et al.* (2003) e Wallace (2007). Wallace *et al.* (2002) sugerem que a ação sobre o metabolismo proteico ruminal está relacionada com a redução da deaminação e esses efeitos são provavelmente devido à inibição das bactérias hiper produtoras de amônia. Estas bactérias têm alta atividade deaminativa e são responsáveis por proporção significativa da amônia produzida no rúmen. A atividade deaminativa (nmol NH₃ produzido/mg de proteína/h) foi menor em fluido ruminal de ovinos alimentados com timol, eugenol, vanilina e limoneno comparativamente a animais não suplementados (NEWBOLD *et al.*, 2004).

A inclusão de 2 g de óleo de tanchagem (*Plantago major*) em dietas de ovinos não alterou a expressão dos genes NHE3 e NHE1, que são responsáveis pela exportação de prótons em células epiteliais ruminais; MCT1 relacionado à importação de HCO₃⁻ e à

exportação de lactato, corpos cetônicos e AGV⁻; MCT4 envolvido na importação apical de HCO₃⁻ ou na exportação de lactato; DRA e PAT1 responsáveis pelas trocas HCO₃⁻/AGV⁻; e AE2 no transporte do íon HCO₃⁻ (MIRZAEI-ALAMOUTI *et al.*, 2016). Nesse estudo os animais foram suplementados durante 77 d e não foi observada alteração na morfologia das papilas ruminais.

Os OE não alteraram a taxa fracional de degradação ruminal *in situ* do grão de milho (MS e amido), da silagem de capim (MS e FDN) e do farelo de soja (MS e PB) em vacas suplementadas com timol, eugenol, vanilina e limoneno (BENCHAAR *et al.*, 2006) e com eugenol (BENCHAAR *et al.*, 2012). Em complementaridade, Benchaar *et al.* (2008) não relataram diferença na cinética de degradação da MS e da FDN, bem como na degradabilidade efetiva de silagem de gramínea incubada no rúmen de vacas leiteiras suplementadas com cinamaldeído, quebracho ou extratos de saponinas. Entretanto, a degradabilidade da MS em 8 e 16 h de incubação e a degradação de nitrogênio do farelo de soja 2 h pós incubação foram menores para ovinos alimentados com OE, mas sem efeito sobre a degradabilidade do feno de azevém (NEWBOLD *et al.*, 2004).

A metanogênese no rúmen pode ser inibida pela presença dos OE. Porém, a inibição é observada em alta dose (> 300 mg/L de fluido ruminal) e em muitos casos associada à diminuição da concentração de AGV e à digestibilidade dos nutrientes (BENCHAAR e GREATHEAD, 2011), que são consequências indesejáveis sobre a produção animal. Idealmente, a produção de metano poderia ser afetada diretamente pela inibição das Archea ou indiretamente pela depressão de processos metabólicos envolvendo a metanogênese, por vias fermentativas à favor de propionato, ou ainda pela diminuição da população dos protozoários, que estabelecem relação simbiótica com as Archeas (BODAS *et al.*, 2012). Em relação aos efeitos sobre a produção de metano, o timol, o carvacrol, o eugenol, o cinamaldeído, o anetol e o mentol foram os OE mais estudados *in vitro* (BENCHAAR e GREATHEAD, 2011).

O perfil fermentativo ruminal dos animais que consomem OE pode ser modificado por alteração das populações de bactérias, fungos e protozoários, podendo ocorrer inibição ou estímulo de populações microbianas (BODAS *et al.*, 2012). Em meta-análise realizada por Klevenhusen *et al.* (2012), 70 OE foram avaliados. Os OE *in vitro* geralmente são avaliados em altas doses e este fator pode diminuir a atividade microbiana ruminal e a fermentabilidade da dieta (CARDOZO *et al.*, 2004; BUSQUET *et al.*, 2006). Perdas por volatilização e a passagem através da parede do rúmen podem interferir diretamente na extrapolação da dose *in vitro* para *in vivo*. A dose *in vivo* média utilizada em ruminantes foi de 0,1 g/kg MS da dieta

(KHIAOSA-ARD e ZEBELI, 2013) e a dose média *in vitro* foi de 4,5 g/kg MS da dieta (KLEVENHUSEN *et al.*, 2012). Portanto, pode ocorrer discordância na resposta entre os dois tipos de avaliação e estudos com curto período experimental devem ser analisados com cautela.

Klevenhusen *et al.* (2012) resumiram os principais estudos que avaliaram a inclusão de OE sobre a fermentação ruminal *in vitro*. Houve queda na concentração de AGV, na proporção molar de acetato, na concentração de amônia, na relação entre acetato e propionato, no coeficiente de digestibilidade da MS e da FDN e na produção de metano.

2.7 Suplementação de ruminantes com óleos essenciais

O desempenho de vacas leiteiras suplementadas com OE é afetado de forma variável (TABELA 1). A dose, o composto avaliado, a dieta basal e o estado fisiológico dos animais podem influenciar a magnitude da resposta (CALSAMIGLIA *et al.*, 2007; WALL *et al.*, 2014). Khiaosa-ard e Zebeli (2013) observaram por meio de meta-análise, a ausência de efeito sobre o CMS e a produção de leite de vacas alimentadas com OE. A ausência de significância em pesquisas de desempenho animal pode ser atribuída, dentre outros fatores, à adaptação da microbiota do rúmen (BENCHAAAR *et al.*, 2007a). No entanto, os resultados em desempenho podem ser evidenciados após um período de suplementação, como observado por Guasch *et al.* (2016). Esses autores suplementaram vacas leiteiras durante oito semanas com 1 g/d de uma mistura comercial contendo coentro, acetato de geranilo e eugenol (Agolin Ruminant. Bière. Suíça) e observaram aumento na eficiência alimentar de vacas suplementadas somente a partir da quinta semana experimental (1,25 *vs.* 1,33). Este estudo foi conduzido com 40 vacas holandesas e os tratamentos foram administrados 2x/d na sala de ordenha, misturados a 300 g de farelo de soja.

Similarmente à produção de leite e ao consumo, não há consistência na resposta em sólidos do leite (TABELA 1). Contudo, doses de OE acima de 150 mg/kg MS da dieta aumentaram a produção e a porcentagem de proteína no leite de vacas suplementadas (KHIAOSA-ARD e ZEBELI, 2013). Os compostos de OE podem favorecer a síntese de proteína microbiana e o fluxo proteico para o intestino do animal (CALSAMIGLIA *et al.*, 2007). Tekippe *et al.* (2013) relataram aumento da excreção diária de alantoína, ácido úrico e derivados de purina total na urina de vacas suplementadas com 525 mg/d de cinamaldeído e eugenol.

O efeito dos OE sobre o perfil de fermentação ruminal em bovinos leiteiros é inconclusivo, ao passo que em bovinos de corte essa resposta parece ser consistente

(TABELA 2). Os resultados obtidos em bovinos de corte podem ser explicados via efeito sinérgico entre o baixo pH ruminal e os OE (KHIAOSA-ARD e ZEBELI, 2013). Esses autores relataram aumento do pH ruminal e redução da proporção molar de butirato e da concentração de protozoários em bovinos e ovinos suplementados com OE. Ainda nesse estudo foi observado aumento na proporção molar de propionato e redução de acetato, butirato, metano e na relação entre acetato e propionato em bovinos de corte suplementados com OE.

Tendência de reposta sobre a fermentação ruminal apresentada por Khiaosa-ard e Zebeli (2013) para bovinos de corte foram observados por Vakili *et al.* (2013) em novilhas holandesas com peso médio inicial de 213 kg alimentadas com dieta basal de 15 % de feno de alfafa e 85 % de ingredientes concentrados. Os animais foram suplementados com 5 g/d de extrato de *Thymus vulgaris* ou *Cinnamomum cassia* durante cinco semanas. Apesar do baixo número de unidades experimentais, 12 novilhas, foi observada queda na proporção de acetato e na relação entre acetato e propionato e aumento de butirato nos animais suplementados com os extratos. O ganho médio diário de peso foi de 1,2 kg.

Tabela 1 - Consumo de matéria seca (CMS) e produções de leite (PL), gordura (Gord.) e proteína (Prot.) de vacas leiteiras suplementadas com óleos essenciais (OE).

Estudo	OE	Dose/d	N	Duração	CMS		PL		Gord.		Prot.	
					kg/d ¹	Δ	kg/d	Δ	kg/d	Δ	kg/d	Δ
Blanch <i>et al.</i> (2016)	Cinamaldeído/gálico	300 mg	16	28 d/período	22,5	-1,0	29,4	+0,6	1,07	0	0,98	-0,01
Tekippe <i>et al.</i> (2013)												
Exp. 1: na dieta	Cinamaldeído/eugenol	525 mg	20	28 d/período	27,4	-0,1	41,9	+0,3	1,41	+0,04	1,22	+0,03**
Exp. 2: <i>top-dressed</i>	Cinamaldeído/eugenol	525 mg	20	28 d/período	26,9	-0,6	42,4	-0,1	1,37	+0,05	1,28	0
Exp. 3: na dieta	Cinamaldeído/eugenol	525 mg	6 (20/baia)	84 d	28,5	+0,2	35,9	-0,7**	1,39	-0,06	1,11	-0,02
	Cinamaldeído/eugenol	0,5 g				-0,6		-0,2		0		0
Tager e Krause (2011)	Cinamaldeído/eugenol	10 g	QL 4 x 4	21 d/período	23,9	-0,7	33,0	-1,4	1,20	-0,1	0,90	+0,1
	Capsaicina	0,25 g				-1,0		-1,9		-0,1		0
Santos <i>et al.</i> (2010)	Eugenol, coriander, acetato de gerânio	1 g	4 (310/baia)	28 d/período	27,4	-1,4 [†]	49,2	0	1,63	+0,03*	1,37	0
		0,32 g				-0,3		-0,7		+0,01		-0,01
Spanghero <i>et al.</i> (2009)	Orégano, canela, timol	0,64 g	QL 4 x 4	30 d/período	19,7	-0,2	31,4	-0,2	1,16	-0,01	0,99	+0,02
	Casca de laranja	0,96 g				-0,1		-0,2		0		-0,01
	Cinamaldeído	1 g				-0,1		+0,6		+0,03		-0,01
Benchaar <i>et al.</i> (2008)	Quebracho	150 g	QL 4 x 4	28 d/período	23,2	+0,3	33,6	-0,4	1,40	-0,04	1,18	-0,05
	Saponinas	60 g				-1,4		-2,1		-0,03		-0,11 [†]
Kung <i>et al.</i> (2008)	Limoneno, guaiacol	1,2 g	30	63 d	26,4	+1,9*	39,8	+1,9 [†]	1,13	+0,11*	1,23	-0,04
	Timol											
Benchaar <i>et al.</i> (2007b)												
Silagem de milho	Cinamaldeído/eugenol	750 mg	QL 4 x 4	28 d/período	17,3	-0,1	27,4	-1,5 [†]	0,85	-0,02	0,93	-0,03
Silagem de alfafa	Cinamaldeído/eugenol	750 mg			17,7	-0,2	28,4	-0,3 [†]	0,77	-0,07	1,00	-0,04

¹Valores comparados ao tratamento controle e variação da resposta dos animais suplementados com OE (Δ): + aumento – redução. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,10$; [†] $P \leq 0,15$

Flores *et al.* (2013) avaliaram o desempenho de vacas leiteiras a pasto suplementadas com 0, 200, 400 e 600 mg/d de uma mistura de eugenol e cinamaldeído (Xtract 6965. Pancosma. Genebra, Suíça) durante nove semanas. Para avaliação do perfil fermentativo ruminal, quatro vacas canuladas no rúmen foram utilizadas em delineamento quadrado latino 4 x 4, com períodos de 14 d. A mistura continha 280 g/kg de eugenol e 170 g/kg de cinamaldeído. Os tratamentos foram misturados a 860 g de milho moído, administrados individualmente 2x/d na sala de ordenha. A produção média de leite foi de 19,5 kg/d e não diferiu entre os tratamentos. A inclusão do aditivo aumentou de forma quadrática a concentração de N-amoniacal e de butirato (% AGV total) no fluido ruminal. A produção de sólidos no leite e o peso corporal não foi afetado pelos tratamentos.

Wall *et al.* (2014) conduziram dois experimentos para investigar o efeito de uma mistura de cinamaldeído e eugenol sobre o desempenho de vacas leiteiras. No primeiro experimento as vacas foram suplementadas com 350 mg/d ou placebo durante seis semanas. Os dados foram analisados sem e com efeito de paridade. O CMS (+ 1,4 kg/d) e a produção de leite (+ 1,2 kg/d) foram maiores nas vacas suplementadas. A suplementação com o aditivo aumentou a porcentagem e a produção de proteína no leite. Houve interação entre paridade e tratamento para a produção de leite com aumento em vacas multíparas (40,0 vs. 42,4 kg/d) e sem resposta em primíparas (30,3 vs. 30,1 kg/d). O teor de nitrogênio ureico no leite foi reduzido em vacas primíparas. No segundo experimento, doses de 0, 200, 400 e 600 mg/d do aditivo foram avaliadas em 48 vacas durante oito semanas, quatro primíparas e oito multíparas foram alocadas em cada tratamento. Houve interação entre paridade e tratamento para a produção e composição do leite. Em primíparas, a suplementação com 200 e 600 mg/d aumentou, enquanto 400 mg/d reduziu a produção de leite. A produção de gordura no leite foi maior em primíparas alimentadas com 200 mg/d e foi reduzida em multíparas. A produção de proteína no leite foi aumentada em vacas multíparas (600 mg/d). A produção de lactose e o teor de nitrogênio no leite na dose de 600 mg/d foram maiores em primíparas e menor em multíparas.

Tabela 2 - Características fermentativas ruminais *in vivo* de bovinos de leite e de corte suplementados com óleos essenciais.

	Dose/d	pH	N-NH ₃ ¹	AVG	A	P	B	A/P	IsoB	Valerato	IsoV	Metano	Estudo
Bovinos de leite													
Cinamaldeído/eugenol	525 mg	=	>	=	=	=	=	=	>	=	>	ND	Tekippe <i>et al.</i> (2013). Exp. 1
Cinamaldeído/eugenol	525 mg	=	=	=	=	=	=	<	>	<	=	ND	Tekippe <i>et al.</i> (2013). Exp. 2
Cinamaldeído/eugenol	0,5 g	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	ND	Tager e Krause (2011)
Cinamaldeído/eugenol	10 g	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	ND	Tager e Krause (2011)
Cinamaldeído/eugenol	200 mg	=	=	=	=	=	=	=	ND	ND	ND	ND	Flores <i>et al.</i> (2013)
Cinamaldeído/eugenol	400 mg	=	=	=	=	=	=	=	ND	ND	ND	ND	Flores <i>et al.</i> (2013)
Cinamaldeído/eugenol	600 mg	=	=	=	=	=	=	=	ND	ND	ND	ND	Flores <i>et al.</i> (2013)
Cinamaldeído	1 g	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	ND	Benchaar <i>et al.</i> (2008)
Quebracho	150 g	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	ND	Benchaar <i>et al.</i> (2008)
Saponinas	60 g	=	=	=	<	=	=	=	=	=	=	ND	Benchaar <i>et al.</i> (2008)
Capsaicina	0,25 g	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	ND	Tager e Krause (2011)
Carvacrol	500 mg*	=	<	=	=	=	<	=	<	=	ND	<	Hristov <i>et al.</i> (2013)
Carvacrol	500 g	=	>	=	=	<	=	>	=	=	=	<	Tekippe <i>et al.</i> (2011)
Bovinos de corte													
Capsaicina	293 mg*	<	>	>	<	=	=	=	ND	=	ND	ND	Rodríguez-Prado <i>et al.</i> (2012)
Capsaicina	1 g	=	=	=	<	=	=	=	ND	ND	ND	ND	Cardozo <i>et al.</i> (2006)
Cinamaldeído/eugenol	0,9 g	=	<	=	<	=	>	=	ND	ND	ND	ND	Cardozo <i>et al.</i> (2006)
Cinamaldeído	5 g	=	=	=	<	>	>	<	=	=	=	ND	Vakili <i>et al.</i> (2013)
Anise	2 g	=	<	=	<	>	=	<	ND	ND	ND	ND	Vakili <i>et al.</i> (2013)
Timol	5 g	=	=	=	<	>	=	<	=	=	=	ND	Vakili <i>et al.</i> (2013)

¹N-NH₃ = Concentração de N-amoniaco; AVG = Concentração total de ácidos graxos voláteis; A = Acetato; B = Butirato; P = Propionato; IsoB = Isobutirato; IsoV = Isovalerato; ND = Não determinado; > aumento < redução = sem efeito, com base nos valores do grupo controle com valor de $P \leq 0,15$; *Dose média utilizada

Oguey e Wall (2016) avaliaram a inclusão de 1 g/d de uma mistura contendo eugenol, cinamaldeído e capsaicina (Xtract Ruminant. Pancosma. Genebra, Suíça) em 201 vacas leiteiras durante oito semanas. Todas as vacas receberam 300 mg/d de monensina. O CMS não foi alterado pelos tratamentos. Houve uma interação entre tratamento e paridade para a porcentagem de proteína no leite. O teor de proteína foi maior em vacas primíparas, sem resposta em múltíparas. A produção de leite (35,5 vs. 37,5 kg/d) e de proteína (1,1 vs. 1,2 kg/d) aumentou em vacas suplementadas com o aditivo. Os resultados sugerem que a suplementação com monensina e OE melhora o desempenho de vacas leiteiras.

Em vacas em transição (- d 28 a + 105 d relativo ao parto), Tassoul e Shaver (2009) avaliaram o uso da mistura de timol, eugenol, a valinina e o limoneno (Crina[®] Ruminants. DSM. Parsippany, NJ) sobre o desempenho e parâmetros sanguíneos de 40 vacas holandesas múltíparas. A dose administrada foi de 1,2 g/vaca/d misturada à dieta. As vacas suplementadas tiveram menor CMS durante a lactação comparado ao controle. O consumo pré-parto, a produção de leite (48,2 kg/d) e as concentrações plasmáticas de glicose, ácido graxo não esterificado, betahidroxibutirato e nitrogênio ureico foram semelhantes entre os tratamentos. Houve queda na porcentagem de proteína no leite (3,1 vs. 2,95) e o balanço energético no início da lactação foi mais negativo nas vacas tratadas com o aditivo (- 1,1 vs. - 3,6 Mcal/d).

Giannenas *et al.* (2011) alocaram 80 ovelhas em lactação a doses crescentes (0, 50, 100 e 150 mg/d kg MS do concentrado) de uma mistura de OE (Crina[®] Ruminants. DSM. Parsippany, NJ) por cinco meses. A produção de leite teve resposta linear positiva aos OE. No dia 150 do experimento, a produção de leite observada foi de 1,36; 1,49; 1,74 e 2,05 L/d para os tratamentos 0, 50, 100 e 150 mg/d kg MS do concentrado, respectivamente. Os OE reduziram a população de bactérias hiper produtoras de amônia no rúmen com consequente redução no teor de nitrogênio ureico do leite. A contagem de células somáticas no leite foi diminuída pelo OE (233 vs. 160 10³/mL). Houve aumento na proporção molar de propionato, tendência de redução de butirato e menor relação entre acetato e propionato no fluido ruminal de ovelhas suplementadas com OE.

O perfil de ácidos graxos da gordura no leite de vacas suplementadas com OE pode ser modificado pela ação desses compostos sobre a população microbiana e consequentemente sobre a biohidrogenação no rúmen. A suplementação de eugenol promoveu queda para os ácidos graxos 18:1 *trans*-9; 20:3 *cis*-11, 14, 17; 22:0; 22:5 *cis*-4, 22:5 *cis*-7, 22:5 *cis*-10, 22:5 *cis*-13, 22:5 *cis*-16; 22:6 *cis*-7, 22:6 *cis*-10, 22:6 *cis*-13 e 22:6 *cis* -16, como proporção do ácido graxo total (BENCHAAAR *et al.*, 2012). A inclusão de 250, 500 e 1.000 mg/d de

capsaicina (CapsXL. Pancosma. Genebra. Suíça) sobre a dieta oferecida tendeu aumentar linearmente a concentração (% da gordura do leite) de 18:0, 20:0, 18:2 *cis*-9, *cis*-12, enquanto o 18:1 *trans*-11 tendeu diminuir. A soma dos ácidos graxos *trans* e mono insaturados não foi modificada, ao passo que a concentração de ácidos graxos poli-insaturados foi diminuída linearmente pela suplementação (OH *et al.*, 2015).

A digestibilidade dos nutrientes no trato total de ruminantes suplementados com OE pode ser associada com o composto e com a dose utilizada, como observado por Anassori *et al.* (2011) em estudos com ovinos. Esses autores relataram ausência de efeito sobre a digestibilidade aparente da MO e da FDN em animais consumindo folhas de alho (*Allium sativum*). Porém, ao tratá-los com o óleo gálico, observaram redução de 2,8 e 3,5 % para a digestibilidade da MO e 5,8 e 8,7 % para a FDN nas doses 500 e 750 mg/kg MS da dieta, respectivamente. Em gado de corte, Yang *et al.* (2010a) observaram menor digestibilidade aparente da MO e da FDN para dose de 1.600 mg/d e maior para a dose de 400 mg/d de cinamaldeído. A digestibilidade aparente dos nutrientes (MS, MO, FDN e amido) não foi modificada em vacas leiteiras suplementadas com 250, 500 e 1.000 mg/d de capsaicina (OH *et al.*, 2015), com 1 g/d de uma mistura de eugenol, geranyl acetato e coentro (SANTOS *et al.*, 2010) e com 500 e 1.000 mg/d de cinamaldeído e eugenol (TAGER e KRAUSE, 2011) durante um período médio de suplementação de 25 d. Tekippe *et al.* (2013) observaram aumento na digestibilidade da FDN (34,3 vs. 37,4 %) em vacas alimentadas com 525 mg/d de uma mistura de eugenol e cinamaldeído. Entretanto, Hristov *et al.* (2013) relataram queda na digestibilidade desse nutriente em vacas alimentadas com folhas de orégano.

A suplementação de vacas leiteiras com OE pode alterar o comportamento alimentar e a ingestão de água dos animais. O tempo diário de ingestão de vacas leiteiras foi reduzido pela suplementação de 300 mg/d de cinamaldeído e ácido gálico encapsulados (BLANCH *et al.*, 2016). Tager e Krause (2011) observaram queda de 16 min no tempo da primeira refeição de vacas leiteiras suplementadas com 0,25 g/d de capsaicina. A pungência de alguns OE poderia influenciar o consumo de água, evidências obtidas a partir de trabalhos em camundongos (ZAFRA *et al.* 2003). Em novilhos de corte foi observado menor consumo de água e de matéria seca no grupo de animais suplementados com 0,18 g/d de cinamaldeído e 0,09 g/d de eugenol comparado ao grupo não tratado (44,3 vs. 39,4 L/d) e aumento de 9,4 L/d no consumo de água e de matéria seca em novilhos suplementados com 1 g/d de extrato de pimenta vermelha, contendo 15 % de capsaicina (CARDOZO *et al.*, 2006). Rodriguez-Prado *et al.* (2012) não observaram efeito de doses crescentes de capsaicina sobre o consumo de água (28,6 L/d) de novilhos.

2.8 Transferência dos óleos essenciais para o leite

Monoterpenos e sesquiterpenos quando absorvidos para o sangue podem alcançar tecidos periféricos como a glândula mamária. Outra possível rota de incorporação dos OE no leite é por via pulmonar. Neste caso os OE inalados são absorvidos pelos pulmões e por meio da corrente sanguínea alcançam a glândula mamária (VIALLOINSTA *et al.*, 2000). Lejonklev *et al.* (2013) investigaram a transferência de terpenos extraídos da planta do orégano para o leite de vaca. Os tratamentos foram por meio da exposição respiratória e gastrointestinal (4,14 e 8,28 g/d de orégano), via cânula duodenal, para evitar perdas por eructação e metabolização pelos microrganismos do rúmen. A produção média de leite foi de $23,3 \pm 2,3$ kg/d. A concentração de terpenos no leite foi maior no tratamento (8,28 g/d) via respiratória e via cânula duodenal, na ordenha do mesmo dia e do dia seguinte após o fornecimento do tratamento. O fornecimento de 4,14 g de orégano aumentou somente a concentração de terpenos em amostras de leite obtidas na ordenha do mesmo dia do tratamento.

Como os OE podem ser absorvidos via rúmen e pulmão, o potencial de resíduos em produtos de origem animal não pode ser excluído. A transferência de terpenos para o leite é rápida e dependente da natureza química dos compostos. Substâncias polares difundem-se rapidamente pela corrente sanguínea, enquanto substâncias apolares, como por exemplo, os monoterpenos e sesquiterpenos, provavelmente difundem-se lentamente e assim como os ácidos graxos necessitam de carreadores no sangue (HONKANEN *et al.*, 1964). Os monoterpenos foram identificados na gordura de leite de vacas 8 h e os sesquiterpenos 32 h após a ingestão de feno de milenrama (*Achillea millefolium*). A quantidade máxima dos OE foi encontrada no leite de vacas alimentadas após quatro dias de suplementação (VIALLOINSTA *et al.*, 2000).

Os OE podem modificar as propriedades organolépticas de produtos lácteos, por conferir sabor característico durante o processo de maturação de queijos, por exemplo (CARPINO *et al.*, 2004). Tornambé *et al.* (2008) avaliaram o extrato obtido pelo processo de hidrodestilação de plantas colhidas em pastagem natural da região de Auvergne na França, onde é produzido o tradicional queijo tipo Cantal. Cerca de 70 % dos compostos encontrados foram os terpênicos, constituídos de aldeídos, cetonas, alcanos, ésteres, álcool e benzoicos. A inclusão de 1 $\mu\text{L/L}$ do extrato no leite modificou as propriedades sensoriais, 42 % dos provadores foram capazes de identificar a diferença entre o leite contendo os OE e o controle. As propriedades sensoriais dos queijos fabricados com adição de 3 $\mu\text{L/L}$ do extrato no leite,

após cinco meses de maturação, também foram modificadas. O aroma foi de timol e do carvacrol e o sabor foi descrito pelos provadores como sendo menos salgado, adstringente e persistente.

Em animais de corte suplementados com OE, estes podem ser encontrados no tecido adiposo dos animais. Priolo *et al.* (2004) avaliaram monoterpenos e sesquiterpenos na gordura subcutânea de 40 cordeiros machos submetidos a diferentes períodos de pastejo. Foram detectados *p*-cimeno, α e β cubebene, β cariofileno, zanoreno, dentre outros compostos na gordura subcutânea dos animais.

2.9 Vias de excreção dos óleos essenciais do corpo

Em humanos e camundongos os terpenos podem ser transformados em compostos mais polares e podem ser excretados pela urina e fezes, passando em forma pura pelo trato gastrointestinal ou combinado com sais biliares (SAPRA *et al.*, 2008). Após 48 h da administração de capsaicina via sonda estomacal, menos que 10 % da dose (3 mg/d) foi encontrada nas fezes de ratos (KAWADA *et al.*, 1984). Entretanto, esse alcalóide não foi detectado em fezes de vacas leiteiras suplementadas com 1 g/d de oleoresina de *Capsicum* (OH *et al.*, 2016). Em ratos machos adultos foi observada excreção urinária do carvacrol quando a dose administrada de 1 mmol/kg de peso vivo foi injetada via intramuscular (SUNGANTHI e MANPAL, 2013).

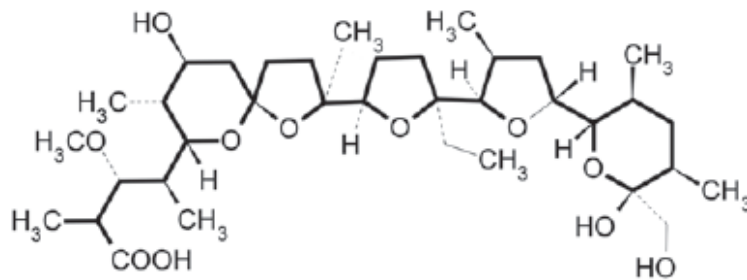
Os OE apresentam diferença na taxa de excreção e metabolização pelos tecidos. Em estudo com camundongos, Suresh e Srinivasan (2010) estudaram a distribuição tecidual e as formas de eliminação da capsaicina, da piperina e do curcumin nas doses de 30, 170 e 500 mg/kg de peso vivo administradas oralmente, respectivamente. A absorção da capsaicina pelos tecidos foi de 93,56 %, sendo 6,34 % excretados nas fezes e 0,095 % na urina. Após a administração dos compostos a concentração máxima foi observada em 1 h no sangue, no soro e no intestino, em 3 h no fígado e em 6 h nos rins. A molécula da peperina foi encontrada em todos os tecidos estudados 6 h após a ingestão. A taxa absorptiva foi similar à da capsaicina, porém não houve excreção pela urina. A absorção intestinal do curcumin foi observada 1 h após a sua ingestão, 36,5 % foram excretados nas fezes e 0,173 %, na urina. Quando a peperina foi administrada concomitantemente ao curcumin foi observada menor excreção pelas fezes e maior pela urina. A peperina e o curcumin também foram encontradas no cérebro entre 24 a 96 h pós consumo. A capsaicina, a piperina e o curcumin apresentaram respectivamente meia vida de 7,8; 18,2 e 12,8 h, mensuradas no soro, sangue, fígado, rim e

cérebro. Nenhum composto foi identificado nos tecidos após 8 d da suspensão dos tratamentos.

2.10 Monensina

A monensina é um ionóforo *poliéster carboxílico*, classificado como antibiótico e produzido pelo fungo *Streptomyces cinnamensis* (FIGURA 7). Os ionóforos modificam o transporte de íons através da parede celular de bactérias, protozoários e fungos (RUSSEL, 2002). O modo de ação da monensina foi descrito por Russell e Strobel (1989). Nesse trabalho foi estudada a bactéria *Streptococcus bovis*. Quando a monensina liga-se à membrana celular, a primeira reação que ocorre é a saída de K^+ e entrada de H^+ na célula, o que provoca alteração do gradiente iônico. O H^+ acumulado no interior da célula ocasiona diminuição do pH intracelular. A célula responde a esta queda no pH exportando H^+ para o meio extracelular o que permite a entrada de Na^+ para o interior da célula. Outra forma de exportar o H^+ é por meio da bomba de próton ATPase. Assim, grande parte da energia produzida pela célula é utilizada pelas bombas de Na^+/K^+ e de próton ATPase na tentativa de manter o pH e o balanço iônico celular. A célula então diminui a capacidade de crescimento e de reprodução.

Figura 7 - Fórmula estrutural da monensina.



A monensina seletivamente inibe bactérias produtoras de acetato, o que impacta o perfil de fermentação ruminal (SCHELLING, 1984). O potencial de mudança da proporção molar de acetato por propionato e a consequente redução na produção de metano por unidade de energia digerida e aumento da disponibilidade intestinal de aminoácidos dietéticos são os principais benefícios alcançados com a suplementação de monensina em ruminantes (DUFFIELD e BAGG, 2000). A diminuição da concentração de amônia ruminal relaciona-se com a redução da atividade proteolítica e das bactérias fermentadoras obrigatórias de aminoácidos (RUSSEL, 2002). Como consequência, maiores quantidades de proteína alimentar e aminoácidos passam pelo rúmen e alcançam o intestino delgado. Contudo, os

ionóforos podem causar redução do fluxo de proteína microbiana para o animal (IPHARRAGUERRE e CLARK, 2003).

A monensina tem efeito anti-metanogênico mais evidenciado em novilhos de corte do que as vacas leiteiras (APPUHAMY *et al.*, 2013). A habilidade desse ionóforo em inibir seletivamente as bactérias produtoras de acetato, butirato e de formato e favorecer as que reduzem succinato à propionato (McGUFFEY *et al.*, 2001) aumenta a relação entre acetato e propionato no rúmen. O aumento dessa relação diminui o substrato primário (H^+) para a metanogênese e melhora a eficiência de utilização da energia alimentar.

A suplementação com ionóforos pode diminuir a incidência de cetose e acidose ruminal (DUFFIELD e BAGG, 2000). A maior produção de propionato ruminal favorece a síntese hepática de glicose (IPHARRAGUERRE e CLARK, 2003). Então, a maior concentração de glicose circulante promove a secreção de insulina e reduz a mobilização lipídica com redução dos ácidos graxos não esterificados no sangue (DUFFIELD *et al.*, 1998). Em adição, a menor produção de butirato no rúmen promovido pela monensina pode também reduzir a conversão do butirato à betahidroxibutirato pelo epitélio ruminal (GREEN *et al.*, 1999).

A monensina reduz acidose ruminal pela inibição da bactéria *Streptococcus bovis* que tem seu crescimento favorecido em condições de amido abundante e que são preferencialmente produtoras de lactato (RUSSELL e STROBEL, 1989). Além disso, as bactérias que utilizam lactato, *Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium*, são resistentes à monensina (NAGARAJA e TAYLOR, 1987). Portanto, a inclusão desse ionóforo pode reduzir a produção e aumentar a utilização de lactato com consequente aumento do pH do rúmen, contribuindo com a estabilidade do pH e a saúde ruminal. Green *et al.* (1999) relataram aumento do pH ruminal (6,55 vs. 6,75) em vacas suplementadas com 335 ± 33 mg/d de monensina durante o período de transição.

Duffield *et al.* (2008) resumiram resultados de 77 experimentos sobre suplementação de monensina para vacas leiteiras. A dose média avaliada foi de 330 mg/vaca/d. A monensina reduziu o CMS (- 2 %) e as porcentagens de gordura (- 3 %) e de proteína no leite (-1 %). A eficiência alimentar e o ganho corporal foram melhoradas com a suplementação de monensina e as produções de gordura e de lactose não foram afetadas. Em estudos *in vitro* a monensina inibiu a biohidrogenação de ácidos graxos insaturados, o que aumentou a concentração de 18:2 *trans*-10 *cis*-12, um inibidor da síntese *de novo* de ácidos graxos pela glândula mamária, mecanismo proposto para a queda na porcentagem de gordura em vacas leiteiras suplementadas com monensina (BAUMAN e GRIINARI, 2001)

Aparentemente, a inclusão de monensina em dietas de animais de produção não apresenta efeitos nocivos à saúde humana. Bagg *et al.* (2005) suplementaram vacas leiteiras com 72, 144 e 240 ppm/d de monensina e relataram queda no desempenho leiteiro. Porém, mesmo nos animais recebendo altas doses o ionóforo não foi detectado no leite.

2.11 Estudos comparativos: vacas leiteiras suplementadas com óleos essenciais ou monensina

Os OE e a monensina atuam sobre a membrana citoplasmática dos microrganismos ruminais. Em sistema de fluxo contínuo o timol, na dose de 500 mg/L de fluido ruminal, reduziu a proporção molar de valerato e o eugenol, na mesma concentração aumentou esse AGV, sugerindo que esses compostos apresentaram diferentes alvos na célula bacteriana (CASTILLEJOS *et al.*, 2006). Outros mecanismos de ação são propostos para os OE, tais como efeito inibitório sobre a captação de glicose pelos microrganismos (GILL e HOLLEY, 2004); alteração no perfil lipídico da membrana celular bacteriana (Di PASQUA *et al.*, 2006) e prejuízo na atividade de enzimas relacionadas com a biossíntese de ácido graxo (MEADES *et al.*, 2010) e divisão celular (DOMADIA *et al.*, 2007).

Os ionóforos possuem resposta consistente sobre o desempenho e fermentação ruminal de vacas leiteiras, promovendo aumento na eficiência alimentar e redução da relação entre acetato e propionato no rúmen (IPHARRAGUERRE e CLARK, 2003). Os OE devido à variedade de compostos disponíveis parecem afetar o desempenho de vacas leiteiras variavelmente (KHIAOSA-ARD e ZEBELI, 2013). Esses compostos não afetaram o CMS e o desempenho leiteiro de vacas em estudos comparativos com a monensina (Tabela 3).

O desempenho leiteiro (DRONG *et al.*, 2016a), parâmetros bioquímicos, hematológicos e imunológicos (DRONG *et al.*, 2016b), composição da microbiota ruminal (SCHÄREN *et al.*, 2017) e os marcadores inflamatórios (DRONG *et al.*, 2017) foram avaliados em vacas leiteiras com alta condição corporal (escore corporal = 3,95) suplementadas com uma mistura de OE (Timol, eugenol, a valinina e o limonemo. Crina[®] Ruminants. DSM. Parsippany, NJ) ou 335 mg/d de monensina durante - 42 d pré parto (P1), 1 a 14 DEL (P2) e 15 a 56 DEL (P3). As vacas não suplementadas com baixa condição corporal foram o controle positivo (BCCP) e as de alta condição corporal foram o controle negativo (ACCN).

Drong *et al.* (2016a) observaram que a eficiência alimentar (leite corrigido para energia por CMS) foi melhorada no grupo suplementado com monensina comparado às vacas controle no P2. O teor de nitrogênio ureico no leite foi reduzido em vacas ACCN comparado

à monensina no P2 e P3. A concentração de betahidroxibutirato no sangue foi reduzida em vacas BCCP e em vacas suplementadas com monensina. A proporção molar de propionato (+ 32 %) e de isovalerato (+ 69 %) foi aumentada pela monensina comparada à ACCN. Os OE não melhorou o desempenho leiteiro e o ionóforo melhorou a eficiência alimentar de vacas no início da lactação.

Drong *et al.* (2016b) relataram que a concentração da enzima γ -glutamyltransferase e de células brancas do sangue foi aumentada em vacas suplementadas com OE comparado à monensina. Vários parâmetros sanguíneos foram afetados pelo período, com maior variabilidade próximo ao parto. Não houve efeito de tratamento para a concentração de células vermelhas, linfócitos, monócitos, células mononucleares no sangue, CD4⁺, CD8⁺ e na intensidade de fluorescência dos leucócitos polimorfonucleares. A resposta imunológica após a vacina de BVD foi mais evidenciada em vacas suplementadas com monensina comparado ao OE pela maior proporção de resposta positiva à vacinação. Os autores sugerem que a monensina afeta direta ou indiretamente o fígado e o sistema imune, porém os mecanismos não foram elucidados.

Schären *et al.* (2017) verificaram que a monensina diminuiu a abundância relativa das bactérias dos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (*Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* e *Erysipelotrichaceae* e aumentou *Actinobacteria* (*Coriobacteriaceae*), *Bacteroidetes* (*Prevotella*), *Cyanobacteria* e *Firmicutes* (*Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*). A monensina não afetou a população de Archaea. A inclusão do OE não modificou a microbiota ruminal de vacas leiteiras comparado à BCCP e ACCN.

Drong *et al.* (2017) relataram que a monensina promoveu aumento da concentração de lipopolissacarídeo no rúmen quando comparado à ACCN devido à alteração na população microbiana ruminal. A abundância relativa hepática do gene UPR foi maior em vacas suplementadas com monensina comparado ao OE. Houve aumento da abundância do RNAm do gene Nrf2 no fígado de vacas BCCP. A monensina aumentou a abundância de glutathione peroxidase 3 e haptoglobina pós-parto comparado aos valores antes do parto. A partir dos resultados dos marcadores inflamatórios foi sugerido que o estresse do retículo endoplasmático durante o período de transição foi independente da condição corporal e mais evidenciado em vacas suplementadas com monensina.

Tabela 3 - Consumo de matéria seca (CMS), produção de leite (PL), de gordura (PG) e de proteína (PP) de vacas leiteiras suplementadas com óleos essenciais (OE) ou monensina (MON).

Estudo	Compostos e Dose	CMS (kg/d) ¹		PL (kg/d) ¹		PG (kg/d) ¹		PP (kg/d) ¹		Outros resultados
		OE	MON	OE	MON	OE	MON	OE	MON	
Vendramini <i>et al.</i> (2016)	Timol, eugenol, vanilina, guaiacol e salicialdeído (1g/d)	-0,7	+0,2	+0,2	-0,4	-0,03	-0,05	+0,01	-0,01	Sem efeito sobre a digestibilidade dos nutrientes no trato total e enzimas hepáticas. MON diminuiu acetato:propionato. OE aumentou nitrogênio nas fezes (g/d) comparado à MON.
Benchaar (2015)	Óleo de canela (50 mg/kg MS dieta)	+0,5	-0,6	-0,6	0	-0,02	-0,02	-0,03	-0,04	MON aumentou a proporção de isobutirato e isovalerato. Sem efeito sobre a digestibilidade dos nutrientes, balanço de nitrogênio e a produção de metano.
	Cinamaldeído (50 mg/kg MS dieta)	-0,6	-0,6	-0,4	0	-0,03	0,02	-0,05	-0,04	
Yang <i>et al.</i> (2007)	Óleo gárlico (5 g/d)	-0,3	-0,8	+0,9	-0,1	+0,14	-0,12*	0	-0,02	Sem efeito sobre o perfil fermentativo do rúmen e eficiência alimentar. Leite corrigido para 4 % de gordura tendeu a ser maior para OE com aumento de 1,6 kg/d e queda de 1,8 kg/d para MON. Digestibilidade ruminal da MS foi maior em vacas alimentadas com OE.
	Junípero (2 g/d)	-0,2	-0,8	+0,4	-0,1	+0,11	-0,12*	0	-0,02	
Benchaar <i>et al.</i> (2006)	Timol, eugenol, vanilina e limonemo (2 g/d)	-0,4	-0,6	+2,3	-0,3	-0,13	-0,13	-0,08	-0,05	OE aumentou peso corporal e pH ruminal; MON tendeu reduzir acetato:propionato e diminuiu a concentração de nitrogênio no leite. OE aumentou a digestibilidade total do amido (+ 1 %). O CMS e o leite 4% tendeu aumentar com MON + OE ($P_{\text{interação}} = 0,06$)

¹Variação de resposta comparado aos valores do grupo controle: (+) aumento (-) redução; * $P = 0,01$

2.12 Efeito do carvacrol, cinamaldeído, eugenol, capsaicina e monensina sobre a vasodilatação periférica

A vasodilatação ocorre por relaxamento da musculatura lisa dos vasos sanguíneos. Os monoterpenos agem sobre o sistema cardiovascular, causando vasodilatação, queda na taxa cardíaca e hipotensão (SANTOS *et al.*, 2011). Lima *et al.* (2012) estudaram *in vitro* o relacionamento entre a atividade vasorrelaxante e a natureza estrutural de terpenos de várias plantas medicinais. Esses autores observaram que tanto terpenos com oxigênio em sua molécula quanto os não oxigenados exibiram efeito relaxante em artéria mesentérica superior de camundongos.

As respostas vasorrelaxantes são desencadeadas por mecanismos dependente e independente do endotélio. O endotélio apresenta um papel fundamental na regulação do tônus vascular com liberação de substâncias vasoativas, tais como o óxido nítrico, a prostaciclina, a endotelina, a angiotensina, dentre outras (TARE *et al.*, 1990). A vasodilatação promovida pelo óxido nítrico ocorre por hiperpolarização da membrana pela ativação direta dos canais de potássio ou pela redução da concentração citoplasmática de cálcio (BATLOUNI, 2001). O efeito independente do endotélio está relacionado com a ação direta de substâncias exógenas sobre as células musculares lisas.

Dantas (2014) observou que o carvacrol induziu vasorrelaxamento dos anéis de artéria mesentérica na presença de endotélio funcional (camada íntegra após relaxamento induzido por acetilcolina) e esse efeito não foi alterado após a remoção do endotélio. A resposta vasorrelaxante induzida pelo carvacrol foi independente do endotélio vascular. Os resultados foram obtidos por ensaios eletrofísicos e abordagens farmacológicas e moleculares realizados com camundongos.

Os canais dos receptores TRPV agem como mediadores sensoriais e são ativados por ligantes exógenos como calor, estressores osmóticos e mecânicos. Estes desempenham funções no sistema cardiovascular, como na vasoconstrição, vasodilatação via peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e na produção de óxido nítrico na célula endotelial (BAYLIE e BRAYDEN, 2011). O tônus vascular promovido pelo carvacrol está associado com a ativação do TRPV3 (receptor vaniloide de potencial transitório sub tipo 3), canal iônico sensível à temperatura e amplamente distribuído na pele, no nariz e na língua. A ativação desse receptor promove o aumento do influxo de cálcio e a hiperpolarização da membrana plasmática endotelial (SUGANTHI e MANPAL, 2013). O carvacrol apresenta maior potência na ativação da TRPV3, quando comparado ao eugenol e a capsaicina (XU *et al.*, 2006).

Harada e Yano (1975) utilizaram como modelo animal porcos da Índia e cães para avaliar o efeito do cinamaldeído sobre a vasodilatação periférica. Foram testadas doses de 1 a 10 mg de kg de peso vivo e os resultados foram avaliados por eletrocardiogramas. Houve queda na pressão arterial em ambas as espécies. Wansi *et al.* (2007) relataram queda de 11, 18 e 19 % na pressão sanguínea sistólica em ratos normotensivos tratados com doses de 5, 10 e 20 mg de extrato alcoólico de *Cinnamomum spp* por kg de peso vivo, respectivamente. Em incubados de células cardíacas de ratos, Alvarez-Collazo *et al.* (2014) observaram que o efeito vasorrelaxante promovido pelo cinamaldeído foi dependente de dose e que este composto inibiu canais de cálcio tipo L, que são glicoproteínas de membrana celular presentes no sistema cardiovascular e no sistema nervoso central.

O cinamaldeído promove a vasodilatação de maneira dependente e independente do endotélio. A primeira via ocorre pela estimulação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (YANAGA *et al.*, 2006). O efeito independente do endotélio foi mediado pelo receptor TRPVA1, identificado como alvo sensível ao cinamaldeído em neurônios nociceptivos (BANDELL *et al.*, 2004). Em camundongos, a ativação dos canais TRPVA1 em terminações de nervos sensoriais causa influxo de Ca^{+2} e liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), que se liga a receptores acoplados à proteína G na membrana plasmática de células vasculares, causando hiperpolarização e relaxamento (BAUTISTA *et al.*, 2005). Porém, o TRPA1 não é alvo específico desse composto e a ação do cinamaldeído sobre o sistema vascular é complexa e envolve mecanismos adicionais não relacionados a esse receptor (ALVAREZ-COLLAZO *et al.*, 2014).

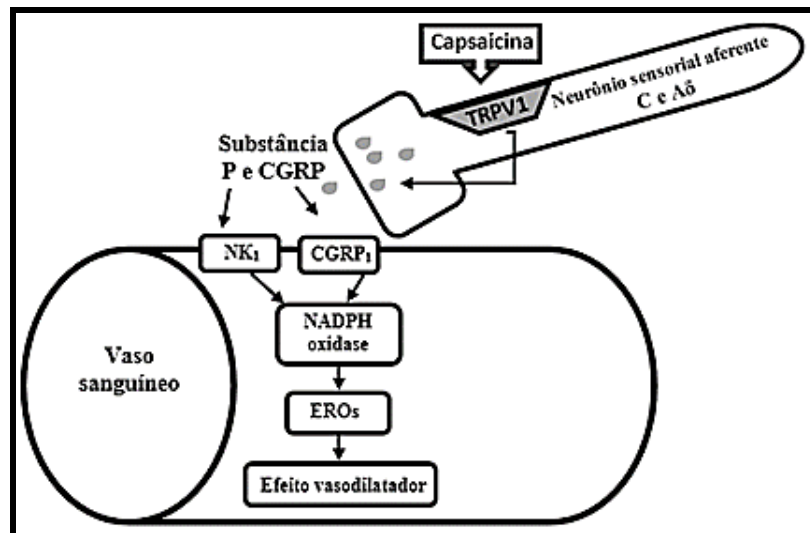
Os efeitos vasorrelaxantes do eugenol foram estudados em aorta torácica de ratos (DAMIANI *et al.*, 2003). Esse composto age como um antagonista do cálcio, inibindo as contrações induzidas pela ativação dos canais de Ca^{2+} ativados por voltagem. Essa ação inibitória foi parcialmente modulada por fatores relacionados ao endotélio via óxido nítrico ciclase guanilil. O eugenol, assim como o carvacrol, ativa a TRPV3. A ativação desse receptor desencadeia a sensação de calor; além disso, o eugenol é capaz de se ligar aos receptores TRPV1, também receptores da capsaicina (XU *et al.*, 2006).

O efeito excitatório da capsaicina relacionado à vasodilatação envolve um aumento na permeabilidade da membrana aos íons, tais como Na^{+} e Ca^{2+} . Essa molécula excita receptores mecanotérmicos localizado em fibras sensoriais, principalmente as fibras C e A δ , que conduzem a informação ao sistema nervoso central e estão amplamente distribuídas no sistema cardiovascular (CALIXTO *et al.*, 2000). A substância P e o CGRP são os principais neuropeptídeos relacionados com a homeostase vascular, sendo o CGRP o principal

neurotransmissor responsável pela vasodilatação mediada por mecanismo não endotelial (STARR *et al.*, 2008).

No sistema cardiovascular, as fibras que contêm o CGRP são mais abundantes ao redor das artérias do que das veias, geralmente esse peptídeo está em associação com a substância P. Existem evidências de estudo conduzido em ratos que o CGRP possui efeito dilatador potente sobre a microvasculatura cutânea, coronária e cerebral. Além disso, espécies reativas ao oxigênio podem desempenhar função importante na modulação da vasodilatação neurogênica (FIGURA 8; STARR *et al.*, 2008).

Figura 8 - Mecanismo proposto para a vasodilatação do vaso sanguíneo promovido pela capsaicina.



Essa molécula ativa o TRPV1 para sintetizar substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Os receptores da neurocinina 1 (NK₁) têm preferência pela substância P e o CGRP₁ pelo CGRP, ambos são antagonistas. Espécies reativas ao oxigênio (EROs) dependem do NADPH oxidase, essa relação é mais evidenciada no mecanismo vasodilatador da circulação cerebral. Adaptado de Starr *et al.* (2008).

A molécula da monensina é capaz de difundir-se através das camadas celulares. Anderson *et al.* (1983) observaram que a monensina promoveu o relaxamento em isolados de artéria coronária de cães. Esses efeitos foram causados pelo aumento de sódio intracelular que estimulou a enzima Ca⁺ e Na⁺ ATPase, o que resultou em hiperpolarização da membrana e supressão da excitabilidade. Em estudo com culturas de células de aorta de camundongos, Kim *et al.* (2005) relataram que o efeito vasorrelaxante desse ionóforo é dependente do endotélio e da concentração administrada. Em células aórticas de ratos e porcinas a monensina aumentou a concentração de óxido nítrico pelo aumento da concentração de cálcio

das cavéolas, estruturas endocíticas e exocíticas das membranas celulares (SCHNEIDER *et al.*, 2002).

A vasodilatação periférica é uma importante resposta termorregulatória contra a hipertermia em ambientes quentes. Maia *et al.* (2005) relataram que em temperaturas acima de 30 °C, a evaporação cutânea contribui com 85 % e a evaporação respiratória com 15 % no processo de perda de calor, resultados observados em vacas em lactação. Contudo, apesar da vasodilatação ser a primeira defesa autômica do animal, a sudação é considerada a mais eficiente.

2.13 Taxa de sudação em bovinos

A sudação é um mecanismo efetivo na perda de calor, devido ao elevado calor latente de evaporação da água e sua eficiência é aumentada pela vasodilatação periférica. Este mecanismo é dependente da velocidade do vento, da radiação solar, da temperatura e da umidade relativa do ar. Em ambiente quente e seco o resfriamento evaporativo é maior, em comparação a um ambiente quente e úmido (GEBREMEDHIN *et al.*, 2008). A estação do ano também modifica a sudação, pois ocorre alteração das características do pelame dos animais, o que pode alterar a atividade das glândulas sudoríparas (FERREIRA *et al.*, 2009). A capacidade máxima de sudação é geralmente observada no verão (SCHLEGER e TURNER, 1965).

A maior sudação é atingida em temperaturas elevadas, neste caso ocorre aumento do volume de sangue para a epiderme, o que proporciona às glândulas sudoríparas maior estímulo e matéria-prima para produzir o suor (BERTIPAGLIA, 2007). A taxa de sudação é menor em área com pelos, independentemente da cor do animal. Essa medida em animais com pelame preto tricotomizado foi 1,84 vezes maior, quando comparados à animais com pelame preto não tricotomizado (GEBREMEDHIN *et al.*, 2007). A taxa de sudação em vacas leiteiras é variável e ainda não está estabelecido um valor limite para vacas em estresse por calor (Tabela 4). Os valores mensurados podem variar de acordo com a metodologia utilizada e com as condições ambientais (GEBREMEDHIN *et al.*, 2008).

Tabela 4 - Valores de taxa de sudação (g/m²/h) de vacas leiteiras em estresse por calor.

Estudo	Raça	Taxa de sudação	THI
Zimbelman <i>et al.</i> (2010)	Holandês	103	> 72
Maia <i>et al.</i> (2005)	Holandês	350	79
Da Silva <i>et al.</i> (1988)	Jersey	118	ND
Allen <i>et al.</i> (1970)	Jersey	374	78
Allen <i>et al.</i> (1970)	Jersey	235	74
Pan <i>et al.</i> (1969)	Jersey	642	86
Pan <i>et al.</i> (1969)	Jersey × Sindhi	555	86
McDowell <i>et al.</i> (1961)	Holandês	213	89
McDowell <i>et al.</i> (1961)	Holstein	360	95
Ferguson e Dowling (1955)	Ayrshire	160	88

ND = não determinado. Adaptado de Gebremedhin *et al.* (2008).

Fatores inerentes ao animal também influenciam a sudação. Existem diferenças entre o pelame de vacas holandesas sob condição de clima tropical. Maia *et al.* (2003) avaliaram as características do pelame (espessura do couro, comprimento médio dos pelos, número de pelos por unidade de área, densidade de massa dos pelos, ângulo de inclinação dos pelos com respeito a superfície da epiderme e diâmetro médio dos pelos) de 973 vacas holandesas. Os resultados mostraram que as características do pelame preto e branco são diferentes. O pelame preto apresentou-se menos denso, com pelos mais curtos e grossos devido à maior necessidade de perder calor, enquanto que o pelame branco é mais denso e com pelos mais compridos, oferecendo uma melhor proteção contra a radiação solar direta.

A cor do pelo e da pele podem modificar a absorção solar e a densidade, o comprimento e a espessura dos pelos podem obstruir a evaporação da água na superfície da pele (GEBREMEDHIN *et al.*, 2007). A idade é outro fator que pode impactar a sudação, em animais mais velhos ocorre redução do suprimento sanguíneo e degeneração dos nervos dérmicos, com consequente diminuição da produção de suor e capacidade de sudação (SCHLEGER e BEAN, 1971).

A quantidade de suor produzido pelo animal depende da densidade e do volume das glândulas sudoríparas ativas por unidade de área da epiderme e as glândulas não são uniformemente distribuídas no corpo do animal (PAN *et al.*, 1969). O menor volume das glândulas indica seu pico funcional e o aumento do volume indica sua inatividade (FERREIRA *et al.*, 2009). Existem diferenças na morfologia da pele entre *B. indicus* e *B. taurus*, que estão particularmente relacionados às glândulas sudoríparas e à taxa de sudação. Os *B. indicus* possuem maior quantidade de glândulas, são mais superficiais e têm maior número de células na camada epitelial (CARVALHO *et al.*, 1995; FERREIRA *et al.*, 2009).

Portanto, a taxa de sudção é maior em bovinos Zebu do que em bovinos europeus (GAUGHAN *et al.*, 1999).

2.14 Frequência respiratória, temperatura retal e balanço do equilíbrio ácido-básico na avaliação da termorregulação corporal

A manutenção da temperatura corporal é mantida por vários mecanismos, que incluem a vasoconstrição ou vasodilatação, a sudção, a frequência respiratória e a taxa metabólica (PINHEIRO *et al.*, 2015). A temperatura retal é usada como referência para controlar a efetividade dos mecanismos homeostáticos, pois indica a temperatura interna do animal. A ofegação é uma defesa autômica, neste caso o calor sensível da água ajuda na remoção de calor na forma de umidade vaporizada pelos pulmões. A taxa respiratória entre 80 a 90 respirações/min (STOWELL, 2000) e temperatura retal acima de 39,2 °C (WEST, 2002) indicam estresse por calor em vacas leiteiras, ambas variáveis são de fácil mensuração no animal.

A temperatura superficial da pele é também considerada de fácil mensuração, pois pode ser obtida através de termômetro do tipo infravermelho, contudo a repetibilidade das mensurações e sua correlação com a temperatura retal e frequência respiratória de vacas leiteiras é baixa (UMPHREY *et al.*, 2001). Em bovinos, Schleger e Turner (1965) relataram correlação negativa entre a temperatura superficial e retal e a taxa de sudção, ou seja, quanto maior a evaporação cutânea, menor será a temperatura interna do animal. A temperatura retal e a frequência respiratória em vacas leiteiras também foram correlacionadas negativamente ($r = -0,156$; UMPHREY *et al.*, 2001).

O balanço ácido-básico sanguíneo pode ser utilizado para avaliação de severidade do estresse por calor em animais. Os pulmões agem na oxigenação sanguínea e na ventilação alveolar. A pressão parcial de oxigênio é o parâmetro utilizado para a avaliação da oxigenação e a pressão parcial de dióxido de carbono ($PACO_2$) é utilizada para a avaliação da ventilação pulmonar (GOMES *et al.*, 1997). Quando as vacas dissipam calor pela ofegação, ocorre aumento da taxa respiratória e a quantidade de dióxido de carbono (CO_2) exalado aumenta. Os rins aumentam a reabsorção de bicarbonato (HCO_3^-) para manter a relação 20:1 ($HCO_3^-:CO_2$) e para tamponar o pH sanguíneo. Isso pode reduzir a quantidade de HCO_3^- na saliva, o que pode ter efeito negativo sobre a capacidade tamponante da saliva no rúmen (BAUMGARD e RHOADS, 2007).

Vacas leiteiras em estresse por calor alteram a ventilação pulmonar o que pode afetar o pH e a $PACO_2$ no sangue. O CO_2 é eliminado mais rápido do que o normal (hiperventilação),

a PACO_2 diminui e o pH do sangue tende a subir, o que desencadeia a alcalose respiratória. Schneider *et al.* (1986) observaram aumento significativo da temperatura retal (39,8 vs. 40,6 °C), na frequência respiratória (97 vs. 125 respirações/min) e no pH sanguíneo (7,39 vs. 7,44) e queda na PACO_2 (36,3 vs. 30,5 mm Hg) e no HCO_3^- (23,0 vs. 21,2 mmol/L) de vacas leiteiras em ambiente não sombreado.

Os valores fisiológicos de HCO_3^- plasmático para bovinos giram em torno de 27 mmol/L (CARLSON, 1997; FREITAS *et al.*, 2010). O aumento do HCO_3^- causa alcalose metabólica e a sua redução causa acidose metabólica. O dióxido de carbono total (TCO_2) é a soma de CO_2 dissolvido no sangue e ligado ao HCO_3^- . Os valores variam de 25,6 a 33,4 mmol/L e são dependentes das condições metabólicas e respiratórias (CARLSON, 1997; FREITAS *et al.*, 2010).

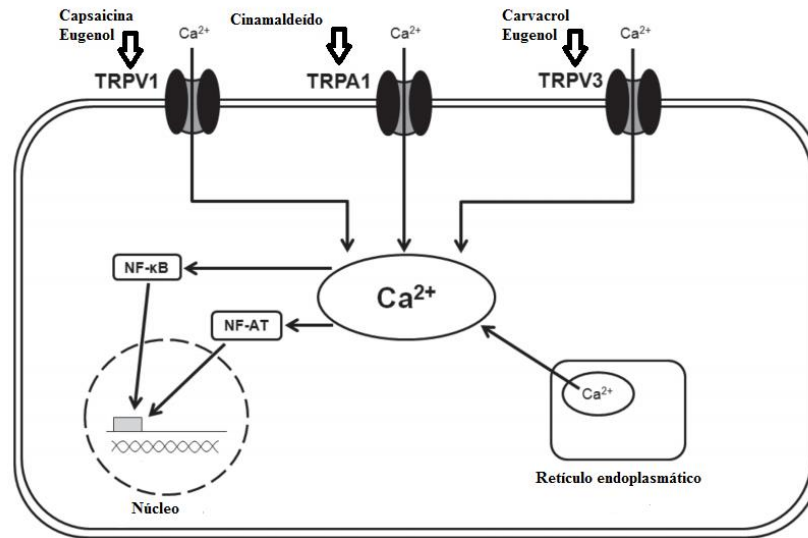
O valor do excesso de base é definido pela quantidade de ácido, em mmol/L, necessário para estabelecer o pH de um litro de sangue, a 37 °C e PACO_2 de 40 mmHg ao valor de 7,4 (BOOKALLIL, 2009). Os valores negativos indicam uma deficiência de bases, o que pode desencadear um quadro de acidose clínica e os valores positivos um quadro de alcalose metabólica (CARLSON, 1997).

2.15 Efeito dos óleos essenciais sobre a saúde de ruminantes

A atividade antioxidante e anti-inflamatória dos OE avaliada em animais monogástricos (YOUN e NOH, 2001 e APPLGATE, 2009) e em humanos (RANASINGHE *et al.*, 2013 e CHOPAN e LITTENBERG, 2017), também pode ser vantajosa para animais ruminantes, principalmente se forem incluídos na dieta de forma protegida da fermentação ruminal. Após a absorção (via rúmen, pulmonária ou intestinal) os OE podem promover vários efeitos fisiológicos no organismo animal, tais como manter a homeostase, melhorar a função celular ou ajudar o metabolismo a voltar ao normal após um desafio (DURMIC e BLACHE, 2012).

Os OE, tais como o eugenol, o carvacrol, o cinamaldeído e a capsaicina podem ativar os receptores de potencial transitório (FIGURA 9), canais que estão presentes em neurônios, no intestino, no pâncreas e em células imunes (HOLZER, 2011). O fator nuclear $\text{NF-}\kappa\text{B}$ são proteínas importantes na transcrição de muitos genes em resposta imune tanto inatas quanto de adaptação. Já o fator nuclear de células T é ativado por desfosforilação mediada por calcineurina e dependente de cálcio/calmodulina, permitindo que ele se desloque para o interior do núcleo e se ligue às sequências reguladoras de genes de várias citocinas, interleucina 2, 4 e a fatores de necrose tumoral (ABBAS e LICHTMAN, 2007).

Figura 9 - Ativação de canais de cálcio via composto secundário de planta através de receptores de potencial transitório (TRP) em células imunes.



A ativação induz o influxo de cálcio. O cálcio intracelular permite fatores de transcrição, tais como o fator nuclear (NF- κ B) e fator nuclear de células T ativadas (NF-AT) entrar no núcleo da célula. A síntese de cálcio a partir do retículo endoplasmático pode ser estimulada via TRP. Adaptado de Oh *et al.* (2017c).

A ligação da capsaicina ao receptor TRPV1 pode modificar as células imunes pelo estímulo ou inibição das citocinas e anticorpos (NEVIUS *et al.*, 2012). Oh *et al.* (2017 b) evidenciaram que a suplementação com capsaicina em vacas leiteiras modulou a resposta de fase aguda induzida por infecção bacteriana. Os tratamentos foram 0, 100 ou 200 mg de CAP_{PR}. Houve queda no CMS e na produção de leite pós desafio com lipopolissacarídeos, porém sem efeito de tratamento. A concentração de haptoglobina, de cortisol e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico diminuíram em vacas suplementadas com CAP_{PR} 24 h pós desafio. Em complementaridade, Oh *et al.* (2015) avaliaram doses de 0, 250, 500 e 1000 mg/d de capsaicina em vacas leiteiras. Houve redução linear das plaquetas e na proporção de linfócitos no total de células vermelhas e aumento de neutrófilos com a suplementação do aditivo. A capsaicina aumentou a relação entre neutrófilo e linfócito, a concentração de células vermelhas e da hemoglobina de forma quadrática. Estes resultados sugerem que a capsaicina tenha facilitado a atividade dos neutrófilos e das células envolvidas com a resposta inflamatória de fase aguda.

Oh *et al.* (2013) utilizaram oito vacas canuladas no rúmen, em quadrado latino 4 x 4 duplo para estudar a ação individual do extrato gálico, do curcumin e da capsaicina sobre a resposta imune de vacas em lactação. Os tratamentos (2 g/d) foram administrados no abomaso pela cânula ruminal 2 h após a alimentação da manhã nos últimos 9 dias de cada período

experimental. Cada período experimental teve duração de 23 d, sendo 14 d de adaptação. Houve tendência da capsaicina de reduzir a porcentagem de neutrófilos e aumentar os linfócitos (+ 2,6 %) comparativamente ao controle. A proporção do total de células CD4⁺, molécula que se expressa na superfície de algumas células T, macrófagos, monócitos e na célula dendrítica, foi maior em amostras de sangue de vacas tratadas com os extratos, indicando efeito estimulatório sobre o sistema imune.

Em estudos com novilhos de corte, Yang *et al.* (2010a) observaram tendência de queda linear na porcentagem de basófilos e quadrática na concentração de haptoglobina no sangue em resposta as doses de 0, 400, 800 e 1.600 mg de cinamaldeído/d. Em vacas leiteiras, a suplementação de uma mistura de curcumina, ácido carnósico (alecrim), cinamaldeído e eugenol durante 36 d diminuiu a contagem de células somáticas no leite (HASHEMZADEH-CIGARI *et al.*, 2014). Os OE também possuem propriedade anti-helmíntica, resultados observados sobre a giárdia (VIDAL *et al.*, 2007) e parasitas gastrointestinais de alta prevalência em bovinos (OLSON *et al.*, 2004).

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LINCHTAM, A. H. *Imunologia Básica: Funções e distúrbios do sistema imunológico*. 2 edição. Rio de Janeiro. Editora Elsevier. 354p, 2007.
- AGGARWAL, B. B. et al. Molecular targets of nutraceuticals derived from dietary spices: potential role in suppression of inflammation and tumorigenesis. **Experimental biology and medicine**, v. 234, p. 825–849, 2009.
- AHUJA, K. D. K. et al. Effects of chili consumption on postprandial glucose, insulin, and energy metabolism. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 84, p. 63–69, 2006.
- AKTHAR, M. S. et al. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. **Biological Sciences and Pharmaceutical Research**, v. 2, p. 1–7, 2014.
- ALLEN, T. E. et al. Moisture, its accumulation and site of evaporation in the coats of sweating cattle. **Journal of Agricultural Science**, v. 74, p. 247–258, 1970.
- ALVAREZ-COLLAZO, J. L. et al. Cinnamaldehyde inhibits L-type calcium channels in mouse ventricular cardiomyocytes and vascular smooth muscle cells. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 466, p. 2089–2099, 2014.
- ANASSORI, E. B. et al. Garlic: A potential alternative for monensin as a rumen modifier. **Livestock Science**, v. 142, p. 276–287, 2011.
- ANDERSON, H. L. et al. Mechanism of canine coronary artery relaxation by monensin. **Circulation Research**, v. 53, p. 168–175, 1983.
- ANDERSON, J. A.; COATS, J. R. Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 102, p. 124–128, 2012.
- APPLEGATE, T. J. Influence of phytochemicals on the immunity of livestock and poultry. Pages 39–59 in *Phytochemicals in Animal Nutrition*. T. Steiner, ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK., 2009.
- APPUHAMY, J. A. D. R. N. et al. Anti-methanogenic effects of monensin in dairy and beef cattle: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 5161–5173, 2013.
- ARISTATILE, B. et al. Protective effect of carvacrol on oxidative stress and cellular DNA damage induced by UVB irradiation in human peripheral lymphocytes. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 29, p. 497–507, 2010.
- BAE K. H. et al. The antibacterial component from *Cinnamomi cortex* against a cariogenic bacterium *Streptococcus mutans* OMZ 176. **Archives of Pharmacal Research**, v. 15, p. 239–241, 1992.
- BAGG, R. et al. Milk residues and performance of lactating dairy cows administered high doses of monensin. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 69, p. 180–185, 2005.
- BANDELL, M. et al. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**, v. 41, p. 849–857, 2004.

- BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, p. 328–338, 2001.
- BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: Low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, v. 70, p. 15–29, 2001.
- BAUMGARD, L. H.; R. P. RHOADS. The effects of heat stress on production and its nutritional implications, in **Penn State Dairy Cattle Nutrition Workshop**, p. 29–38, 2007.
- BAUTISTA D. M. et al. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. **Proceedings of National Academy Science of United States of America**, v. 102, p. 12248–12252, 2005.
- BAYLIE, R. L.; BRAYDEN, J. E. TRPV channels and vascular function. **Acta Physiologica**, v. 203, p. 99–116, 2011.
- BENCHAAR, C. et al. Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 4352–4364, 2006.
- BENCHAAR, C. et al. Effects of essential oils and their components on in vitro rumen microbial fermentation. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 87, p. 413–419, 2007a.
- BENCHAAR, C. et al. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 886–897, 2007b.
- BENCHAAR, C. et al. Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or yucca schidigera saponin extracts. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 4765–4777, 2008.
- BENCHAAR, C.; GREATHEAD, H. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 166–167, p. 338–355, 2011.
- BENCHAAR, C. et al. Eugenol for dairy cows fed low or high concentrate diets: Effects on digestion, ruminal fermentation characteristics, rumen microbial populations and milk fatty acid profile. **Animal Feed Science and Technology**, v. 178, p. 139–150, 2012.
- BENCHAAR, C. Diet supplementation with cinnamon oil, cinnamaldehyde, or monensin does not reduce enteric methane production of dairy cows. **Animal**, v. 10, p. 418–425, 2015.
- BENCHAAR, C. et al. Dose-response to eugenol supplementation to dairy cow diets: Methane production, N excretion, ruminal fermentation, nutrient digestibility, milk production, and milk fatty acid profile. **Animal Feed Science and Technology**, v. 209, p. 51–59, 2015.
- BERTIPAGLIA, E. C. A. Efeitos das características do pelame e da taxa de sudação sobre parâmetros reprodutivos em vacas da raça braford. Tese doutorado. Universidade Estadual de São Paulo-SP. 137p, 2007.

- BLANCH, M. et al. Influence of a mixture of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen fermentation, feeding behavior and performance of lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 219, p. 313–323, 2016.
- BODAS, R. N. et al. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 78–93, 2012.
- BOOKALLIL, M. J. pH of the blood: acid base balance, 2009. Disponível em: <http://www.anaes.med.usyd.edu.au/lectures/acidbase_mjb/acidbase.html> Acesso em: 10 fev. 2017.
- BORCHERS, R. Proteolytic activity of rumen fluid in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 24, p. 1033–1038, 1965.
- BOULANT, J. A. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. **Clinical Infection Disease**, v. 31, Supplement 5, p. 157–161, 2000.
- BROUDISCOU, L. P. et al. In vitro degradation of 10 mono and sesquiterpenes of plant origin by caprine rumen microorganisms. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 1653–1658, 2007.
- BUSQUET, M. et al. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 761–771, 2006.
- CALIXTO, J. B. et al. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 401–418, 2000.
- CALSAMIGLIA, S. et al. Invited Review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2580–2595, 2007.
- CARDOZO, P. W. et al. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 3230–3236, 2004.
- CARDOZO, P.W. et al. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 2572–2579, 2005.
- CARDOZO, P. W. et al. Effects of alfalfa extract, anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2801–2808, 2006.
- CARLSON, G. P. Fluid electrolyte and acid-base balance. In: KANECO, **Journal Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 5.ed. London, England: Academic, p.485–515, 1997.
- CARPINO, S. et al. Composition and aroma compounds of ragusano cheese: native pasture and total mixed rations. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 816–830, 2004.
- CARVALHO, F. A. et al. Breed affects thermoregulation and epithelial morphology in imported and native cattle subjected to heat stress. **Journal of Animal Science**, v.73, p. 3570–3573, 1995.

- CASTILLEJOS, L. et al. Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in in vitro systems. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 2649–2658, 2006.
- CATERINA, M. J. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. **American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, p. 64–76, 2007.
- CHANG, S. T. et al. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 123–127, 2001.
- CHAPMAN, C. E. et al. Short communication: Cinnamaldehyde taste preferences of weaned dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 3607–3611, 2016.
- CHAVES, A. V. et al. A dose-response of cinnamaldehyde supplementation on intake, ruminal fermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. **Livestock Science**, v. 141, p. 213–220, 2011.
- CHEN, Y. C. et al. Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW264.7 macrophages. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 82, p. 537–548, 2001.
- CHOPAN, M.; LITTENBERG, B. The association of hot red chili pepper consumption and mortality: a large population-based cohort study. **Plos One** 12(1): e0169876. 2017.
- CHUNG, M. K.; WANG, S. Cold suppresses agonist-induced activation of TRPV1. **Journal of Dental Research**, v. 90, p. 1098–102, 2011.
- CLUFF, L. et al. Concentration of monoterpenoids in the rumen ingesta of wild mule deer. **Journal of Range Management**, v. 35, p. 192–194, 1982.
- COSENTINO, S. et al. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. **Letters on Applied Microbiology**, v. 29, p. 130–135, 1999.
- DAMIANI, C. E. N. et al. Vasorelaxant effects of eugenol on rat thoracic aorta. **Vascular Pharmacology**, v. 40, p. 59–66, 2003.
- DANTAS, B. P. V. O carvacrol reduz a pressão arterial via ativação de canais receptores de potencial transiente em ratos espontaneamente hipertensos. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba - PB. 129 p, 2014.
- DA SILVA, R. G. et al. Genetic aspects of the variation of the sweating rate and coat characteristics of Jersey cattle. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 11, p. 335–347, 1988.
- DEANS, S. G. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry: impact upon bacteria, fungi and fatty acid levels in ageing mice. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 10, p. 323–328, 1995.
- DELAQUIS, P. J. et al. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 101–109, 2002.

- DELESPAUL, Q. et al. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, p. 256-266, 2000.
- DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, second edition. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, UK, 2002.
- DI PASQUA, R. et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2745–2749, 2006.
- DOMADIA, P. et al. Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, p. 831–840, 2007.
- DORMAN, H. J.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308–316, 2000.
- DRONG, C. et al. Effect of monensin and essential oils on performance and energy metabolism of transition dairy cows. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 100, p. 537–551, 2016a.
- DRONG, C. et al. Effects of monensin and essential oils on immunological, haematological and biochemical parameters of cows during the transition period. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 100, p.1–16, 2016b.
- DRONG, C. et al. Effects of body condition, monensin, and essential oils on ruminal lipopolysaccharide concentration, inflammatory markers, and endoplasmic reticulum stress of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 2751–2764, 2017.
- DUFFIELD, T. F. et al. Effect of prepartum administration of monensin in a controlled-release capsule on postpartum energy indicators in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2354–2361, 1998.
- DUFFIELD, T. F.; BAGG, R. N. Use of ionophores in lactating dairy cattle: A review. **Canadian Veterinary Journal**, v. 41, p. 388–394, 2000.
- DUFFIELD, T. F. et al. A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 2. Production effects. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 1347–1360, 2008.
- DURMIC, Z. et al. Australian plants with potential to inhibit bacteria and processes involved in ruminal biohydrogenation of fatty acids. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 271–284, 2008.
- DURMIC, Z.; BLACHE, D. Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 150–162, 2012.
- EIDI, A. et al. Hepatoprotective activity of cinnamon ethanolic extract against CCL 4-induced liver injury in rats. **Experimental and Clinical Sciences Journal**, v. 11, p. 495–507, 2012.
- EL KHOURY, R. et al. Essential oils modulate gene expression and ochratoxin a production in *Aspergillus carbonarius*. **Toxins**, v. 242, p. 1–14, 2016.
- EL-HAG, E. A. et al. Toxic and growth retarding effects of three plant extracts on *Culex pipiens* larvae (Diptera: Culicidae). **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 388–392, 1999.

- FALEIRO, M. L. The mode of antibacterial action of essential oils. **Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**, v. 3, p. 1143–1156, 2011.
- FERGUSON, K. A.; DOWLING, D. F. The function of cattle sweat glands. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 6, p. 640–644, 1955.
- FERREIRA, F. et al. Taxa de sudação e parâmetros histológicos de bovinos submetidos ao estresse calórico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 763–768, 2009.
- FLORES, A. J. et al. Effects of specific essential oil compounds on the ruminal environment, milk production and milk composition of lactating dairy cows at pasture. **Animal Feed Science and Technology**, v. 186, p. 20–26, 2013.
- FRANCIS, G. et al. The biological action of saponins in animal systems: a review. **Brazilian Journal of Nutrition**, v. 88, p. 587–605, 2002.
- FRANZIOS, G. et al. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2690–2694, 1997.
- FREITAS, M. D. et al. Equilíbrio eletrolítico e ácido-base em bovinos. **Ciência Rural**, v. 40, p. 2608–2615, 2010.
- GARCIA-GARCIA, R. et al. Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 95–100, 2011.
- GAUGHAN, J. B. et al. Heat tolerance of Boran and Tuli crossbred steers. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 2398–2405, 1999.
- GEBREMEDHIN, K. G. et al. Sweating rate of dairy cows under shade and sunny, in ASABE Annual International Meeting, **Technical Papers**, v. 9, p. 1–19, 2007.
- GEBREMEDHIN, K. G. et al. Sweating rates of dairy and feedlot cows under stressful thermal environments in livestock environment VIII - **Proceedings of the 8th International Symposium**, p. 745–753, 2008.
- GIANNENAS, I. et al. Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in Chios dairy ewes. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 5569–5577, 2011.
- GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Mechanisms of Bactericidal Action of Cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of Eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 5750–5755, 2004.
- GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 170–174, 2006.
- GOMES, O. M. Interpretação clínicas das alterações acidobásicas e distúrbio da oxigenação. Belo Horizonte: Edictor, 254p, 1997
- GOTTLIEB, O. R. Phytochemicals—differentiation and function. **Phytochemistry**, v. 29, p. 1715–1724, 1990.

- GREEN, B. L. et al. The impact of the monensin controlled release capsule upon subclinical ketosis in the transition dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 333–342, 1999.
- GUASCH, I. et al. Effects of a blend of essential oils on milk yield and feed efficiency of lactating cows. **Journal of Animal Science**, v. 94, E-Suppl. 5, 2016.
- GYTON, A. C. Body temperature, temperature regulation and fever. In: Gyton AC, Hall JE - **Textbook of Medical Physiology**. 9 ed. Philadelphia: WB Saunders; p. 911–922, 1996.
- HACHIYA, S. et al. Effects of CH-19 Sweet, a non-pungent cultivar of red pepper, on sympathetic nervous activity, body temperature, heart rate, and blood pressure in humans. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, p. 671–676, 2007.
- HALVORSEN, B. L. et al. Content of redox-active compounds (ie. antioxidants) in foods consumed in the United States. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, p. 85–135, 2006.
- HARADA, M.; YANO, S. Pharmacological studies on Chinese cinammon. II. Effects of cinnamaldehyde on the cardiovascular and digestive systems. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, p. 941–917, 1975.
- HASHEMZADEH-CIGARI, F. et al. Effects of supplementation with a phytobiotics-rich herbal mixture on performance, udder health, and metabolic status of Holstein cows with various levels of milk somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 7487–7497, 2014.
- HEIPIEPER, H. J. et al. Influence of phenols on growth and membrane-permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1213–1217, 1991.
- HELANDER, I. M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3590–3595, 1998.
- HERZ, R. S. The Role of odor-evoked memory in psychological and physiological health. **Brain Science**, v. 6, p. 22, 2016.
- HOLZER, P. Transient receptor potential (TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 131, p. 142–170, 2011.
- HONKANEN, E. et al. Studies on the transfer of some flavour compounds to milk, **Acta Chemica Scandinavica**, v. 18, p. 612–618, 1964.
- HORI, T.; TSUZUKI, S. Thermoregulation in adult rats which have been treated with capsaicin as neonates. **Pflügers Archiv**, v. 390, p. 219–223, 1981.
- HORI, T. Capsaicin and central control of thermoregulation. **Pharmacology & Therapy**, v. 26, p. 389–416, 1984.
- HOTTA, M. et al. Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR alpha and gamma, and suppresses COX-2 expression. **Journal of Lipid Research**, v. 51, p. 132–139, 2010.

- HRISTOV, A. N. et al. Effect of *Origanum vulgare* L. leaves on rumen fermentation, production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 1189–1202, 2013.
- HSU, Y. J. et al. Capsaicin supplementation reduces physical fatigue and improves exercise performance in mice. **Nutrients**, v. 8, p.1–15, 2016.
- HYLEMON, P. B.; HARDER, J. Biotransformation of monoterpenes, bile acids, and other isoprenoids in anaerobic ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, p. 475–488, 1998.
- INOUE, N. et al. Enhanced energy expenditure and fat oxidation in humans with high bmi scores by the ingestion of novel and non-pungent capsaicin analogues (Capsinoids). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, p. 380–389, 2007.
- IPHARRAGUERRE, I. R.; CLARK, J. H. Usefulness of ionophores for lactating dairy cows: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 106, p. 39–57, 2003.
- IWAI, B. K. et al. Roles as metabolic regulators of the non-nutrients, capsaicin and capsiate, supplemented to diets. **Proceedings of the Japan Academy**, v. 79, p. 207–212, 2003.
- JUVEN, B. J. et al. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 76, p. 626–631, 1994.
- KALIA, N. P. et al. Capsaicin, a novel inhibitor of the NorA efflux pump, reduces the intracellular invasion of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 2401–2408, 2012.
- KANG, J. et al. Dietary capsaicin reduces obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis in obese mice fed a high-fat diet. **Obesity**, v. 18, p. 780–787, 2009.
- KANG, J. H. et al. 2011. Dietary capsaicin attenuates metabolic dysregulation in genetically obese diabetic mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 310–315, 2011.
- KARLSEN, J. Encapsulation and other programmed release techniques for essential oils and volatile terpenes. **Handbook of Essential oil: science, technology, and applications**. 1 ed, p. 855–862. CRC Press, Boca Raton, FL, 2010.
- KAWADA, T. et al. Gastrointestinal absorption and metabolism of capsaicin and dihydrocapsaicin in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 72, p. 449–456, 1984.
- KAWADA, T. et al. Effects of capsaicin on lipid metabolism fed a high fat diet in rats. **Journal of Nutrition**, v. 116, p. 1272–1278, 1986.
- KAZEMZADEH, R. et al. Effect of lavender aromatherapy on menopause hot flushing: A crossover randomized clinical trial. **Journal of Chinese Medical Association**, v. 79, p. 489–492, 2016.
- KEWELOH, H. et al. Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v. 12, p. 66–71, 1990.
- KHIAOSA-ARD, R.; ZEBELI, Q. Meta-analysis of the effects of essential oils and their bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 1819–1830, 2013.

- KIM, S. S. et al. Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells. **Life Science**, v.73, p. 337– 348, 2003.
- KIM, M. Y. et al. Na⁺-K⁺ pump activation inhibits endothelium-dependent relaxation by activating the forward mode of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in mouse aorta. **AJP Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, p. 2020–2029, 2005.
- KLEVENHUSEN, F. et al. A meta-analysis of effects of chemical composition of incubated diet and bioactive compounds on in vitro ruminal fermentation. **Animal Feed Science and Technology** v. 176, p. 61–69, 2012.
- KOBAYASHI, A. et al. Capsaicin activates heat loss and heat production simultaneously and independently in rats. **American Journal of Physiology**, v. 275, p. 92–98, 1998.
- KUBECZKA, K. H. History and sources of essential oil research. **Handbook of Essential oil: science, technology, and applications**. 1 ed. Pages 3–38. CRC Press, Boca Raton, FL, 2010.
- KUNG, L. et al. A blend of essential plant oils used as an additive to alter silage fermentation or used as a feed additive for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 4793–4800, 2008.
- KWON, J. A. et al. Bactericidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on *Bacillus cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 61–65, 2003.
- LA STORIA, et al. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. **Research in Microbiology**, v. 162, p. 164–172, 2011.
- LEE, T. H. et al. Lack of integrative control of body temperature after capsaicin administration. **Korean Journal of Internal Medicine**, v. 15, p. 103–108, 2000.
- LEE M. S., et al. Effects of capsaicin on lipid catabolism in 3T3-L1 adipocytes. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 935–939, 2011.
- LEE, G. R. et al. Topical application of capsaicin reduces visceral adipose fat by affecting adipokine levels in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity**, v. 21, p. 115–122, 2012.
- LEJONKLEV, J. et al. Transfer of terpenes from essential oils into cow milk. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 4235–4241, 2013.
- LEJONKLEV, J. et al. Short communication: Effect of oregano and caraway essential oils on the production and flavor of cow milk. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 7898–7903, 2016.
- LIMA, T. C. et al. Structural relationships and vasorelaxant activity of monoterpenes. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, p. 1–4, 2012.
- LIMA, M. D. S. et al. Anti-inflammatory effects of carvacrol: Evidence for a key role of interleukin-10. **European Journal of Pharmacology**, v. 699, p. 112–117, 2013.
- LIN, B. et al. Effects of essential oil combinations on sheep ruminal fermentation and digestibility of a diet with fumarate included. **Animal Feed Science and Technology**, v. 184, p. 24–32, 2013.

- LIU, Y. et al. Anti-inflammatory effects of several plant extracts on porcine alveolar macrophages in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 2774–2783, 2015.
- LOURENÇO, M. et al. Effects of saponins, quercetin, eugenol, and cinnamaldehyde on fatty acid biohydrogenation of forage polyunsaturated fatty acids in dual-flow continuous culture fermenters. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 3045–3053, 2008.
- LUDY, M. J. et al. The effects of capsaicin and capsiate on energy balance: Critical review and meta-analyses of studies in humans. **Chemical Senses**, v. 37, p. 103–121, 2012.
- MAEDA, J. A. et al. Germination of clove seeds effect of temperature, fruit pulp and fungicide treatment. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, p. 893–899, 1991.
- MAIA, A. S. C. et al. Haircoat traits in Holstein cows in tropical environments: A genetic and adaptative study. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 843–853, 2003.
- MAIA, A. S. C. et al. Sensible and latent heat loss from the body surface of Holstein cows in a tropical environment. **International Journal of Biometeorology**, v. 50, p. 17–22, 2005.
- MALECKY, M. et al. Effects of two levels of monoterpene blend on rumen fermentation, terpene and nutrient flows in the duodenum and milk production in dairy goats. **Animal Feed Science and Technology**, v. 154, p. 24–35, 2009.
- MALECKY, M.; BROUDISCOU, L. P. Disappearance of nine monoterpenes exposed in vitro to the rumen microflora of dairy goats: Effects of inoculum source, redox potential, and vancomycin. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 1366–1373, 2009.
- MANAIA, M. A. N. Mecanismos redox relativos à actividade antioxidante de sistemas fenólicos. (Dissertação) Universidade de Coimbra, 2011.
- MATSUMOTO, T. et al. Effects of capsaicin-containing yellow curry sauce on sympathetic nervous system activity and diet-induced thermogenesis in lean and obese young women. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 46, p. 309–315, 2000.
- McDOWELL, R. E. et al. Rate of surface evaporation from the normal body surface and with sweat glands inactivated under hot conditions. **Journal of Animal Science**, v. 20, p. 380–385, 1961.
- McGUFFEY, R. K. et al. Ionophores for dairy cattle: current status and future outlook. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 194–203, 2001.
- McINTOSH, F. M. et al. Effects of Essential Oils on Ruminal Microorganisms and Their Protein Metabolism Effects of Essential Oils on Ruminal Microorganisms and Their Protein Metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5011–5014, 2003.
- MEADES, G. et al. Constituents of cinnamon inhibit bacterial acetyl CoA carboxylase. **Planta Medica**, v. 76, p. 1570–1575, 2010.
- MELO, F. H. C. et al. Anxiolytic-like effect of carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: Involvement with GABAergic transmission. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 24, p. 437–443, 2010.

- MICHELIS, J. et al. In vitro dose – response of carvacrol, thymol, eugenol and trans - cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora. **Livestock Science**, v.109, p. 157–160, 2007.
- MIRZAEI-ALAMOUTI, H. et al. Both monensin and plant extract alter ruminal fermentation in sheep but only monensin affects the expression of genes involved in acid-base transport of the ruminal epithelium. **Animal Feed Science and Technology**, v. 219, p. 132–143, 2016.
- NAGARAJA, T. G.; TAYLOR, M. B. Susceptibility and resistance of ruminal bacteria to antimicrobial feed additives. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 1620–1625, 1987.
- NAGARAJA, T. G.; LECHTENBERG, K. F. Liver abscesses in feedlot cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 23, p. 351–369, 2007.
- NAKAYAMA T. et al. Effects of capsaicin on hypothalamic thermo-sensitive neurons in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 7, p. 151–155, 1978.
- NEVIUS, E. et al. Oral ingestion of capsaicin, the pungent component of chili pepper, enhances a discreet population of macrophages and confers protection from autoimmune diabetes. **Mucosal Immunology**, v. 5, p. 76–86, 2012.
- NEWBOLD, C. J. et al. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 114, p. 105–112, 2004.
- OGUEY, C.; WALL, E. H. A blend of cinnamaldehyde, eugenol, and capsicum oleoresin improves milking performance in lactating dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 94, E-Suppl. 5, 2016.
- OH, H. K. et al. Effect of Various Essential Oils Isolated from Douglas Fir Needles upon Sheep and Deer Rumen Microbial Activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 15, p. 777–784, 1967.
- OH, J. et al. Immune and production responses of dairy cows to postruminal supplementation with phytonutrients. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 7830–7843, 2013.
- OH, J. et al. Effects of dietary *Capsicum* oleoresin on productivity and immune responses in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 6327–6339, 2015.
- OH, L. et al. Rumen disappearance of capsaicin and dihydrocapsaicin in lactating dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 94, E-Suppl. 5, 2016.
- OH, J. et al. Effects of rumen-protected *Capsicum* oleoresin on productivity and responses to a glucose tolerance test in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 1888–1901, 2017a.
- OH, J. et al. Effects of rumen-protected *Capsicum* oleoresin on immune responses in dairy cows intravenously challenged with lipopolysaccharide. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 1902–1913, 2017b.
- OH, J. et al. Host-mediated effects of phytonutrients in ruminants: A review. **Journal of Dairy Science**, v.100. p. 5974–5959, 2017c.

- OHENE-ADJEI, S. et al. Evidence of increased diversity of methanogenic archaea with plant extract supplementation. **Microbial Ecology**, v. 56, p. 234–242, 2008.
- OHKUBO, T.; SHIBATA, M. The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. **Journal of Dental Research**, v. 76, p. 848–851, 1997.
- OHNUKI, K. et al. Administration of capsiate, a non-pungent capsaicin analog, promotes energy metabolism and suppresses body fat accumulation in mice. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, p. 2735–2740, 2001.
- OKUMURA, T. et al. Effect of caffeine and capsaicin on the blood glucose levels of obese/diabetic kk- a (y) mice. **Journal of Oleo Science**, v. 61, p. 515–523, 2012.
- OLSON, M. E. et al. Update on Cryptosporidium and Giardia infections in cattle. **Trends in Parasitology**, v. 20, p. 185–191, 2004.
- OLIVER, S. P. et al. Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: A comprehensive review. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, p. 337–355, 2011.
- PAN, Y.S. et al. Sweating rate at different body regions in cattle and its correlation with some quantitative components of sweat gland volume for a given area of skin. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 20, p. 395–403, 1969.
- PATRA, A. K.; YU, Z. Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 4271–80, 2012.
- PAULI, A.; SCHILCHER, H. In vitro antimicrobial activities of essential oils. In: Baser, K., Buchbauer, G. (Eds.), **Handbook of Essential Oils, Science, Technology, and application**. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 353–547, 2010.
- PEIXOTO-NEVES, D. et al. Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 24, p. 341–350, 2010.
- PERCZAK, A. et al. Degradation of Zearalenone by essential oils under in vitro conditions. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p.1–11, 2016.
- PINHEIRO, C. et al. Características anatomofisiológicas de adaptação de bovinos leiteiros ao ambiente tropical. **Revista Agropecuária Técnica**, v. 36, p. 280–293, 2015.
- PRIOLO, A. et al. Fat volatiles tracers of grass feeding in sheep. **Meat Science**, v. 66, p. 475–481, 2004.
- RAGHAVENRA, H. et al. Eugenol-the active principle from cloves inhibits 5-lipoxygenase activity and leukotriene-C4 in human PMNL cells. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.74, p.23–27, 2006.
- RANASINGHE, P. et al. Medicinal properties of “true” cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 275, 2013.

- RAO, A. et al. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 5062–5069, 2010.
- RAO, H. J.; LAKSHMI. Anti-diarrhoeal activity of the aqueous extract of the bark of *cinnamomum zeylanicum linn* in mice. **Journal of Clinical and Diagnostics Research**, v. 6, p. 215–219, 2012.
- RODRIGUEZ, E., et al. Biology and Chemistry of Plant Trichomes. **Plenum Press**, New York, 1984.
- RODRÍGUEZ-PRADO, M. et al. Effects of dietary addition of capsicum extract on intake, water consumption, and rumen fermentation of fattening heifers fed a high-concentrate diet. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 1879–1884, 2012.
- RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J. Effect of ionophores on ruminal fermentation. Minireview. **Applied Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1–6, 1989.
- RUSSELL, J. B. Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition. Ithaca. Pages 1-121, 2002.
- SAMARASEKERA R. et al. Mosquitocidal activity of leaf and bark essential oils of ceylon *cinnamomum zeylanicum*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, p. 301–303, 2005.
- SAMARGHANDIAN, S. et al. Protective effects of carvacrol against oxidative stress induced by chronic stress in rat's brain, liver, and kidney. **Biochemistry Research International**, v. 2016, p. 1–7, 2016.
- SAMII, S. S. et al. Effects of limonene on ruminal *Fusobacterium necrophorum* concentrations, fermentation, and lysine degradation in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 94, p. 3420–3430, 2016.
- SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 3–21, 2001.
- SANTOS, M. B. et al. Effects of addition of an essential oil complex to the diet of lactating dairy cows on whole tract digestion of nutrients and productive performance. **Animal Feed Science and Technology**, v. 157, p. 64–71, 2010.
- SANTOS, M. R. V. et al. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 764–771, 2011.
- SAPRA, B. et al. Percutaneous permeation enhancement by terpenes: Mechanistic view. **AAPS Journal**, v. 10, p. 120–132, 2008.
- SCHÄREN, M. et al. Differential effects of monensin and a blend of essential oils on rumen microbiota composition of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 2765–2783, 2017.
- SCHELLING, G. Monensin mode of action in the rumen. **Journal of Animal Science**, v. 58, p. 1518–1527, 1984.

- SCHLEGER, A. V.; TURNER, H. G. Sweating rates of cattle in the field and their reaction to diurnal and seasonal changes. **Australian Journal Agricultural Research**, v.16, p. 92–106. 1965.
- SCHLEGER, A. V.; BEAN, K. G. Factors determining sweating competence of cattle skin. **Australian Journal of Biological Science**, v. 24, p. 1291–1300, 1971.
- SCHMIDT, E. Production of essential oils. **Handbook of Essential oil: science, technology, and applications**. 1 ed. Pages 83–120. CRC Press, Boca Raton, FL, 2010.
- SCHNEIDER, P. L. et al. Responses of lactating cows to dietary sodium source and quantity and potassium quantity during heat stress. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 99–110, 1986.
- SCHNEIDER, J. et al. Involvement of Na (+)/Ca (2+) exchanger in endothelial NO production and endothelium-dependent relaxation. **American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**, v. 283, p. 837–844, 2002.
- SELL, C. Chemistry of essential oils. **Handbook of Essential oil: science, technology, and applications**. 1 ed. Pages 121–150. CRC Press, Boca Raton, FL, 2010.
- SHABALA, L. et al. Responses of *Listeria monocytogenes* to acid stress and glucose availability revealed by a novel combination of fluorescence microscopy and microelectrode ion-selective techniques. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1794–1802, 2002.
- SPANGHERO, M. et al. Effect of increasing doses of a microencapsulated blend of essential oils on performance of lactating primiparous dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 153, p. 153–157, 2009.
- STARR, A. et al. A reactive oxygen species-mediated component in neurogenic vasodilatation. **Cardiovascular Research**, v. 78, p. 139–147, 2008.
- STELWAGEN, K. et al. Effect of rumen-protected capsicum on milk production in earling lactating cows in a pasture based-system. **Journal of Animal Science**, v. 94, E-Suppl.5, p. 664, 2016.
- STOWELL, R. R. Heat stress relief and supplemental cooling. In Dairy Housing and Equipment Systems Conf. Proc. Publ. No. 129 of the Natural Resource, Agriculture, and Engineering Service (NRAES). Ithaca, N.Y.: Cornell University, Department of Agricultural and Biological Engineering, 2000.
- SUGANTHI, R. U.; MANPAL, S. Biological and pharmacological of actions carvacrol and its effects on poultry: an Updated Review. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 3581–3595, 2013.
- SURESH, D.; SRINIVASAN, K. Tissue distribution and elimination of capsaicin, piperine and curcumin following oral intake in rats. **Indian Journal of Medical Research**, v. 131, p. 682–691, 2010.
- TAGER, L. R.; KRAUSE, K. M. Effects of essential oils on rumen fermentation, milk production, and feeding behavior in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 2455–2464, 2011.

- TAKAISHI, M. et al. Reciprocal effects of capsaicin and menthol on thermosensation through regulated activities of TRPV1 and TRPM8. **Journal of Physiological Sciences**, v. 66, p. 143–155, 2016.
- TALEBZADEH, R. et al. Effect of essential oils of *Zataria multiflora* on in vitro rumen fermentation, protozoal population, growth and enzyme activity of anaerobic fungus isolated from Mehraban sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 172, p. 115–124, 2012.
- TARE, M. et al. Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium. **Nature**, v. 346, p. 69–71, 1990.
- TASSOUL, M. D.; SHAVER, R. D. Effect of a mixture of supplemental dietary plant essential oils on performance of periparturient and early lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 1734–40, 2009.
- TEKIPPE, J. A. et al. Effects of herbs and essential oils on in vitro batch culture ruminal fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 93(Suppl. 1), p. 175, 2010.
- TEKIPPE, J. A. et al. Rumen fermentation and production effects of *Origanum vulgare* L. leaves in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 5065–5079, 2011.
- TEKIPPE, J. A. et al. Effect of essential oils on ruminal fermentation and lactation performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 7892–7903, 2013.
- TONG, F. et al. The phenolic monoterpenoid carvacrol inhibits the binding of nicotine to the housefly nicotinic acetylcholine receptor. **Pest Management Science**, v. 69, p. 775–780, 2013.
- TORNAMBÉ, G. et al. Addition of pasture plant essential oil in milk: influence on chemical and sensory properties of milk and cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 58–69, 2008.
- TSAO, R.; YU, Q. Nematicidal activity of monoterpenoid compounds against economically important nematodes in agriculture. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, p. 350–354, 2000.
- ULTEE, A. et al. Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 211–218, 1998.
- ULTEE, A. et al. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4606–4610, 1999.
- ULTEE, A. et al. Antimicrobial activity of carvacrol on rice. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 620–624, 2000.
- ULTEE, A. et al. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1561–1568, 2002.
- UMPHREY, J. E. et al. Interrelationships in Lactating Holsteins of Rectal and Skin Temperatures, Milk Yield and Composition, Dry Matter Intake, Body Weight, and Feed Efficiency in Summer in Alabama 1,2. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2680–2685, 2001.
- VAARA, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. **Microbiological Reviews**, v. 56, p. 395–411, 1992.

- VAKILI, A. R. et al. The effects of thyme and cinnamon Essential oils on performance, rumen fermentation and blood metabolites in Holstein calves consuming high concentrate diet. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 26, p. 935–944, 2013.
- VAN DE BRAAK, S. A. A. J.; LEIJTEN, G. C. J. J. Essential Oils and oleoresins: A survey in the Netherlands and other major markets in the European Union. CBI, **Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries**, Rotterdam, the Netherlands, 1999.
- VENDRAMINI, T. H. A. et al. Effects of a blend of essentials oils, chitosan or monensin on nutrient intake and digestibility of lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 214, p. 12–21, 2016.
- VIALONINISTA, C. et al. Transfer of monoterpenes and sesquiterpenes from forages into milk fat. **Le Lait**, INRA Editions, 2000, v. 80, p.635–641, 2000.
- VIDAL, F. et al. *Giardia lamblia*: the effects of extracts and fractions from *Mentha×piperita* Lin. (Lamiaceae) on trophozoites. **Experimental Parasitology**, v. 115, p. 25–31, 2007.
- WALL, E. H. et al. The effects of supplementation with a blend of cinnamaldehyde and eugenol on feed intake and milk production of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 5709–5717, 2014.
- WALL, E. H.; Bravo, D. M. Supplementation with a blend of capsicum and artificial sweetener alters milk yield and nutrient partitioning in lactating dairy cows. **Journal Animal Science**, v. 94, E-Suppl. 5, 2016.
- WALLACE, R. J. et al. Natural products as manipulators of rumen fermentation. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 15, p. 1458–1468, 2002.
- WALLACE, R. J. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, p. 621–629, 2007.
- WANG, L. et al. Microencapsulation of Ginger Volatile Oil Based on Gelatin / Sodium Alginate Polyelectrolyte Complex. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 64, p. 21–26, 2016.
- WANG, L. H. et al. An in vitro investigation of the inhibitory mechanism of β -galactosidase by cinnamaldehyde alone and in combination with carvacrol and thymol. **Biochim Biophys Acta**, v. 1861, p. 3189–3198, 2017.
- WANSI, S. L. et al, Blood pressure lowering effect of the ethanol extract from the stem bark of *Cinnamomum zeylanicum* (Lauraceae) in rats. **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 166–176, 2007.
- WENDAKOON C. N.; SAKAGUCHI, M. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 280–283, 1995.
- WEST, J. W. Physiological effects of heat stress on production and reproduction. **In: Tri-state Dairy Nutrition Conference**, Michigan, p –110, 2002.
- XU, H. et al. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. **Nature Neuroscience**, v. 9, p. 628–635, 2006.

- YANAGA, A. et al. Cinnamaldehyde induces endothelium-dependent and -independent vasorelaxant action on isolated rat aorta. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 2415–2418, 2006.
- YANG, W. Z. et al. Effects of Garlic and Juniper Berry Essential Oils on Ruminal Fermentation and on the Site and Extent of Digestion in Lactating Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 5671–5681, 2007.
- YANG, W. Z. et al. Dose response to cinnamaldehyde supplementation in growing beef heifers: Ruminal and intestinal digestion. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 680–688, 2010a.
- YANG, W. Z. et al. Cinnamaldehyde in feedlot cattle diets: Intake, growth performance, carcass characteristics, and blood metabolites. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 1082–1092, 2010b.
- YIN, Q. et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. **Cytotechnology**, v. 64, p. 43–51, 2012.
- YOUN, H. J.; NOH, J. W. Screening of the anticoccidial effects of herb extracts against *Eimeria tenella*. **Veterinary Parasitology**, v. 96, p. 257–263, 2001.
- YUKAWA, T. A. et al. Prophylactic treatment of cytomegalovirus infection with traditional herbs. **Antiviral Research**, v. 32, p. 63–70, 1996.
- ZAFRA, M. A. et al. Effects of perivagal administration of capsaicin on post-surgical food intake. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 107, p. 37–44, 2003.
- ZEYTINOGLU, H, et al. Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human N-RAS oncogene. **Phytomedicine**, v. 10, p. 292–299, 2003.
- ZIMBELMAN, R. B. et al. Effects of encapsulated niacin on evaporative heat loss and body temperature in moderately heat-stressed lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 2387–2394, 2010.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

**ARTIGO 1 - *SUPPLEMENTATION OF LACTATING DAIRY COWS WITH A BLEND
OF ESSENTIAL OILS***

**ARTIGO FORMATADO DE ACORDO COM A NORMA PARA SUBMISSÃO DO
*JOURNAL OF DAIRY SCIENCE.***

ABSTRACT

Essential oils can affect ruminal fermentation and physiological variables of dairy cows. This experiment evaluated the effect of a blend of essential oils (BEO) on intake, lactation performance, diet digestibility, ruminal fermentation profile, chewing and ingestion behavior, body thermoregulation, blood acid-base balance, and milk fatty acid profile of lactating cows. Twenty-eight Holstein cows (181 ± 102 DIM) were assigned to the treatments no additive (CTL) or BEO (carvacrol, cinnamaldehyde, eugenol and capsaicin. 150 mg/kg of TMR DM) for 8 wk, in a covariate adjusted randomized block design with repeated measures over time. Dry matter intake (DMI) was reduced (19.5 vs. 20.1 kg/d) and milk yield was increased (30.8 vs. 30.1 kg/d) by BEO, inducing gain in milk to feed ratio (1.62 vs. 1.53). Milk fat concentration tended to be increased by BEO, but the secretions of protein, lactose, and total solids, the concentrations of urea N and somatic cells in milk, and body weight and condition score were similar. The total tract digestibility of nutrients was similar, however there was a trend for increased non-NDF OM digestibility on BEO. The molar proportion of acetate in ruminal fluid was reduced and propionate was increased by BEO. Fecal viscosity and dry matter concentration were reduced by BEO, but the daily secretion of urinary allantoin and the concentration of total protozoa in rumen fluid were similar. Cows fed BEO ingested a greater proportion of the daily intake in the morning and tended to ingest a lower proportion at night, tended to have longer meals, and had less meals per day. Ingestion and rumination durations per day and per DMI were similar. Cows fed BEO sorted in favor of short feed particles and against long particles in the morning. Blood urea nitrogen and glucose concentrations were similar. The BEO increased the O_2 in jugular blood. The sweating rate on a hot and dry day was increased by BEO. The mean rectal and skin temperatures and respiration rate were not affected, but the proportion of rectal temperature measurements ≥ 39.2 °C was reduced by BEO at 1400 h (17.8 vs. 28.5 %) and 2000 h (23.2 vs. 34.8 %). The

BEO increased the secretions (g/d) of 18:2 *trans*-10, *cis*-12 and 18:0 *iso* fatty acids in milk. When one sample of milk from BEO cows was offered with two samples of milk from CTL, 59 % of habitual consumers of milk (N = 63) identified the BEO sample correctly. The supplementation of BEO reduced DMI and increased milk yield. The gain in feed efficiency was associated to reduce acetate to propionate ratio in ruminal fluid, altered ingestion behavior, lower body temperature, and increased blood oxygenation.

Key words: capsaicin, feed efficiency, ingestion behavior, thermoregulation

INTRODUCTION

Plant-derived bioactive compounds, frequently referred to as essential oils (EO), represent a wide range of mainly volatile compounds with potential to manipulate ruminal microbial population and fermentation profile (Durmic and Blache, 2012). The use of EO as rumen modifiers is in agreement with the natural trend of the consumer of dairy products. The EO can also have physiological action after absorption from the digestive tract or inhalation from the diet (Lejonklev et al. 2013). The EO have been shown to have antioxidant, anti-inflammatory, immune modulation, and mucolytic properties (Rochfort et al., 2008; Vriens et al., 2008; Durmic and Blache, 2012; Amorati et al., 2013; Oh et al. 2017b) and could affect animal energetics (Oh et al., 2017a). The EO can have non-rumen modulated physiological effects in the host ruminant (Oh et al., 2013), in addition to the effect on rumen microbes.

In general, the antimicrobial action of EO is assumed to involve an ionophore-like mechanism, by acting as a transmembrane carrier of monovalent cations on bacterial cell walls (Ultee et al., 1999), although differing modes of action have been described for a number of compounds (Calsamiglia et al., 2007). It has been demonstrated, mostly by *in vitro* studies, that EO can reduce the ruminal acetate to propionate ratio, AA deamination, and methanogenesis (Calsamiglia et al., 2007; Klevenhusen et al., 2012). Some studies performed with dairy cows have reported improvements in milk yield, feed efficiency, and milk

composition in response to EO (Tassoul and Shaver, 2009; Santos et al., 2010; Tekippe et al., 2011; Hristov et al., 2013; Oh et al., 2015, 2017a), although the detection of positive lactation response to EO supplementation is not consensual (Benchaar et al., 2008; Spanghero et al., 2009; Tager and Krause, 2011; Tekippe et al., 2013). Long-term evaluations of the effect of EO on dairy cow performance are scarce (Khiaosa-ard and Zebeli, 2013). The disparity in animal responses to EO supplementation may be due to the variability among experiments in chemical properties of each EO, and EO combinations, dosage, basal diet, DMI, ruminal fermentation profile, physiological stage of the animals, experimental design and parity (Calsamiglia et al., 2007, Benchaar et al., 2008, Wall et al., 2014).

Capsaicin (an alkaloid from chili peppers) has been shown to be capable of increasing peripheral blood flow with positive action on body thermoregulation (Hori et al., 1984), may affect insulin secretion and sensitivity (van de Wall et al., 2005), and immunity (Nevius et al., 2012). Synergistic and additive effects may occur among various EO (García-García et al., 2011), justifying the use of blends instead of pure chemicals as feed additives (Hashemzadeh-Cigari et al., 2014). In this case, more than one mode of action is likely involved in their antimicrobial and physiological effects (Khiaosa-ard and Zebeli, 2013).

It has been shown that the concentration of volatile EO in milk can be increased by transference from both gastrointestinal and respiratory exposure to EO (Lejonklev et al., 2013). The EO supplementation of dairy cows can affect the sensory properties of the produced milk, even when lactation performance and milk solids concentration were not altered (Lejonklev et al., 2016).

This experiment evaluated the effect of a microencapsulated blend of EO (BEO. Carvacrol, cinnamaldehyde, eugenol, and capsaicin) on intake, lactation performance, feed efficiency, diet digestibility, ruminal fermentation profile, ingestive and chewing behavior,

body thermoregulation, blood acid-base balance, and milk fatty acid profile of lactating cows. In addition, a sensory evaluation of the milk produced by cows fed BEO was performed.

MATERIALS AND METHODS

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the University of Lavras.

Cows, Treatments, and Housing

The experiment was conducted from October 21th to December 15th, 2013 in an open-walled, sand-bedded tie-stall barn with fans and high pressure sprinklers at the Better Nature Research Center (<http://www.holandesflamma.com.br/>). The research center is located at 846 m height, 21° 09' 52.41" latitude south, and 44° 55' 52.40" longitude west. Twenty-eight Holstein cows (181 ± 102 DIM at the beginning of the experiment, 10 primiparous) were individually fed the same TMR for a 14-d standardization period. On d 9 to 14 of this period, DMI, milk yield, milk solids, BW, and BCS were measured and used as covariate in the statistical model.

Cows were then paired blocked primarily by parity (1 vs. ≥ 2) and secondarily by milk yield. Within a block, each cow received a treatment for 8 weeks of a comparison period: Control (CTL. No feed additive) or BEO (150 mg/kg of TMR DM. A microencapsulated blend of pure forms of carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol, and pepper extract containing capsaicin. Activo Premium, Grasp, Curitiba, Brazil). The feed additive was included in the vitamin and mineral premix and was added to the TMR mixed in a stationary feed mixer (Unimix 1200. Casale, São Carlos, Brazil) and offered at 0700 and 1300 h in amounts to allow for 7 to 10 % of offered as daily refusal per cow. Feed was pushed up at least 10 x/d. Cows were milked 2 x/d starting at 0430 and 1630 h in an adjacent herringbone parlor.

Environmental temperature and humidity at the center of the barn were measured at 30-min intervals (EasyLog-USB-2-LCD. Lascar Electronics, Salisbury, United Kingdom) at

2.5 m from the floor. The Temperature-Humidity Index (THI) was calculated according to Yousef (1985) and is reported in Figure 1: $THI = T + 0.36 \times DP + 41.2$, where T = temperature (°C) and DP = dew point (°C). The mean daily temperature and humidity is presented in Figure 2.

Variables and Methodology

The composition of the consumed TMR in nutrients and of the offered TMR in ingredients are reported in Table 1. The DM concentration of the corn silage and the rehydrated and ensiled corn grain were monitored weekly with a Koster Moisture Tester (Koster Crop Tester Inc., Brunswick, OH) and the TMR was adjusted accordingly. Samples of feeds and orts per cow were obtained daily and frozen for the formation of weekly composites based on equal as-fed amounts of daily samples. Composite samples were dried in forced-air oven at 55 °C for 72 h and ground to pass a 1-mm mesh screen (Wiley mill, Thomas Scientific, Swedesboro, NJ). The DM concentration was determined by drying at 100 °C for 24 h. The composition of the consumed diet in nutrients was calculated for each cow based on the composition of offered ingredients and orts on a DM basis. The CP concentration was determined with a micro Kjeldahl apparatus (AOAC International, 2012), ash by incineration at 550 °C for 8 h, the ash-free NDF by filtration in porous crucibles with heat stable alpha-amylase and sodium sulfite (Van Soest et al., 1991), and the EE as in AOAC International (2012). The NFC fraction was calculated: $100 - (CP + EE + ash + NDF)$. The particle size distribution of the fresh TMR was measured on weekly composites of daily samples with the Penn State Particle Separator using the 8 mm and 19 mm diameters screens and pan (Lammers et al., 1996).

Milk yield was recorded daily. Milk samples were collected in proportion to the amount produced on each of 4 consecutive milkings on d 6 and 7 of each experimental week. Samples were stored in flasks containing 2-bromo-2-nitropropane-1-3-diol under refrigeration

for at most 2 days until shipping to a commercial laboratory. Milk solids concentration, SCC, and MUN were measured by mid-infrared analysis (Bentley Instruments Inc., Chaska, MN) at the Laboratory of the Paraná State Holstein Breeders Association (APCBRH, Curitiba, Brazil). Milk energy secretion (Milk E; Mcal/d) was (NRC, 2001): $[(0.0929 \times \% \text{ fat}) + (0.0547 \times \% \text{ protein}) + (0.0395 \times \% \text{ lactose})] \times \text{kg of milk}$. The secretion of ECM (kg/d) was: $\text{Milk E}/0.70$ (assumes 0.70 Mcal/kg of milk with 3.7 % fat, 3.2 % protein, and 4.6 % lactose). The 4% FCM (kg/d) was calculated with the Gaines equation (NRC, 2001): $0.4 \times \text{kg of milk} + 15 \times \text{kg of fat}$.

The BW and BCS were measured at 14-d intervals. The BW was measured after the morning milking during two consecutive days and BCS (1 to 5, Wildman et al., 1982) was the mean of 3 independent evaluators. The daily BW gain was calculated as the slope of the linear regression of BW over days 0 to 56.

Milk samples obtained on d 56 were frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for fat isolation and fatty acid profile determination. The daily milk fatty acid secretion (g/d) was calculated assuming that milk fat had 99.3 % fatty acids (Glasser et al. 2007). Milk samples were thawed at room temperature and lipid extraction was performed with a mixture of diethyl ether and hexane (AOAC, 1988). The organic phase containing the milk fat was evaporated to dryness at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ under oxygen-free nitrogen. The FAME were obtained by base-catalyzed transmethylation (Baldin et al., 2013) and quantified using a gas chromatograph (Agilent Technologies. 7820-A, Santa Clara, CA) with a flame-ionization detector equipped with a CP-Sil 88 fused-silica capillary column ($100\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.2\text{ }\mu\text{m}$ film thickness, Varian Inc, Lake Fores, CA). Operating conditions were as in Cruz-Hernandez et al. (2007).

The total tract apparent digestibility of DM, OM, NDF, and non-NDF OM were determined by total collection of feces on d 54 to 56. Feces were collected concurrent to defecation during three 8-h sampling periods and weighed. The second and third sampling

periods were each delayed by 8 h, thus representing a 24-h collection. Fecal aliquots (equal fresh weight basis) were immediately frozen along the collection period and a composite sample was formed per cow. Composite fecal samples were dehydrated for 72 h at 55 °C in a forced air oven. Concentrations of DM, NDF, and ash were determined as previously described.

Fecal viscosity of the same samples used for the determination of diet digestibility was evaluated according to an adaptation of the methodology of Cannon et al. (2010). Samples of 100 g of fresh feces were diluted in 120 mL of water. The solution was homogenized with a metal spatula for 30 s and filtered through two layers of cheesecloth. The viscosity of the solution was measured with a rotational viscometer (Model DV-E, Brookfield Engineering Laboratories, Middleboro, MA) at 100 rpm with spindle LV-1 and temperature of 24 °C.

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

Chewing activity and ingestion behavior were evaluated on d 49 by visual observation of the buccal activities of each cow at 5-min intervals continuously for 24 h. Buccal activities evaluated were: feed ingestion, water ingestion, rumination, and idleness. Ingestion and rumination per unit of DMI were calculated using the intake of the day in which chewing activity was evaluated. A meal was empirically defined by at least two consecutive 5-min ingestion events following at least 10 min of idleness or rumination. To generate the meal pattern data, the minimum 10-min inter-meal interval was adopted based on the reasoning of

Mullins et al. (2012) for a 12-min interval. Meal duration was the ratio between ingestion time (min/d) and meals/d. Meal size was DMI divided by meals/d. The duration of the first daily meal (conditioned meal) was measured with a chronometer during days 49 to 53. Five evaluators observed the behavior of all cows after offering feed at 0700 h until the last cow finished its first meal.

On d 51 to 53, the proportion of daily intake in the morning (0700 to 1300 h), afternoon (1300 to 1900 h), and night (1900 to 0700 h) was determined by measuring feed availability per cow at 0700, 1300, and 1900 h and orts at 1300, 1900, and 0700 h. Feed particle sorting behavior was evaluated according to Leonardi and Armentano (2003) on d 51. The proportion of particles above the 19 mm mesh diameter screen and above and below the 8 mm mesh screen of the Penn State Particle Separator (Lammers et al., 1996) was evaluated at 0700 and 1300 h for the offered TMR and at 1300, 1900, and 0700 h for refusals. Feed refusals at 1300 h were mixed with feed offered at 1300 h for measurement of the offered TMR particle size of each cow. The predicted intake (as-fed basis) of particles on each screen was: % TMR retained on screen x kg of TMR consumed. The observed intake of particles was: % TMR retained on screen x kg of TMR offered - % orts retained on screen x kg of orts. Sorting values below 100% represent selective refusal, above 100% represent preferential intake, and equal to 100 % represent no selection.

Rectal temperature and respiration rate were measured weekly. Rectal temperature was recorded at 0800, 1400, 2000, and 0200 h with mercury veterinary thermometers (Incoterm, Porto Alegre, Brazil). The respiration rate (breaths/min) was determined at 1400 h as the mean of 3 consecutive 30 s flank movement countings. The skin surface temperature of shaved areas of the rump (sacral region) and shoulder blade (scapular region) were measured on d 14, 35, and 56 with an infrared thermometer (Model 88E. HighMed, São Paulo, Brazil) simultaneously to rectal temperature evaluation.

The sweating rate was evaluated on d 14, 35, and 56 at 1400 h. The colorimetric technique used paper discs impregnated with cobalt chloride (Schleger and Turner, 1965). Filter paper (Whatman 1, 11 μm porosity) was immersed in a 10 % cobalt chloride solution and then oven dried at 100 °C for 12 h. Paper discs (0.5 cm diameter) were cut and dried for 2 min. Three discs were placed on histological slides and fixed with transparent adhesive tape. The slides with disks were immediately placed in a sealed glass containing silica. A 3 x 10 cm rectangular area was shaved 1 d before the measurements on the left flank (Paralumber fossa) of the cows, 20 cm below the dorsal loin. The tape with discs was fixed over the shaved area. The time for each disc to change color from blue violet to light pink was recorded with a chronometer and the mean value was used to calculate the sweating rate ($\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$): $38,446.6/T$, where T is time in seconds.

Blood samples were obtained from the coccygeal vessels for the evaluation of BUN (mg/dL) on d 53 at 0, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18, and 21 h after the morning feed in vacutainer tubes containing EDTA. Plasma was obtained by centrifugation at 1,800 x g for 10 min and before storage at -20 °C and analysis (Urea 500. Doles Reagentes para Laboratórios Ltda, Goiânia, Brazil). Plasma samples were also obtained 12 h post morning feeding on d 14, 28, and 53 with tubes containing EDTA and potassium fluoride for glucose analysis (Glicose Enzimática Líquida. Doles Reagentes para Laboratórios, Goiânia, Brazil).

Jugular blood acid-base balance was analyzed on d 28 and 53 at 1600 h. Samples were obtained in heparinized tubes and were analyzed with an AGS 22 blood gas analyzer (Drake Eletrônica e Comércio Ltda, São José do Rio Preto, Brazil) less than 1 h after sampling. All samples were collected in heparinized tubes within a 30 min interval, at random within block, and were kept under refrigeration from sampling to analysis.

Reticular fluid samples were collect on d 56 with a flexible oro-gastric tube connected to a vacuum pump. Samples were obtained 12.4 ± 0.68 h after morning feeding. A sample

was frozen in liquid nitrogen to suppress fermentation and stored at -20 °C until preparation for analysis of VFA by HPLC (Waters Alliance. 2998 PDA detector, Milford, MA). The analysis conditions were isocratic mobile phase of 100 % aqueous acid solution of phosphoric acid (pH 2.35 to 2.55), oven temperature of 25 ± 5 °C, sample injection volume of 20 μ L, run time 25 min, and detector with wavelength excitation at 210 nm. The separation system consisted of reverse phase C18 ODS 80A (150 x 4.6 mm x 5 μ m). Another sample was mixed to a 36 % formaldehyde solution for protozoa counting. The sample was stained according to Dehority (1984) and total protozoa was enumerated with an optical microscope in a Neubauer chamber (Warner, 1962).

Sensorial Evaluation of Milk Samples

A triangle test for difference (Lawless and Heymann, 1998) was used to determine if milk consumers would be capable to distinguish the milk of cows fed BEO from milk of cows on CTL. A sample of raw milk from each cow (200 mL/cow) was collected directly from the jars in the milking parlor during the afternoon milking on d 56. A pooled sample was formed and kept under refrigeration at 4 °C until the end of the test. The test was performed the next morning and was concluded within 14 h of the start of the milking routine. Sixty-three habitual consumers of milk (at least 3 x/wk) were recruited among faculty, staff, and students of the University of Lavras. Each assessor received three 50 mL aliquots of milk in glass labeled cups. Two milk samples were from CTL cows and one sample was from BEO cows. The assessor was asked to identify the odd milk sample after consuming all three samples in random order. Results were expressed as the proportion of correct identification of the odd sample.

Statistical Analysis

Data obtained over time were analyzed with the PROC MIXED of SAS (version 9.3, 2011; SAS Institute Inc., Cary, NC). The statistical model contained the continuous covariate

effect (measurement of the same variable at the end of the standardization period), the random effect of block (1 to 14), the fixed effects of treatment (CTL or BEO) and time (day, week, or hours), and the interaction between treatment and time. Cow nested within treatment was defined as random. For each variable, the best covariance structure was defined by the Schwarz's Bayesian criteria among first-order autoregressive, compound symmetry, and unstructured. Degrees of freedom were calculated using the Kenward-Roger option. Similar models were used for variables measured once during the experiment and for variables without the covariate adjustment by removing the covariate, time, and its interaction with treatment from the previous model. The proportion of cows with rectal temperature ≥ 39.2 °C and milk sensorial evaluation data were analyzed with PROC GENMOD using logistic regression for binomial data. Significance was declared at $P \leq 0.05$, trends at $P \leq 0.10$, and weak trends at $P \leq 0.15$.

RESULTS

Intake, lactation performance, and BW change are in Table 2. The supplementation of BEO reduced ($P = 0.05$) DMI by - 0.6 kg/d and increased ($P = 0.04$) milk yield by + 0.7 kg/d, increasing the ratio of milk ($P < 0.01$) and ECM ($P = 0.02$) to DMI. The increase in feed efficiency in response to BEO was pronounced from d 2 to 35 of the experiment (Figure 3). The similarity in feed efficiency after d 35 was associated to similarity in DMI between treatments (Figure 4). There was a trend ($P = 0.10$) for BEO to increase milk fat concentration, but no effect was detected ($P \geq 0.21$) on the concentrations of protein, lactose, total solids, and MUN. Milk solids yield was not affected ($P \geq 0.48$) by treatment. The linear SCC score, BCS, and BW gain also did not differ ($P \geq 0.39$). The BEO improved feed efficiency without changing body tissue deposition.

The total tract apparent digestibility of nutrients, rumen microbial yield estimated by the daily urinary allantoin excretion, and fecal viscosity and DM concentration are in Table 3. There was a trend for BEO to increase the digestibility of the non-NDF OM ($P = 0.07$). The numerical increase in NDF digestibility (+ 3.1 %) did not approach statistical significance ($P = 0.45$). The trend for increased digestibility was associated with reduced ($P = 0.05$) fecal viscosity and fecal DM concentration. The linear relationship between fecal viscosity and fecal DM concentration ($r = 0.66$) is shown in Figure 5.

The ruminal fermentation profile and protozoa concentration are in Table 4. The supplementation of BEO reduced ($P = 0.01$) the molar proportion of acetate and increased ($P = 0.02$) the proportion of propionate, resulting in increased ($P = 0.03$) acetate to propionate ratio. The proportion of butyrate in ruminal VFA did not change ($P = 0.37$), as well as the concentration of total protozoa in ruminal fluid ($P = 0.38$).

Chewing activity and ingestion behavior are in Table 5. The durations of ingestion and rumination behaviors per day and per unit of DMI were similar ($P \geq 0.19$) for BEO and CTL cows. However, BEO induced larger meal size ($P < 0.01$) and reduced the number of meals per day ($P = 0.05$). First meal duration also tended ($P = 0.08$) to be increased by BEO and there was a weak trend ($P = 0.15$) for increased mean meal duration.

The proportion of the daily intake in periods of the day and particle size sorting behavior are in Table 6. After being offered the same amount of feed in the morning, cows on BEO had lower ($P = 0.03$)orts as a proportion of the offered TMR at 1300 h, which supports the increase ($P = 0.02$) in the proportion of the daily intake occurring in the morning. On the other hand, from 1900 to 0700 h orts as a proportion of offered TMR was increased ($P = 0.04$) on BEO fed cows, associated to a trend ($P = 0.06$) for reduced proportion of the daily intake at night. Feed particles sorting behavior in the morning was also responsive to treatments. From 0700 to 1300 h, BEO induced sorting against long- ($P = 0.03$) and medium-length ($P <$

0.01) feed particles and selection in favor ($P < 0.01$) of small feed particles. There was no treatment effect ($P \geq 0.21$) on feed particles sorting behavior in the afternoon and night.

Variables describing body thermoregulation are in Tables 7 to 9. The means at 0800, 1400, 2000, and 0200 h for weekly measurements of rectal temperature and skin surface temperatures at the rump and shoulder blade were unaffected ($P \geq 0.61$) by treatment, except for a weak trend ($P = 0.13$) for higher skin surface temperature at 2000 h on BEO (Table 7). The respiration rate measured weekly at 1400 h did not respond to treatment ($P = 0.32$). However, the proportion of rectal temperature measurements ≥ 39.2 °C (112 observations/treatment) was reduced ($P = 0.05$) by BEO at 1400 and 2000 h (Table 8). There was also a weak trend ($P = 0.13$) for BEO to reduce the proportion of cows with rectal temperature ≥ 39.2 °C at 0800 h, but no treatment effect was detected ($P = 0.61$) at 0200 h, suggesting that the depressive effect of BEO on rectal temperature occurred only during the warmer moments of the day.

The sweating rate evaluated at 1400 h on days 14, 35, and 56 are reported in Table 9. On d 14, when the mean THI (77.3) and temperature (29.7 °C) were the highest (77.3) and humidity the lowest (48.6 %) among the 3 sampling day measurements, BEO increased ($P = 0.05$) the sweating rate. A weak trend ($P = 0.15$) for increased sweating rate on BEO supplemented cows was also observed on d 35 (72.4 THI and 83.8 % humidity), but no treatment effect ($P = 0.84$) was detected on d 56 (75.5 THI and 82.6 % humidity). The treatment effect on sweating rate was not associated ($P \geq 0.21$) to changes in rectal and skin surface temperatures at the moment of the evaluation.

Jugular blood acid-base balance is in Table 10. The supplementation of BEO increased ($P < 0.01$) the partial pressure of O₂, the % of oxygen saturation of hemoglobin, and the % oxygen of the total volume. Blood pH, the partial pressure of CO₂, and base excess did not

differ ($P \geq 0.46$). Plasma glucose concentration 12 h post-feeding (Table 11) was not affected by treatment ($P \geq 0.26$), as well as BUN (Figure 6, $P = 0.96$).

Ruminal microbial diversity and metabolism were evaluated using the profile and daily secretion of milk fatty acids (Tables 12 to 14). The proportion of even chain fatty acids in total fatty acids (Table 12) was not affected by treatment ($P \geq 0.17$). However, the secretion (g/d) of 18:2 *trans*-10, *cis*-12 was increased ($P = 0.03$) by BEO (Table 13). Weak trends for BEO to increase the daily secretions of 18:1 *trans*-10 ($P = 0.13$), 18:1 *cis*-11 ($P = 0.14$), and 18:2 *trans*-9, *cis*-11 ($P = 0.12$) were also observed. Among the odd and branched fatty acids (Table 14), the proportion ($P = 0.04$) and daily secretion ($P < 0.01$) of C 18:0 *iso* was increased by BEO supplementation.

The capability of BEO to affect milk aroma and flavor was evaluated by the triangular test (Figure 7). The result of the test indicated that 58.7 % of assessors (37 correct answers out of 63) were able to distinguish ($P = 0.05$) milk from cows fed BEO from CTL milk.

DISCUSSION

The supplementation of BEO increased feed efficiency by reducing DMI and increasing milk yield, with a trend for increased milk fat concentration relative to CTL. The mechanism for the increase in feed efficiency may have involved ruminal events. Ruminal fermentation profile of BEO fed cows had lower acetate to propionate ratio than CTL, indicative of less methane energy loss. This ionophore-like action has been described as a plausible effect of EO on ruminal fermentation (Calsamiglia et al., 2007; Klevenhusen et al., 2012). When 0.5 g/d of capsicum was fed to beef cattle on a 90 % concentrate diet there was a decreased in acetate concentration and in the acetate to propionate ratio in ruminal fluid and an increase in butyrate concentration (Fandiño et al., 2008). The higher milk yield at lower DMI suggests that BEO increased the energetic efficiency of lactating cows. Long-term evaluations of EO for lactating cows are scarce (Kung et al., 2008; Tekippe et al., 2013; Wall

et al., 2014; Drong et al., 2016) and the variation in products, blends, and dosages preclude direct comparisons among those phytochemicals.

The positive effect of BEO on feed efficiency was fast acting, lasted for the first 35 d of the experiment, and did not approach significant differences from CTL after d 35. The feed efficiency of BEO cows was higher than CTL on d 2 of the comparison period, suggesting an acute BEO effect on intake and milk yield regulation. The lack of a negative effect of BEO on DMI during the last 3 weeks of the experiment caused the decay in feed efficiency with elongated experimental duration. During the last 21 days of the experiment, the mean daily THI was higher and more stable than the THI of the first 35 d. During this 21-d period, high environmental temperature was associated with high humidity. The positive effect of BEO on feed efficiency may have interacted with the environment, suggesting better action in hot, but dry environment. Microbial adaptation to the feed additive also could have occurred after d 35. Cardozo et al. (2004) observed that plant extracts were capable of affecting ruminal fermentation profile and protein deamination in a continuous culture system, but microbes were adapted to some extracts after 6 d of fermentation. Ruminal microbial adaptation to EO and the interaction between EO and environment are plausible events and should deserve further evaluation.

The gain in feed efficiency on BEO was associated to a trend for increased total tract apparent digestibility of the non-NDF OM, and non-statistical increases in the digestibilities of DM, OM, and NDF, ruminal microbial yield (Urinary allantoin), and total protozoa concentration. The absence of strong BEO effect on total tract digestibility agrees with previous studies with dairy cows that evaluated capsaicin (Oh et al., 2015), carvacrol (Tekippe et al., 2011), and a blend of cinnamaldehyde and eugenol (Tager and Krause, 2011). The trend for increased digestibility of the non-NDF OM is in concordance with the reduced ruminal acetate to propionate ratio on BEO. The non-NDF OM digestibility plausibly reflects

ruminal NFC degradation, since the similarity between treatments on BUN during a 24-h period suggests that feed protein digestion and deamination was similar.

The reduction in DMI induced by BEO was related to changes in ingestion behavior. The values for the number (12.8/d) and mean duration (22 min) of meals were biologically reasonable (Krause and Combs, 2003; Yang and Beauchemin, 2007). The supplementation of BEO at 150 mg/kg of TMR DM tended to increase first meal duration, reduced meal frequency, and increased meal size. Larger meal size may increase the post-meal decay in ruminal pH (Dado and Allen, 1993). The supplementation of BEO also increased the proportion of daily intake in the morning and induced sorting in favor of short feed particles and against long particles, also capable of increasing the decay post-feeding in ruminal pH (DeVries et al., 2008). Tager and Krause (2011) defined the highest dosage (10 g/d) of a blend of cinnamaldehyde and eugenol at which feed intake was unaffected in dairy cows. The authors supplemented that dosage or 0.25 g/d of capsicum to lactating cows with ruminal cannula. Both products shortened the length of the first meal relative to control without affecting DMI, lactation performance, ruminal fermentation profile, and diet digestibility. Those authors suggested that EO changed diet palatability. Rodriguez-Prado et al. (2008) observed that the supplementation of beef heifers with 0.5 g/d of capsicum reduced meal duration and increased the frequency of meals, related to an increase in total h of ingestion behavior. Dosage, product, and form of supplementation can apparently determine the capacity of EO to affect ingestion behavior and ruminal fermentation profile.

Viscosity and DM concentration of feces were positively correlated and were both reduced by BEO. Increased total tract non-NDF OM digestibility may explain the reduction in fecal viscosity and DM concentration on BEO. However, fecal viscosity was not correlated to the total tract non-NDF OM digestibility across cows ($r = -0.17$; $P = 0.40$). Fecal viscosity is a poorly studied parameter in ruminant nutrition. In broiler chickens fed EO, the change of

dietary starch source from corn to rye increased the water to feed intake ratio and the viscosity of the jejunal and ileal digesta, associated to reduced fat digestibility and BW gain (Lee et al., 2004). The effect of BEO on fecal viscosity may involve the effect on water ingestion. Holstein heifers fed a blend of eugenol and cinnamaldehyde had reduced water ingestion and capsicum oil increased water ingestion (Cardozo et al., 2006). Our data cannot support a direct relationship between digestion or ingestion variables and fecal viscosity or DM concentration.

The BEO treatment reduced the proportion of cows with rectal temperature ≥ 39.2 °C, suggestive of the occurrence of heat stress (Rhoads et al., 2009). The experiment was conducted during the first half of the hot-rainy season of southeast Brazil (October to December). Cows were subjected to THI greater or equal to 68 for 68.6 % of the experiment. Cows on BEO had higher sweating rate than CTL only during a hot and low-humidity day, evaporative heat losses was apparently favored by low relative humidity (Curtis, 1983). Capsaicin can act on body thermoregulation by stimulation of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in the oral cavity (Inoue et al., 2007). Eugenol is also able to bind to capsaicin receptors (Xu et al., 2006). Capsaicin activates warm-sensitive and inhibit cold-sensitive neurons via TRPV1 on the area preoptic-anterior of the hypothalamus and can act directly on the warm-sensitive neurons (Caterina, 2007). Lee et al. (2000) reported a decrease in body temperature (37.1 vs. 36.8 °C) of rats treated with 5 mg/kg of capsaicin via intraperitoneal. Capsaicin (Starr et al., 2008), carvacrol (Suganthi and Manpal, 2013), cinnamaldehyde (Yanaga et al., 2006), and eugenol (Damiani et al., 2003) have also been shown to induce vasodilation. Such effects are usually dose dependent and can be triggered by different mechanisms (e.g., calcium influx, cell hyperpolarization, TRPV, or nitric oxide). A relief in heat stress induced by BEO would reduce the maintenance requirement for thermoregulation, increasing the energetic efficiency of the animal by a post-absorptive

mechanism, in addition to the already discussed gain in the energetic efficiency of the ruminal fermentation as the result of reduced acetate to propionate ratio. However, glucose concentration in plasma was not sensitive to BEO, suggesting that the heat stress relief induced by the additive may have not been of large enough magnitude to act favorably on animal energetics. Such premise deserves further calorimetric evaluation.

At the same respiration rate, cows on BEO had higher jugular blood oxygenation than CTL. Capsaicin (Iwai et al., 2003) and cinnamaldehyde (Iwasaki et al., 2008) increased the consumption of oxygen in anesthetized rats by stimulating the secretion of catecholamine by the adrenal gland. The dosage of capsaicin capable of activating the receptors was 600 x smaller than the dosage of cinnamaldehyde (Iwasaki et al., 2008). There are reports of increased blood hemoglobin concentration in cows fed *Capsicum oleoresin* (Oh et al., 2013, 2015). The effect of BEO on blood oxygen concentration may be involved in the responses in DMI (Ketelaars and Tolkamp, 1996) and feed efficiency.

Cows fed BEO secreted (g/d) more unsaturated fatty acids ruminal biohydrogenation intermediates in milk (18:2 *trans*-10, *cis*-12, 18:1 *trans*-10, 18:2 *cis*-9, *trans*-11, 18:1 *trans*-11) than CTL, at similar concentration of intermediates in total milk fatty acids. The daily secretion of milk fatty acids potentially favorable to human health (Parodi, 1999) was increased by BEO. The increased secretion of biohydrogenation intermediates is suggestive of reduced ruminal pH on BEO (Bauman and Griinari, 2003), in accordance with the ingestion behavior and ruminal fermentation profile and the numerically higher 18:1 *trans*-10 and 18:1 *trans*-11 in milk fat (Griinari et al., 1998). Lourenço et al. (2008) observed that cinnamoyldehyde increased the proportion of 18:1 *trans*-10 and 18:2 *trans*-10, *cis*-12 fatty acids in a continuous culture fermenter. Although, ruminal fluid samples obtained by stomach tubing cows are not considered suitable to evaluate pH, ruminal pH was 6.67 on BEO and

6.71 on CTL ($P = 0.60$), not suggestive of a significant difference. The trend for increased milk fat concentration does not support the occurrence of low ruminal pH on cows fed BEO.

The effect of BEO on odd and branched chain fatty acids in milk fat was minor (effect only on 18:0 *iso*), suggesting that ruminal microbial diversity (Vlaeminck et al., 2006) was not significantly affected by BEO. Similarly, Scharen et al. (2017) reported that a blend of thymol, guaiacol, eugenol, vanillin, salicylaldehyde, and limonene had no effect on the ruminal microbiome diversity of 56-d postpartum dairy cows. The reduction induced by BEO on the acetate to propionate ratio in ruminal fluid could not be related to changes in ruminal microbial diversity estimated by the profile of odd and branched chain fatty acids in milk. The biological significance of the positive BEO effect on C 18:0 *iso* in milk is unknown to us.

Based on the sensory test performed, raw milk from cows fed BEO were correctly identified by the majority of usual consumers of milk. However, the test represents the capacity of identifying an odd milk sample, it is not a measure of preference or of the perceived difference between samples. Milk from BEO cows had similar composition to CTL milk during the sensory evaluation (3.10 vs. 3.04 % fat, 3.27 vs. 3.24 % protein, and 4.44 vs. 4.55 % lactose for BEO and CTL, respectively). The presence of EO in milk may explain the perception of the odd sample. The transfer of volatile EO to milk through respiratory and gastrointestinal exposure has been demonstrated (Lejonklev et al., 2013). Trained sensory assessors detected that 6 sensory attributes differed in milk from cows fed with terpenes, the EO resulted in milk with fresher aroma and lower stored aroma and flavor than control (Lejonklev et al., 2016). Essential oils may be a strategy for the introduction of organoleptic and nutritional properties in dairy products (Revello Chion et al., 2010).

CONCLUSIONS

The supplementation of lactating cows with BEO (Capsaicin, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol) reduced DMI and increased milk yield. The gain in feed

efficiency was associated to reduced acetate to propionate ratio in ruminal fluid, altered ingestion behavior, lower body temperature, and increased blood oxygenation. The BEO increased the sweating rate (evaporative heat loss) at a day of high environmental temperature and low humidity. The majority of people in a group of usual consumers correctly identified milk from BEO fed cows.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Fapemig (Minas Gerais Foundation for Research Support, Belo Horizonte, Brazil) and CNPq (National Research Council, Brasilia, Brazil) for the grants to the authors, to Grasp Indústria e Comércio Ltda (Curitiba, Brazil) for partially funding the project, to the members of Grupo do Leite of the University of Lavras for the help in data collection and animal care, and to Marco Antonio Sundfeld da Gama (Embrapa CNPGL, Brazilian Agricultural Research Corporation, Juiz de Fora, Brazil) for the GLC analysis.

REFERENCES

- Amorati, R., M. C. Foti, and L. Valgimigli. 2013. Antioxidant Activity of Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* 61:10835–10847.
- AOAC International. 1988. Official Methods of Analysis Fat in milk. *JAOAC.* 71:898.
- AOAC International. 2012. Official Methods of Analysis 19th ed. Assoc. Off. 409 Anal. Chem., Arlington, VA.
- Baldin, M., M. A. S. Gama, R. Dresch, K. J. Harvatine and D. E. Oliveira. 2013. A rumen unprotected conjugated linoleic acid supplement inhibits milk fat synthesis and improves energy balance in lactating goats. *J. Anim. Sci.* 91:3305–3314.
- Bauman, D. E., and J. M. Griinari. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 23:203–227.

Benchaar, C., T. A. McAllister, and P. Y. Chouinard. 2008. Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or *Yucca schidigera* saponin extracts. *J. Dairy Sci.* 91:4765–4777.

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

Cannon, S. J., G. C. Fahey Jr, M. R. Murphy, C. L. Dikeman, B. L. Miller, and J. K. Drackley. 2010. Inclusion of psyllium in milk replacer for neonatal calves. Effects on growth, digesta viscosity, rate of passage, nutrient digestibilities, and metabolites in blood. *J. Dairy Sci.* 93:3652–3660.

Cardozo, P. W., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2004. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 82:3230–3236.

Cardozo, P. W., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2006. Effects of alfalfa extract, anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet. *J. Dairy Sci.* 84:2801–2808.

Caterina, M. J. 2007. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292:64–76.

Chen, X. B., and M. J. Gomes. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: An overview of technical details. *Int. Feed Res. Unit, Occasional Publ. Rowett Research Institute, Aberdeen, United Kingdom.*

Cruz-Hernández, C., J. K. G. Kramer, J. J. Kennelly, D. R. Glimm, B. M. Sorensen, E. K. Okine, L. A. Goonewardene, and R. J. Weselake. 2007. Evaluating the conjugated linoleic acid and *trans* 18:1 isomers in milk fat of dairy cows fed increasing amounts of sunflower oil and a constant level of fish oil. *J. Dairy Sci.* 90:3786–3801.

Curtis, S. E. 1983. *Environmental Management in Animal Agriculture*. Iowa State Press, Ames.

Dado, R. G., and M. S. Allen. 1993. Relationship between eating behavior and ruminal pH for dairy cows consuming low or high fiber diets. Page 18 in *Abstr. Conf. Rumen Function*, Cornell Univ., Ithaca, NY.

Damiani, C. E. N., L. V. Rossoni, and D. V. Vassallo. 2003. Vasorelaxant effects of eugenol on rat thoracic aorta. *Vascul. Pharmacol.* 40:59–66.

Dehority, B. A. 1984. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:182–185.

Devries, T. J., F. Dohme, and K. A. Beauchemin. 2008. Repeated Ruminal Acidosis Challenges in Lactating Dairy Cows at High and Low Risk for Developing Acidosis: Feed Sorting. *J. Dairy Sci.* 91:3958–3967.

Drong, C., U. Meyer, D. von Soosten, J. Frahm, J. Rehage, G. Breves, and S. Danicke. 2016. Effect of monensin and essential oils on performance and energy metabolism of transition dairy cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl).* 100:537–551.

Durmic, Z., and D. Blache. 2012. Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. *Anim. Feed Sci. Technol.* 176:150–162.

Fandiño, I., S. Calsamiglia, A. Ferret, and M. Blanch. 2008. Anise and capsicum as alternatives to monensin to modify rumen fermentation in beef heifers fed a high concentrate diet. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145:409–417.

Garcia-Garcia, R., A. Lopez-Malo, and E. Palou. 2011. Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. *J. Food Sci.* 76:95–100.

Glasser, F., M. Doreau, A. Ferlay, and Y. Chilliard. 2007. Technical note: Estimation of milk fatty acid yield from milk fat data. *J. Dairy Sci.* 90:2302–2304.

Griinari, J. M., D. A. Dwyer, M. A. McGuire, D. E. Bauman, D. L. Palmquist, and K. V. V. Nurmela. 1998. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:1251–1261.

Hashemzadeh-Cigari, F., M. Khorvash, G. R. Ghorbani, M. Kadivar, A. Riasi, and Q. Zebeli. 2014. Effects of supplementation with a phytobiotics-rich herbal mixture on performance, udder health, and metabolic status of Holstein cows with various levels of milk somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 97:7487–7497.

Hori, T. 1984. Capsaicin and central control of thermoregulation. *Pharmac. Ther.* 26:389–416.

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

Inoue, N., Y. Matsunaga, H. Satoh, and M. Takahashi. 2007. Enhanced energy expenditure and fat oxidation in humans with high bmi scores by the ingestion of novel and non-pungent capsaicin analogues (Capsinoids). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71:380–389.

Iwai, B. K., A. Yazawa, and T. Watanabe. 2003. Roles as metabolic regulators of the non-nutrients, capsaicin and capsiate, supplemented to diets. *Proc. Japan Acad.* 79:207–212.

Iwasaki, Y., M. Tanabe, K. Kobata, and T. Watanabe. 2008. TRPA1 agonists allyl isothiocyanate and cinnamaldehyde induce adrenaline secretion. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72:2608–2614.

Ketelaars, J. J. M. H., and B. L. Tolkamp, B. J. 1996. Oxygen efficiency and the control of energy flow in animals and humans. *J. Anim. Sci.* 74:3036–3051.

Khiaosa-ard, R., and Q. Zebeli. 2013. Meta-analysis of the effects of essential oils and their bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in ruminants. *J. Anim. Sci.* 91:1819–1830.

Klevenhusen, F., A. Muro-Reyes, R. Khiaosa-ard, B. U. Metzler-Zebeli, and Q. Zebeli. 2012. A meta-analysis of effects of chemical composition of incubated diet and bioactive compounds on *in vitro* ruminal fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 176:61–69.

Krause, K. M., and D. K. Combs. 2003. Effects of forage particle size, forage source, and grain fermentability on performance and ruminal pH in midlactation cows. *J. Dairy Sci.* 86:1382–1397.

Kung, L., P. Williams, R. J. Schmidt, and W. Hu. 2008. A blend of essential plant oils used as an additive to alter silage fermentation or used as a feed additive for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:4793–800.

Lammers, B. P., D. R. Buckmaster, and A. J. Heinrichs. 1996. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. *J. Dairy Sci.* 79:922–928.

Lawless, H. T., and H. Heymann. 1998. *Sensory evaluation of food: principles and practices.* Chapman & Hall. New York. 173–207.

Lee, K. W., H. Everts, H. J. Kappert, J. Van Der Kuilen, A. G. Lemmens, M. Frehner, and A. C. Beynen. 2004. Growth performance, intestinal viscosity, fat digestibility and plasma cholesterol in broiler chickens fed a rye-containing diet without or with essential oil components. *International J. Poultry Sci.* 9:613–618.

Lee, T. H., J. W. Lee, O. Toshimasa, A. Kobayashi, Y. Namba, S. Inou, and S. Kimura. 2000. Lack of integrative control of body temperature after capsaicin administration. *Korean J. Intern. Med.* 15:103–108.

Lejonklev, J., M. M. Løkke, M. K. Larsen, G. Mortensen, M. A. Petersen, and M. R. Wisbjerg. 2013. Transfer of terpenes from essential oils into cow milk. *J. Dairy Sci.* 96:4235–4241.

Lejonklev, J., U. Kidmose, S. Jensen, M. A. Petersen, A. L. F. Helwing, G. Mortensen, M. R. Weisbjerg and M. K. Larsen. 2016. Short communication: Effect of oregano and caraway essential oils on the production and flavor of cow milk. *J. Dairy Sci.* 99:7898–7903.

Leonardi, C., and L. E. Armentano. 2003. Effect of quantity, quality, and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:557–564.

Lourenço, M., P. W. Cardozo, S. Calsamiglia, and V. Fievez. 2008. Effects of saponins, quercetin, eugenol, and cinnamaldehyde on fatty acid biohydrogenation of forage polyunsaturated fatty acids in dual-flow continuous culture fermenters. *J. Anim. Sci.* 86:3045–3053.

Mullins, C. R., L. K. Mamedova, M. J. Brouk, C. E. Moore, H. B. Green, K. L. Perfield, J. F. Smith, J. P. Harner, and B. J. Bradford. 2012. Effects of monensin on metabolic parameters, feeding behavior, and productivity of transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:1323–1336.

Nevius, E., P. K. Srivastava, and S. Basu. 2012. Oral ingestion of Capsaicin, the pungent component of chili pepper, enhances a discreet population of macrophages and confers protection from autoimmune diabetes. *Mucosal Immunol.* 5:76–86.

NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, DC.

Oh, J., A. N. Hristov, C. Lee, T. Cassidy, K. Heyler, G. A. Varga, J. Pate, S. Walusimbi, E. Brzezicka, K. Toyokawa, J. Werner, S. S. Donkin, R. Elias, S. Dowd, and D. Bravo. 2013. Immune and production responses of dairy cows to postruminal supplementation with phytonutrients. *J. Dairy Sci.* 96:7830–7843.

Oh, J., F. Giallongo, T. Frederick, J. Pate, S. Walusimbi, R. J. Elias, E. H. Wall, D. Bravo, and A. N. Hristov. 2015. Effects of dietary *Capsicum* oleoresin on productivity and immune responses in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:6327–6339.

Oh, J., M. Harper, F. Giallongo, D. M. Bravo, E. H. Wall, and A. N. Hristov. 2017a. Effects of rumen-protected *Capsicum* oleoresin on productivity and responses to a glucose tolerance test in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:1888-1901.

Oh, J., M. Harper, F. Giallongo, D. M. Bravo, E. H. Wall, and A. N. Hristov. 2017b. Effects of rumen-protected *Capsicum* oleoresin on immune responses in dairy cows intravenously challenged with lipopolysaccharide. *J. Dairy Sci.* 100:1902–1913.

Parodi, P. W. 1999. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *J. Dairy Sci.* 82:1339–1349.

Revello Chion, A., E. Tabacco, D. Giaccone, P. G. Peiretti, G. Battelli, and G. Borreani. 2010. Variation of fatty acid and terpene profile in mountain milk and “Toma Piemontese” cheese as affected by diet composition in different seasons. *Food Chem.* 121:393–399.

Rhoads, M. L., R. P. Rhoads., M. J. Van Baale., R. J. Collier., S. R. Sanders, W. J. Weber., B. A. Crooker, and L. H. Baumgard. 2009. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. *J. Dairy Sci.* 92:1986–1997.

Rochfort, S., A. J. Parker, and F. R. Dunshea. 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry.* 69:299–322.

Rodriguez-Prado, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, J. Zwieten, L. Gonzalez, and D. Bravo. 2008. Effects of cinnamaldehyde-eugenol and *Capsicum* on rumen fermentation and feeding behavior in beef heifers fed a high-concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 86 (Suppl. 2):588.(Abstr.).

Santos, M. B., P. H. Robinson, P. Williams, and R. Losa. 2010. Effects of addition of an essential oil complex to the diet of lactating dairy cows on whole tract digestion of nutrients and productive performance. *Anim. Feed Sci. Technol.* 157:64–71.

Schären, M., C. Drong, K. Kiri, S. Riede, M. Gardener, U. Meyer, J. Hummel, T. Urich, G. Breves, and S. Dänicke. 2017. Differential effects of monensin and a blend of essential oils on rumen microbiota composition of transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:2765–2783.

Schleger, A. V., and H. G. Turner. 1965. Sweating rates of cattle in the field and their reaction to diurnal and seasonal changes. *Australian Journal Agricultural Research.* 16:92–106.

Spanghero, M., P. H. Robinson, C. Zanfi, and E. Fabbro. 2009. Effect of increasing doses of a microencapsulated blend of essential oils on performance of lactating primiparous dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 153:153–157.

Starr, A., R. Graepel, J. Keeble, S. Schmidhuber, N. Clark, A. Grant, A. M. Shah, and S. D. Brain. 2008. A reactive oxygen species-mediated component in neurogenic vasodilatation. *Cardiovasc. Res.* 78:139–147.

Suganthi, R. U., and S. Manpal. 2013. Biological and pharmacological of actions carvacrol and its effects on poultry: an updated review. *World J. Pharmacy and Pharmaceutical Sci.* 5:3581–3595.

Tager, L. R., and K. M. Krause. 2011. Effects of essential oils on rumen fermentation, milk production, and feeding behavior in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:2455–2464.

Tassoul, M. D., and R. D. Shaver. 2009. Effect of a mixture of supplemental dietary plant essential oils on performance of periparturient and early lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:1734–1740.

Tekippe, J. A., A. N. Hristov, K. S. Heyler, T. W. Cassidy, V. D. Zheljazkov, J. F. S. Ferreira, S. K. Karnati, and G. A. Varga. 2011. Rumen fermentation and production effects of *Origanum vulgare* L. leaves in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:5065–5079.

Tekippe, J. A., R. Tacoma, A. N. Hristov, C. Lee, J. Oh, K. S. Heyler, and T. W. Cassidy. 2013. Effect of essential oils on ruminal fermentation and lactation performance of dairy cows. 7892–7903.

Ultee, A., E. P. W. Kets, and E. J. Smid. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65:4606–4610.

van de Wall, E. H., D. X. Gram, J. H. Strubbe, A. J. Scheurink, and J. M. Koolhaas. 2005. Ablation of capsaicin-sensitive afferent nerves affects insulin response during an intravenous glucose tolerance test. *Life Sci.* 77:1283–1292.

Van Soest, P.J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583–3597.

Vlaeminck, B., V. Fievez, A. R. J. Cabrita, A. J. M. Fonseca, and R. J. Dewhurst. 2006. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:389–417.

Vriens, J., B. Nilius, R. Vennekens. 2008. Herbal compounds and toxins modulating TRP channels. *Curr. Neuropharmacol* 6:79–96.

Wall, E. H., P. H. Doane, S. S. Donkin, and D. Bravo. 2014. The effects of supplementation with a blend of cinnamaldehyde and eugenol on feed intake and milk production of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97:5709–5717.

Warner, A. C. I. 1962. Enumeration of rumen micro-organisms. *Microbiology.* 28:119–128.

Wildman, E. E., G. M. Jones, P. E. Wagner, R. L. Boman, H. F. Troutt, and T. N. Lesch. 1982. A dairy-cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J. Dairy Sci.* 65:495–501.

Xu, H., M. Delling, J. C. Jun, and D. E. Clapham. 2006. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat. Neurosci.* 9:628–635.

Yanaga, A., H. Goto, T. Nakagawa, H. Hikiami, N. Shibahara, and Y. Shimada. 2006. Cinnamaldehyde induces endothelium-dependent and -independent vasorelaxant action on isolated rat aorta. *Biol. Pharm. Bull.* 29:2415–2418.

Yang, W. Z., and K. A. Beauchemin. 2007. Altering physically effective fiber intake through forage proportion and particle length: Digestion and milk production. *J. Dairy Sci.* 90:3410–3421.

Yousef, M. K. 1985. *Stress Physiology in Livestock.* 1st ed. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.

TABLES AND FIGURES

Table 1. Diet composition (% of DM) and particle size distribution (% of as fed) on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO)

	CTL	BEO
Corn silage	47.9	
Tifton hay	3.1	
Finely ground mature corn rehydrated and ensiled	9.1	
Finely ground mature corn	15.4	
Soybean meal	13.5	
Roasted whole soybeans	8.0	
Vitamins and minerals ¹	3.0	
CP	16.5	16.6
NDF	31.2	31.4
NDF from forages	26.0	25.7
Ether extract	4.4	4.4
Ash	6.6	6.5
NFC ²	41.6	41.5
DM, % of as fed	46.4	46.5
Feed particles > 19 mm ³	9.5 ± 1.55	8.8 ± 1.27
Feed particles 8 – 19 mm	30.8 ± 5.17	33.1 ± 3.52
Feed particles < 8 mm	59.7 ± 6.57	58.1 ± 5.89

¹44.3 % limestone, 21.4 % sodium bicarbonate, 10.0 % magnesium oxide, 4.3 % NaCl, 7.1 % urea, and 12.9 % minerals and vitamins (18.5 % Ca; 15.0 % P; 3.0 % Mg; 3.0 % S; 240 ppm Co; 3,000 ppm Cu; 8,000 ppm Mn; 12,000 ppm Zn; 90 ppm Se; 180 ppm I; 8,000 KUI/kg Vit. A; 2,000 KUI/kg Vit. D; 50 KUI/kg Vit. E)

²Nonfiber carbohydrates = 100 - (CP + NDF + Ether extract + Ash)

³Penn State Particle Separator. Mean and SD of weekly samples

Table 2. Intake, lactation performance, SCC, MUN, feed efficiency, BCS, and BW on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO)

	Treatments		SEM	<i>P</i> -value ¹	
	CTL	BEO		Treat	Treat x Time
DMI, kg/d	20.1	19.5	0.19	0.05	0.70
Milk, kg/d	30.1	30.8	0.20	0.04	0.61
4% FCM, kg/d	26.3	26.6	0.23	0.52	0.66
ECM, kg/d	27.7	28.0	0.31	0.40	0.50
Fat, kg/d	0.943	0.956	0.0294	0.76	0.68
Fat, %	3.04	3.15	0.039	0.10	0.73
Protein, kg/d	0.961	0.981	0.0240	0.57	0.94
Protein, %	3.17	3.19	0.046	0.84	0.32
Lactose, kg/d	1.399	1.400	0.0358	0.98	0.99
Lactose, %	4.56	4.52	0.023	0.25	0.37
Solids, kg/d	3.600	3.633	0.0336	0.48	0.68
Solids, %	11.70	11.85	0.082	0.21	0.60
Linear SCC, ² 1 to 9	4.16	4.37	0.168	0.48	0.16
MUN, mg/dL	17.0	16.5	0.38	0.37	0.21
Milk/DMI	1.53	1.62	0.015	< 0.01	0.46
ECM/DMI	1.41	1.46	0.014	0.02	0.52
BCS, 1 to 5	3.41	3.43	0.060	0.82	0.80
BW, kg	651	658	5.4	0.39	0.72
BW gain, ³ g/d	350	378	107.2	0.85	

¹ $P \leq 0.05$ for the fixed effect of time (weeks 1 to 8 or days 1 to 56)

²Equivalency: 4.16 = 224,000 cells/mL and 4.37 = 258,000 cells/mL

³Slope of linear regression of BW over weeks 0, 2, 4, 6, and 8

Table 3. Total tract apparent digestibility of DM, OM, NDF, and non-NDF OM, urinary allantoin excretion and volume, and fecal viscosity and DM concentration on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO)

	CTL	BEO	SEM	<i>P</i> -value
DMD, % of intake	68.4	70.6	1.42	0.28
OMD, % of intake	71.1	73.8	1.45	0.20
NDFD, % of intake	46.2	49.3	2.83	0.45
Non-NDFOMD, % of intake	83.5	86.5	1.09	0.07
Allantoin, mmol/d	239	253	22.0	0.67
Urine volume, L/d	19.4	20.3	1.37	0.66
Fecal viscosity, cP	31.6	24.3	2.44	0.05
Fecal DM, % of fresh	13.7	12.7	0.40	0.05

Table 4. Molar VFA proportions and total protozoa concentration in ruminal fluid on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO)

	CTL	BEO	SEM	<i>P</i> -value
Acetate, % of VFA	57.8	51.4	1.52	0.01
Propionate, % of VFA	26.1	31.3	1.43	0.02
Butyrate, % of VFA	16.1	17.3	0.89	0.37
Acetate/Propionate	2.3	1.7	0.16	0.03
Protozoa, x 10 ⁵ /mL	4.44	5.12	0.624	0.38

Table 5. Chewing activity and ingestion behavior on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO)

	CTL	BEO	SEM	<i>P</i> -value
Ingestion, min/d	290	283	9.3	0.78
Rumination, min/d	510	503	17.5	0.59
Chewing, ¹ min/d	800	786	22.8	0.67
Ingestion, min/kg DMI	13.4	14.8	0.82	0.23
Rumination, min/kg DMI	23.3	26.5	1.60	0.20
Chewing, min/kg DMI	36.8	41.3	2.33	0.19
Laying time, min/d	842	798	28.1	0.29
Meal size, kg of DM/meal	1.5	1.7	0.08	< 0.01
First meal duration, min	44	53	3.4	0.08
Meal duration, min	21	23	0.97	0.15
Meals/d	13.7	11.9	0.61	0.05

¹Ingestion + rumination

Table 6. Proportion of intake in periods of the day and feed sorting behavior on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO)

	CTL	BEO	SEM	<i>P</i> -value
0700 to 1300 h, % of daily intake	30.6	36.6	1.59	0.02
1300 to 1900 h, % of daily intake	47.3	45.8	1.27	0.42
1900 to 0700 h, % of daily intake	22.1	17.6	1.56	0.06
Observed/Predicted, ¹ %				
0700 to 1300 h ¹				
> 19 mm ²	112	69	11.5	0.03
> 8 mm and < 19 mm	93	66	3.1	< 0.01
< 8 mm	102	117	2.5	< 0.01
1300 to 1900 h ¹				
> 19 mm	96	90	6.1	0.47
> 8 mm and < 19 mm	86	89	4.4	0.55
< 8 mm	106	107	2.6	0.83
1900 to 0700 h ¹				
> 19 mm	95	127	17.0	0.21
> 8 mm and < 19 mm	93	92	2.60	0.81
< 8 mm	106	129	14.7	0.30
TMR and orts, as fed basis				
TMR 0700 h, kg	28	28		
Orts 1300 h, kg	14.9	12.4	1.08	0.03
Orts 0700 to 1300 h, % of offered	53.2	44.3	2.05	0.03
TMR 1300 h, ³ kg	32.4	32.1	1.43	0.40
Orts 1900 h, kg	12.2	12.6	1.38	0.59
Orts 1300 to 1900 h, % of offered	37.6	39.2	3.27	0.86
TMR 1900 h, kg	12.2	12.6	1.38	0.59
Orts 0700 h, kg	2.8	5.1	2.1	0.45
Orts 1900 to 0700 h, % of offered	22.9	40.5	6.91	0.04
Daily orts, ⁴ % of offered	6.2	10.6	5.75	0.33

¹ < 100 % = rejection, > 100 % = preferential intake, 100 % = no selection. Sieves of the Penn State Particle Separator

² Long particles (> 19 mm), medium-length particles (> 8 mm and < 19 mm), and short particles (< 8 mm)

³ TMR 1300 h = Orts 1300 h + Offered TMR 1300 h

⁴ Daily orts = (Orts 0700 h/Offered TMR per day) x 100

Table 7. Skin surface and rectal temperatures and respiration rate on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO)

	Treatments		SEM	<i>P</i> -value ¹	
	CTL	BEO		Treat	Treat x Day
Skin surface, °C					
Rump					
0800 h	33.2	33.4	0.31	0.63	0.70
1400 h	33.9	33.8	0.23	0.74	0.21
2000 h	34.5	34.5	0.13	0.94	0.26
0200 h	33.0	33.3	0.26	0.50	0.59
Shoulder blade					
0800 h	33.2	33.0	0.25	0.65	0.17
1400 h	33.9	33.7	0.25	0.61	0.16
2000 h	34.0	34.5	0.13	0.13	0.63
0200 h	33.3	33.2	0.20	0.76	0.42
Rectal, °C					
0800 h	38.4	38.3	0.04	0.45	0.80
1400 h	38.8	38.7	0.05	0.23	0.83
2000 h	38.8	38.8	0.05	0.79	0.86
0200 h	38.7	38.6	0.07	0.80	0.60
Respiration rate, breaths/min					
1400 h	50	48	1.56	0.32	0.17

¹*P* < 0.01 for the fixed effect of week (1 to 8) for rectal temperature and respiration rate, and day (14, 35, and 56) for skin surface temperature

Table 8. Proportion of cows with rectal temperature ≥ 39.2 °C at 0800, 1400, 2000, and 0200 h on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO). Observations/treatment = 112 (14 cows during 8 weeks)

	CTL	BEO	Est ¹	SE ²	Odds ratio	95% CI ³		<i>P</i> -value
0800 h	4.46	0.89	-1.64	1.103	0.19	0.02	1.67	0.13
1400 h	28.5	17.8	-0.60	0.323	0.54	0.28	1.02	0.05
2000 h	34.8	23.2	-0.56	0.299	1.76	0.98	3.17	0.05
0200 h	20.5	17.8	0.17	0.340	0.84	0.43	1.63	0.61

¹Parameter estimate generated with the GENMOD procedure of SAS using logistic regression for binomial data. Control is zero

²Standard error of the estimate

³Profile likelihood 95 % confidence interval for odds ratio

Table 9. Rectal and shoulder blade and rump skin surface temperatures at 1400 h and sweating rate on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO)

	CTL	BEO	SEM	<i>P</i> -value
Day 14				
Rectal temperature, °C	38.7	38.7	0.09	0.91
Skin surface temperature shoulder, °C	34.0	33.8	0.23	0.53
Skin surface temperature rump, °C	33.7	33.8	0.27	0.78
Sweating rate, g/m ² /h	160	221	21.6	0.05
Temperature, ¹ °C	29.7			
Humidity, ¹ %	48.6			
THI	77.3			
Day 35				
Rectal temperature, °C	38.6	38.5	0.14	0.66
Skin surface temperature shoulder, °C	33.2	32.8	0.33	0.24
Skin surface temperature rump, °C	32.3	33.0	0.40	0.21
Sweating rate, g/m ² /h	138	170	15.1	0.15
Temperature, °C	27.3			
Humidity, %	83.8			
THI	72.4			
Day 56				
Rectal temperature, °C	38.9	38.8	0.08	0.63
Surface temperature shoulder, °C	35.5	34.9	0.39	0.55
Surface temperature rump, °C	35.0	35.1	0.36	0.87
Sweating rate, g/m ² /h	424	441	59.7	0.84
Temperature, °C	26.1			
Humidity, %	82.6			
THI	75.5			

¹Mean environmental temperature and humidity of the day of measurement

Table 10. Jugular blood acid-base balance at 1600 h on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO)

	Treatments			<i>P</i> -value ¹	
	CTL	BEO	SEM	Treat	Treat x Day
pH	7.48	7.46	0.011	0.46	0.63
pCO ₂ , ² mm Hg	40.94	41.60	0.667	0.50	0.16
pO ₂ , ³ mm Hg	28.49	36.61	1.689	< 0.01	0.59
HCO ₃ ⁻ , mmol/L	30.41	30.56	0.490	0.83	0.43
Total CO ₂ , mmol/L	31.69	31.85	0.501	0.82	0.41
Base excess, mmol/L	7.01	7.07	0.479	0.93	0.61
SatO ₂ , ⁴ %	56.06	68.19	1.980	< 0.01	0.96
O ₂ ct, ⁵ %	12.76	15.27	0.444	< 0.01	0.95

¹*P* < 0.01 for the fixed effect of day (28 and 53)

²Partial pressure of CO₂

³Partial pressure of O₂

⁴% oxygen saturation of hemoglobin

⁵% oxygen of the total volume

Table 11. Plasma glucose concentration 12 h post-feeding on d 14, 28, and 53 on treatments Control or Blend Essential Oils (BEO)

	CTL	BEO	SEM	<i>P</i> -value
Glucose, mg/dL on d 14	63.4	59.5	2.34	0.26
Glucose, mg/dL on d 28	57.4	56.6	1.81	0.75
Glucose, mg/dL on d 53	60.1	58.6	1.85	0.58

Table 12. Concentration of fatty acids in milk fat (% of total fatty acids) on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO)

	CTL	BEO	SEM	<i>P</i> -value
4:0	3.44	3.43	0.129	0.94
6:0	2.20	2.21	0.071	0.95
8:0	1.36	1.36	0.050	0.93
10:0	3.10	3.16	0.128	0.64
10:1 <i>cis</i> -9	0.29	0.28	0.013	0.68
12:0	3.63	3.67	0.159	0.78
12:1 <i>cis</i> -9 + 13:0	0.22	0.22	0.009	0.88
14:0	11.01	11.19	0.195	0.44
14:1 <i>cis</i> -9	0.96	0.98	0.037	0.57
16:0	26.89	26.55	0.479	0.43
16:1 <i>trans</i> -9 + 17:0 <i>iso</i>	0.30	0.31	0.011	0.75
16:1 <i>trans</i> -12	0.17	0.17	0.006	0.91
16:1 <i>cis</i> -9 + 17:0 <i>anteiso</i>	1.60	1.58	0.052	0.69
18:0	10.44	10.15	0.311	0.34
18:1 <i>trans</i> -4	0.03	0.02	0.001	0.39
18:1 <i>trans</i> -5	0.02	0.01	0.001	0.75
18:1 <i>trans</i> -6 to 8	0.28	0.26	0.015	0.55
18:1 <i>trans</i> -9	0.25	0.24	0.010	0.46
18:1 <i>trans</i> -10	0.35	0.44	0.048	0.29
18:1 <i>trans</i> -11	0.78	0.76	0.041	0.60
18:1 <i>trans</i> -10/18:1 <i>trans</i> 11	0.45	0.58	0.065	0.17
18:1 <i>trans</i> -12	0.39	0.38	0.018	0.44
18:1 <i>trans</i> -13 and 14	0.80	0.78	0.073	0.82
18:1 <i>cis</i> -9	20.01	20.04	0.453	0.95
18:1 <i>cis</i> -11	0.76	0.81	0.050	0.49
18:1 <i>cis</i> -12	0.46	0.44	0.019	0.63
18:1 <i>trans</i> -16	0.31	0.30	0.016	0.87
18:1 <i>cis</i> -15 + 19:0	0.06	0.06	0.002	0.98
18:2 <i>trans</i> -9, <i>trans</i> -12	0.01	0.01	0.001	0.77
18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -12	0.04	0.03	0.002	0.74
18:2 <i>cis</i> -12, <i>trans</i> -9	0.03	0.02	0.001	0.43
18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	0.46	0.46	0.027	0.92
18:2 <i>trans</i> -9, <i>cis</i> -11	0.01	0.02	0.001	0.29
18:2 <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	0.06	0.08	0.001	0.29
18:2 n-6	4.76	4.98	0.153	0.30
18:3 n-6	0.04	0.04	0.002	0.67
18:3 n-3	0.74	0.78	0.023	0.30
20:0	0.13	0.12	0.003	0.42
20:1 <i>cis</i> -11	0.05	0.05	0.002	0.75
20:2 n-6	0.05	0.05	0.002	0.32
20:3 n-6	0.04	0.04	0.001	0.99
20:4 n-6	0.23	0.22	0.008	0.73
20:4 n-3	0.06	0.05	0.004	0.80
22:0	0.15	0.15	0.013	0.94
22:5 n-3	0.06	0.06	0.003	0.68
24:0	0.02	0.02	0.001	0.71
SCFA ¹	26.20	26.43	0.508	0.72
MCFA ²	28.96	29.08	0.586	0.86
LCFA ³	41.87	41.56	0.888	0.75

¹Short-chain fatty acids: ≤ 14 ; ²Medium-chain fatty acids: 16:0 to 16:1 *cis*-9 + 17:0 *anteiso*; ³Long-chain fatty acids: $\geq 18:0$

Table 13. Milk fatty acids secretion (g/d) on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO)

	CTL	BEO	SEM	P-value
4:0	26.53	27.93	1.987	0.62
6:0	17.23	17.79	1.344	0.72
8:0	10.71	10.94	0.888	0.86
10:0	24.35	24.97	1.976	0.83
10:1 <i>cis</i> -9	2.30	2.37	0.193	0.81
12:0	28.43	29.04	2.336	0.82
12:1 <i>cis</i> -9 + 13:0	1.73	1.80	0.111	0.69
14:0	85.21	89.26	5.454	0.61
14:1 <i>cis</i> -9	7.33	7.93	0.446	0.36
16:0	207.94	216.33	12.472	0.64
16:1 <i>trans</i> -9 + 17:0 <i>iso</i>	2.27	2.45	0.096	0.20
16:1 <i>trans</i> -12	1.26	1.34	0.075	0.47
16:1 <i>cis</i> -9 + 17:0 <i>anteiso</i>	12.30	12.70	0.678	0.68
18:0	79.70	81.18	5.436	0.85
18:1 <i>trans</i> -4	0.22	0.22	0.013	0.98
18:1 <i>trans</i> -5	0.11	0.12	0.005	0.39
18:1 <i>trans</i> -6 to 8	2.02	2.07	0.092	0.71
18:1 <i>trans</i> -9	1.86	1.91	0.075	0.66
18:1 <i>trans</i> -10	2.63	3.45	0.364	0.13
18:1 <i>trans</i> -11	5.93	6.13	0.499	0.78
18:1 <i>trans</i> -10/18:1 <i>trans</i> 11	0.48	0.51	0.036	0.62
18:1 <i>trans</i> -12	2.92	2.97	0.146	0.83
18:1 <i>trans</i> -13 and 14	5.85	6.01	0.393	0.78
18:1 <i>cis</i> -9	152.52	158.75	8.130	0.59
18:1 <i>cis</i> -11	5.61	6.42	0.362	0.14
18:1 <i>cis</i> -12	190.62	216.33	17.988	0.33
18:1 <i>trans</i> -16	2.27	2.38	0.013	0.49
18:1 <i>cis</i> -15 + 19:0	0.49	0.52	0.020	0.42
18:2 <i>trans</i> -9, <i>trans</i> -12	0.11	0.10	0.010	0.61
18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -12	0.29	0.30	0.012	0.80
18:2 <i>cis</i> -12, <i>trans</i> -9	0.21	0.21	0.018	0.95
18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	3.48	3.68	0.262	0.59
18:2 <i>trans</i> -9, <i>cis</i> -11	0.10	0.12	0.008	0.12
18:2 <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	0.04	0.06	0.004	0.03
18:2 n-6	36.00	39.19	1.768	0.22
18:3 n-6	0.34	0.33	0.034	0.81
18:3 n-3	5.62	6.11	0.267	0.21
20:0	1.00	0.99	0.007	0.93
20:1 <i>cis</i> -11	0.39	0.42	0.023	0.50
20:2 n-6	0.33	0.37	0.019	0.22
20:3 n-6	0.35	0.35	0.028	0.99
20:4 n-6	1.75	1.81	0.132	0.79
20:4 n-3	0.23	0.24	0.017	0.77
22:0	1.20	1.23	0.130	0.88
22:5 n-3	0.67	0.68	0.028	0.91
24:0	0.15	0.15	0.012	0.96
SCFA ¹	201.79	212.06	13.273	0.59
MCFA ²	223.66	232.84	13.769	0.62
LCFA ³	505.27	545.30	27.771	0.32

¹Short-chain fatty acids: ≤ 14 ; ²Medium-chain fatty acids: 16:0 to 16:1 *cis*-9 + 17:0 *anteiso*; ³Long-chain fatty acids: $\geq 18:0$

Table 14. Milk odd-and branched-chain fatty acids (OBCFA) as a proportion of milk fatty acids and as daily secretion on treatments Control (CTL) or Blend of Essential Oils (BEO)

	CTL	BEO	SEM	P-value
	% of total fatty acids			
5:0	0.026	0.025	0.0024	0.90
7:0	0.026	0.025	0.0027	0.76
9:0	0.033	0.035	0.0020	0.65
11:0	0.060	0.061	0.0038	0.80
14:0 <i>iso</i>	0.110	0.092	0.0104	0.27
15:0 <i>iso</i>	0.215	0.216	0.0065	0.94
15:0 <i>anteiso</i>	0.479	0.474	0.0121	0.78
15:0	1.043	1.059	0.0368	0.77
16:0 <i>iso</i>	0.249	0.222	0.0190	0.34
17:0	0.456	0.462	0.0163	0.80
17:1 <i>cis</i> -9	0.156	0.160	0.0093	0.71
18:0 <i>iso</i>	0.030	0.035	0.0015	0.04
21:0	0.019	0.020	0.0009	0.57
23:0	0.022	0.023	0.0019	0.59
Total OBCFA	2.92	2.91	0.057	0.90
	% of total OBCFA			
5:0	0.91	0.87	0.053	0.53
7:0	0.88	0.93	0.075	0.75
9:0	1.17	1.22	0.057	0.61
11:0	2.08	2.12	0.126	0.87
14:0 <i>iso</i>	3.82	3.20	0.360	0.23
15:0 <i>iso</i>	7.40	7.45	0.310	0.97
15:0 <i>anteiso</i>	16.55	16.32	0.493	0.74
15:0	35.36	36.26	0.836	0.46
16:0 <i>iso</i>	8.70	7.59	0.718	0.29
17:0	15.40	15.82	0.428	0.51
17:1 <i>cis</i> -9	5.26	5.46	0.237	0.56
18:0 <i>iso</i>	1.04	1.28	0.053	< 0.01
21:0	0.67	0.65	0.022	0.57
23:0	0.76	0.83	0.064	0.48
	g/d			
5:0	0.19	0.21	0.011	0.20
7:0	0.20	0.21	0.018	0.59
9:0	0.26	0.28	0.012	0.28
11:0	0.48	0.49	0.043	0.84
14:0 <i>iso</i>	0.90	0.74	0.110	0.32
15:0 <i>iso</i>	1.68	1.72	0.128	0.84
15:0 <i>anteiso</i>	3.71	3.80	0.257	0.81
15:0	7.46	8.40	0.413	0.46
16:0 <i>iso</i>	1.97	1.76	0.217	0.50
17:0	3.42	3.68	0.132	0.19
17:1 <i>cis</i> -9	1.17	1.27	0.059	0.25
18:0 <i>iso</i>	0.24	0.30	0.022	0.07
21:0	0.14	0.15	0.009	0.72
23:0	0.17	0.19	0.018	0.50
Total OBCFA	22.51	23.21	1.206	0.68

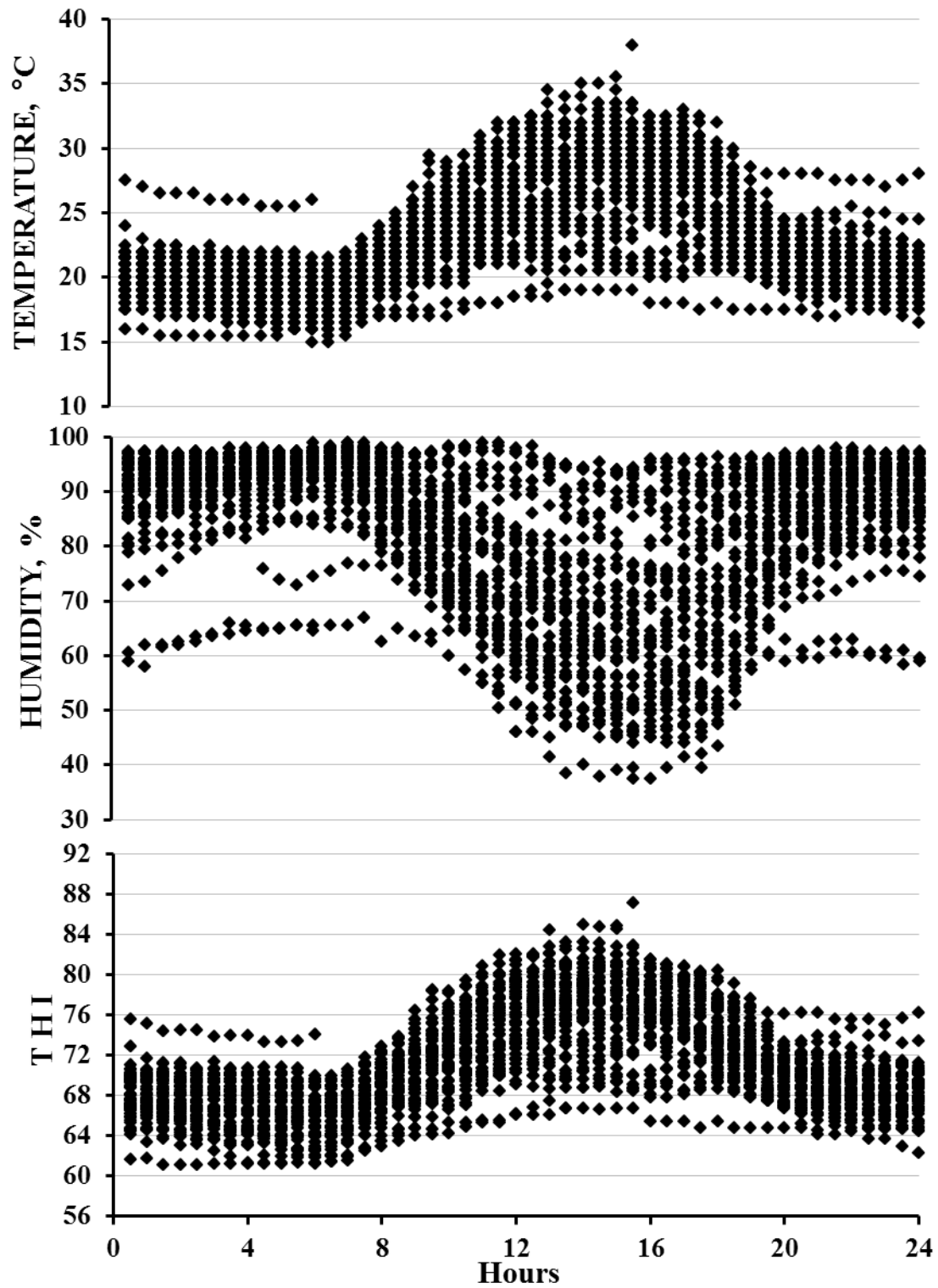


Figure 1. Temperature-Humidity Index (THI) inside the tie stall during the experiment. 2688 recordings at 30-min intervals. THI: 70.8 ± 4.68 (mean \pm SD). Proportion > THI 68: 68.6 % of time. Temperature: 22.7 ± 4.2 °C. Humidity: 82.0 ± 14.4 %.

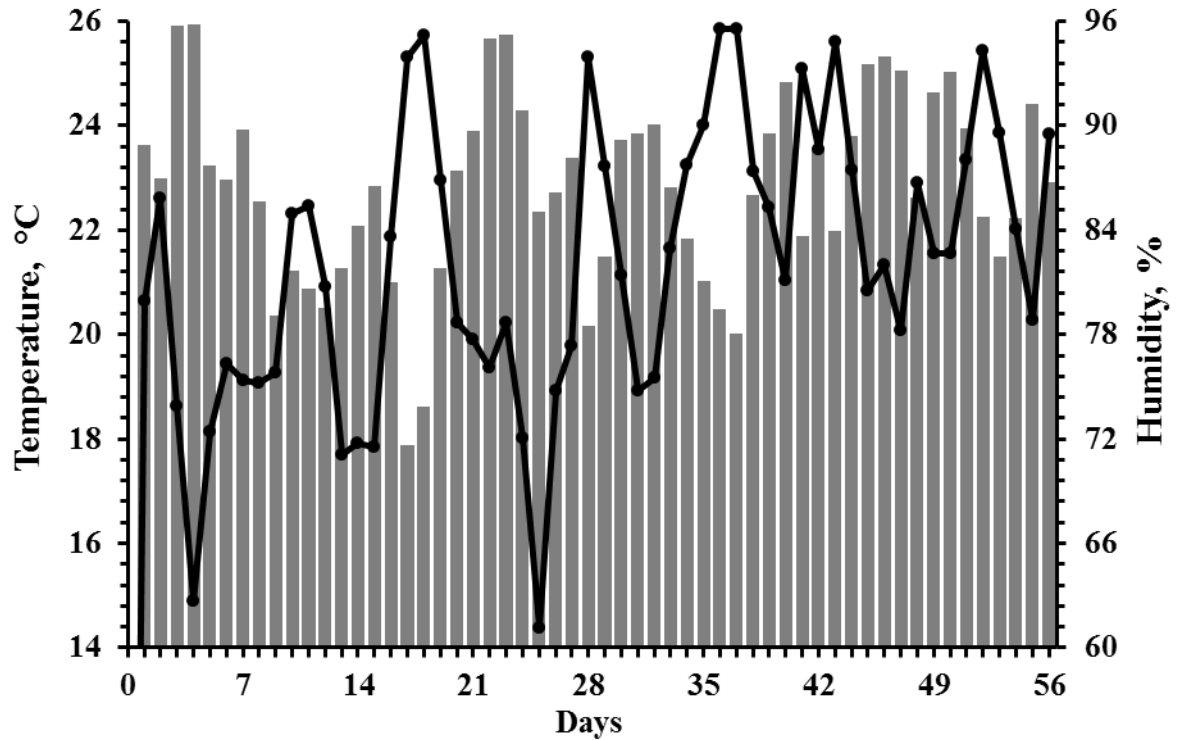


Figure 2. Mean daily temperature (line) and humidity (column) during the 56-d experimental period.

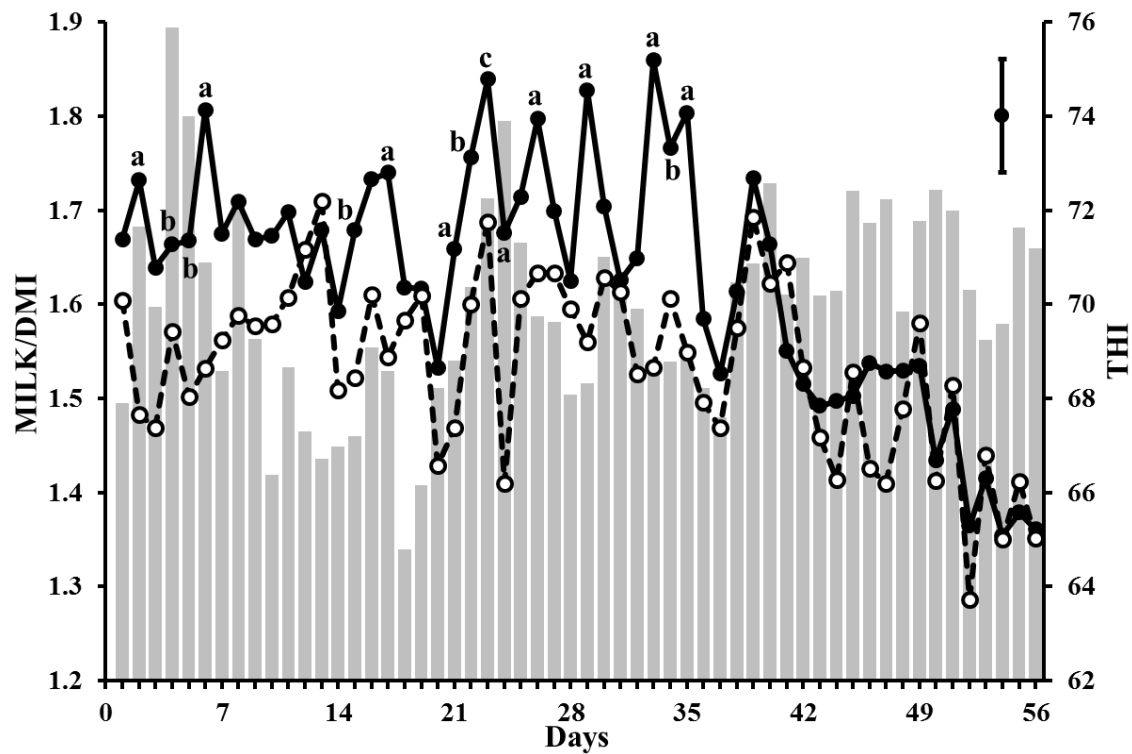


Figure 3. Feed efficiency (Milk/DMI) on treatments Control (---○---) or Blend of Essential Oils (—●—) and the mean daily Temperature-Humidity Index (THI) (■) during the experiment. $P < 0.01$ for treatment, $P < 0.01$ for day, and $P = 0.46$ for the interaction between treatment and day. Slice option of SAS: ^a $P \leq 0.05$, ^b $P \leq 0.10$, and ^c $P \leq 0.15$.

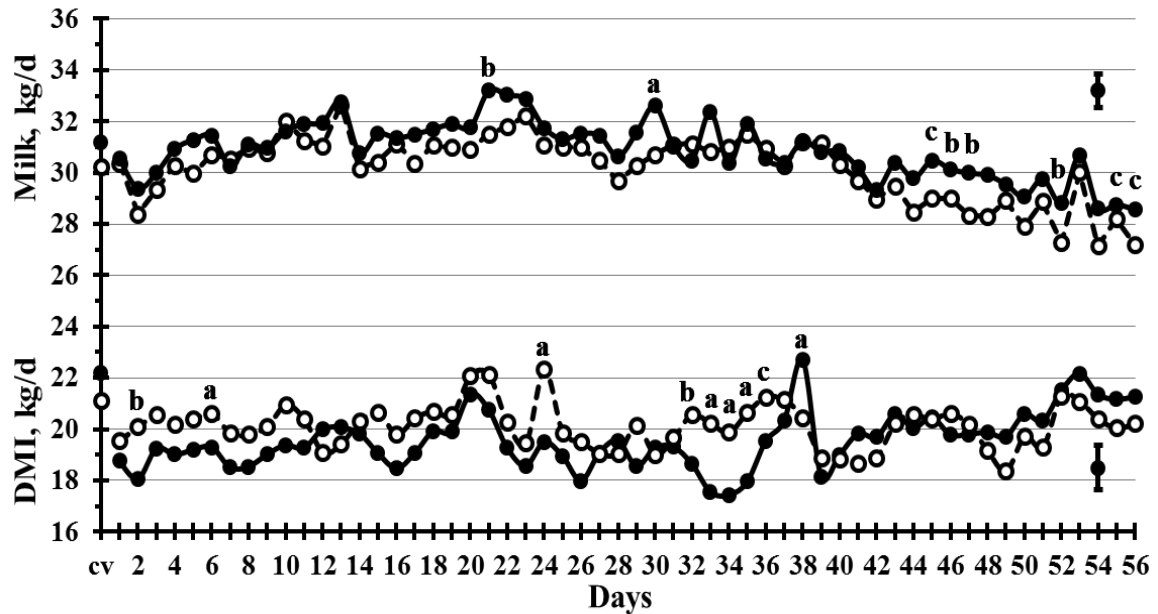


Figure 4. Dry matter intake (DMI) and milk yield (Milk) on treatments Control (---○---) or Blend of Essential Oils (—●—). DMI: $P = 0.05$ for treatment, $P < 0.01$ for day, and $P = 0.70$ for the interaction between treatment and day. Milk: $P = 0.04$ for treatment, $P < 0.01$ for day, and $P = 0.61$ for the interaction between treatment and day. cv = covariate (DMI $P = 0.40$ and Milk $P = 0.22$). Slice option of SAS: ^a $P \leq 0.05$, ^b $P \leq 0.10$, and ^c $P \leq 0.15$.

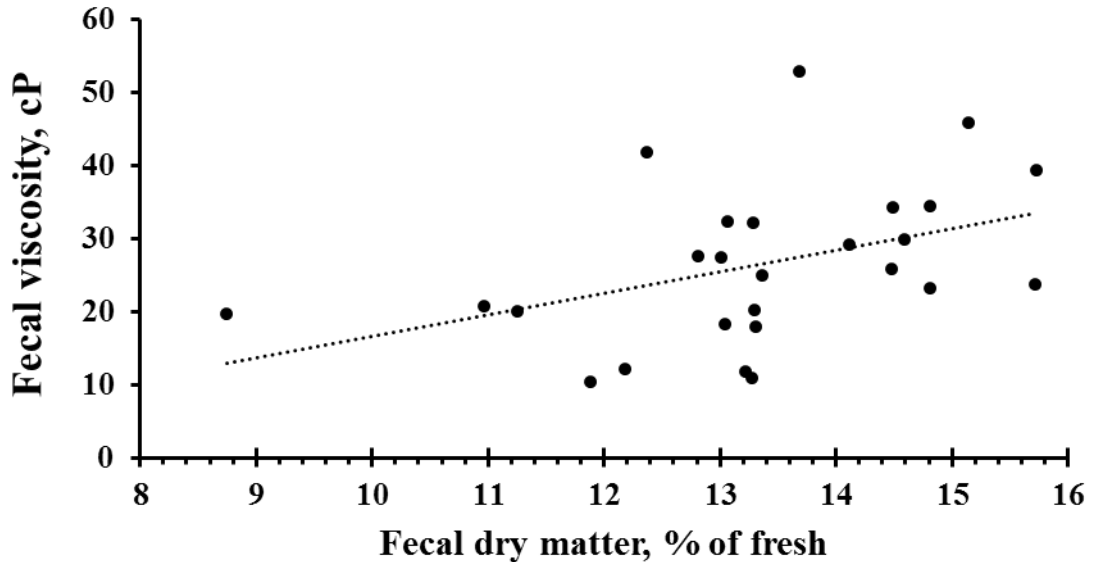


Figure 5. Relationship between fecal viscosity (cP) and DM concentration (% of fresh). Fecal viscosity = $-12.722 + 2.9395$ Fecal DM, $r^2 = 0.43$, $P = 0.03$.

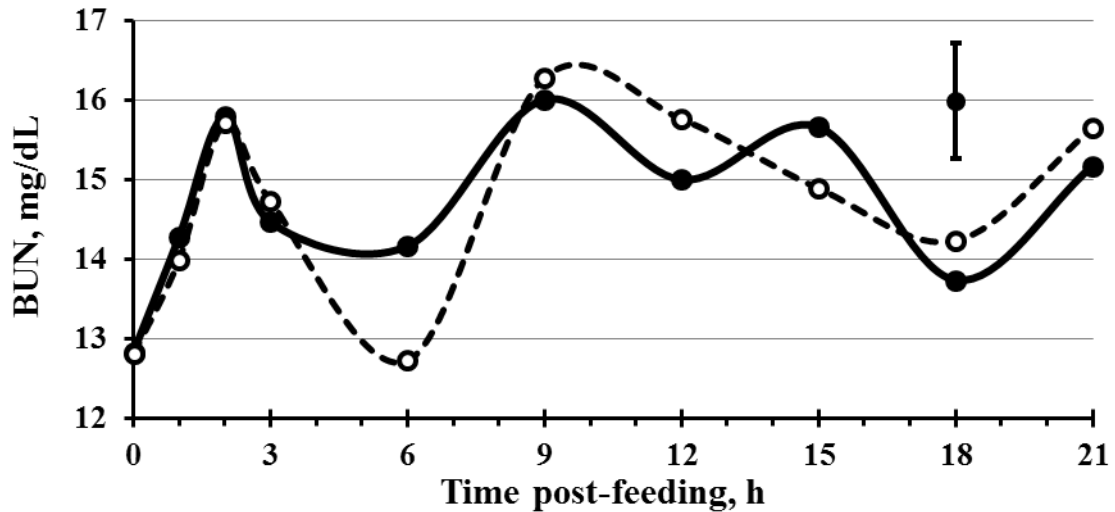


Figure 6. Blood urea nitrogen (BUN) over time on treatments Control (---○---) or Blend of Essential Oils (—●—). $P = 0.96$ for treatment, $P < 0.01$ for hour, and $P = 0.16$ for the interaction between treatment and hour.

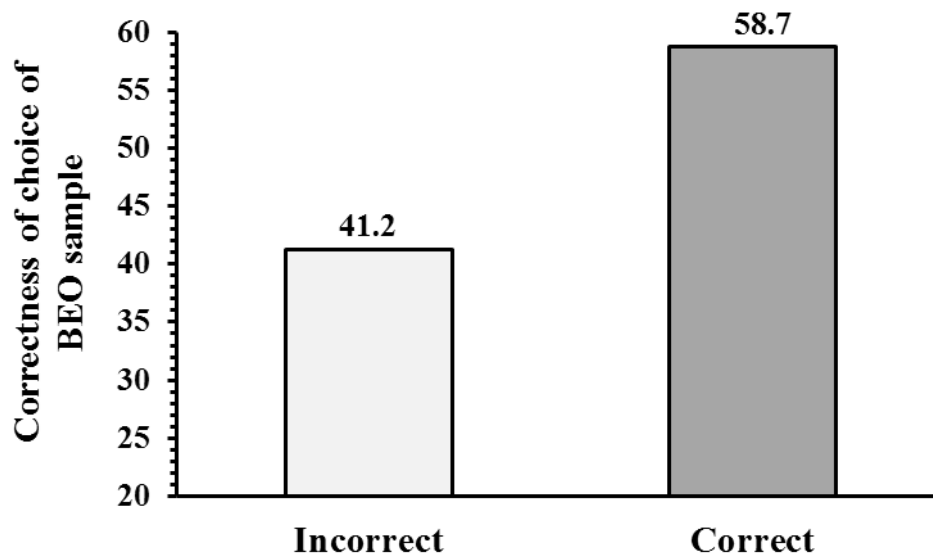


Figure 7. Proportion of assessors who correctly identified a milk sample from cows fed a blend of essential oils (BEO) and the incorrect identifications. Two samples of control and 1 sample of BEO were presented to 63 assessors. Parameter estimate generated with the GENMOD procedure of SAS using logistic regression for binomial data. Control is zero. $P = 0.05$. Standard error = 0.36. Profile likelihood 95 % confidence interval = 0.001 - 1.424.

**ARTIGO 2 - SUPPLEMENTATION OF LACTATING COWS WITH A BLEND OF
ESSENCIAL OILS OR MONENSIN**

**ARTIGO FORMATADO DE ACORDO COM A NORMA PARA SUBMISSÃO DO
JOURNAL OF DAIRY SCIENCE.**

ABSTRACT

This experiment evaluated the effect of a microencapsulated blend of carvacrol, cinnamaldehyde, eugenol, and capsaicin, (BEO. 200 mg/kg of TMR DM) relative to monensin (MON. 15 mg/kg of TMR DM) or control (CTL) on lactation performance, chewing and feed sorting behavior, ruminal fermentation profile, diet digestibility, body homeothermy, and systemic variables of lactating dairy cows. Thirty individually fed Holsteins (189 ± 83 DIM) received a standard diet for 14 d and a treatment for 56 d, in a covariate adjusted randomized block design with repeated measures over time. Pre-planned contrasts were: C1) CTL *vs.* BEO and C2) BEO *vs.* MON. The BEO increased milk protein secretion compared to MON (+ 51 g/d) and tended to increased relative to CTL (+ 38 g/d). The BEO also tended to increase the yields of milk (+ 1.4 kg/d; C1) and fat (+ 60 g/d; C2). Cows on BEO had greater covariate adjusted body weight and daily gain. Dry matter intake (DMI) (21.0 kg/d), milk/DMI (1.59), and diet digestibility were unchanged. The daily urinary allantoin excretion was reduced by MON (C2). The BEO increased the proportion in ruminal volatile fatty acids of acetate, and reduced butyrate and methyl-butyrate, and MON tended to increase propionate (C2). Cows on MON had lower proportion of the daily intake at night and selected in favor of small feed particles in the afternoon (C2), and BEO induced more refusal of long feed particles in the morning (C1). Rumination/DMI tended to be reduced by BEO. Treatments had no effect on the concentrations of plasma D-lactate, β -hydroxybutyrate, aspartate and gamma-glutamyl transferases, and glucose. Plasma urea-N 4 h post feeding was higher for BEO (C1). The BEO increased the content of oxygen in jugular blood and caudal artery area (C1). The proportion of cows with rectal temperature ≥ 39.2 °C at 1600 and 2200 h were reduced by BEO. The skin surface temperature at 0800 h was higher on BEO than CTL and tended to be higher than MON. Respiration rate did not differ among treatments. The BEO increased the sweating rate and the calculated evaporative heat loss. The BEO had no

effect on diet digestibility and feed efficiency, but increased acetate in rumen fluid, weight gain, and lactation performance. The BEO also enhanced heat dissipation, showing to have systemic action.

Key words: capsaicin, sweating rate, thermoregulation, ingestion behavior

INTRODUCTION

Monensin (MON) has been extensively used to manipulate ruminal fermentation with the main goals of reducing methane emission and ruminal lactic acidosis and increasing feed efficiency of ruminants (Ellis et al., 2012). Thoroughly meta-analysis on MON efficacy for lactating dairy cows are available (Ipharraguerre and Clark, 2003, Duffield et al., 2008). However, consumers and health authorities have raised concerns about the use of antibiotics such as MON in animal production due to the risk of residues in products and the development of multidrug resistant bacteria. Essential oils (EO) are an extensive group of plant produced organic compounds derived from secondary metabolism and have shown to have antimicrobial action against bacteria, protozoa, and fungi (Calsamiglia et al., 2007; Klevenhusen et al., 2012). Beyond the traditional use as rumen modulators, the EO can also have systemic action (Oh et al., 2017a), affecting hormone regulation (Oh et al., 2017b), oxidative stress (Hashemzadeh-Cigari et al., 2015), immune response (Oh et al., 2017c). Capsaicin can act on peripheral vasodilation and evaporative heat loss (Starr et al., 2008), potentially favorable to lactating dairy cows in warm climates. The use of EO as feed additive is in agreement with the natural trend of the consumer of dairy products.

The antimicrobial activity of EO and ionophores have been attributed to their interaction with the cytoplasmic membrane and action as a transmembrane carrier of monovalent cations on bacterial cell walls (Ultee et al., 1999; Russell, 2002). However, other modes of action have been described for EO, such as the inhibition of glucose uptake (Gill and Holley, 2004), the change in the lipid profile of cell membranes (Di Pasqua et al., 2006),

and the impairment of enzymatic activity (Shabala et al., 2002). The EO are a wide group of phytochemicals and additive and synergic effects can occur among products, increasing their efficacy compared to compounds in single form (Michiels et al., 2007). The variation in chemicals, blends, and dosages preclude generalizations for the mode of action and direct comparisons among EO effects on lactating dairy cows.

A microencapsulated blend of carvacrol from oregano, cinnamaldehyde from cinnamon, eugenol from cloves, and capsaicin from peppers increased feed efficiency by reducing DMI and increasing milk yield of lactating cows (Silva et al., 2017). The gain in feed efficiency was associated to lower acetate to propionate ratio in ruminal fluid, altered ingestion behavior, lower body temperature, and increased blood oxygenation. Animal responses to EO are inconsistent, since they may be influenced by the composition of the basal diet, chemical, dosage, and animal physiological stage (Khiaosa-Ard and Zebeli, 2013; Wall et al., 2014).

This experiment evaluated the effect of a blend of EO (BEO) relative to MON or control (CTL) on lactation performance, ingestion and feed sorting behavior, ruminal fermentation profile, diet digestibility, body homeothermy, blood acid-base balance, and systemic variables of lactating dairy cows.

MATERIALS AND METHODS

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the University of Lavras.

Cows and Treatments

The experiment was conducted from March 30th to May 26th, 2015, during the transition from the hot-rainy season to the cold-dry season of Southeast Brazil. Cows were housed in an open-walled, sand-bedded tie-stall barn with fans and high pressure sprinklers at

the Better Nature Research Center (<http://www.holandesflamma.com.br/>). The research center is located at 846 m height, 21° 09' 52.41" latitude south, and 44° 55' 52.40" longitude west. Environmental temperature and humidity at the center of the barn were measured at 30-min intervals (EasyLog-USB-2-LCD. Lascar Electronics, Salisbury, United Kingdom) at 2.5 m from the floor. The Temperature-Humidity Index (THI) was calculated according to Yousef (1985): $THI = T + 0.36 \times DP + 41.2$, where T = temperature (°C) and DP = dew point (°C). The environment during the experimental period is reported in Figure 1.

Thirty Holstein cows (189.4 ± 83 DIM at the beginning of the experiment, 9 primiparous) were individually fed the same TMR for a 14-d standardization period. On d 9 to 14 of this period, DMI, milk yield, milk solids, BW, and BCS were measured and used as covariate in the statistical model. Ten blocks of 3 cows were then formed primarily by parity (1 vs. ≥ 2) and secondarily by milk yield, and a treatment was assigned within blocks to each cow for 58 d: Control (CTL. No feed additive); BEO (200 mg/kg of TMR DM. A microencapsulated blend of pure forms of carvacrol, cinnamaldehyde, and eugenol and pepper extract containing capsaicin. Activo Premium, Grasp, Curitiba, Brazil) or MON (15 mg/kg of TMR DM. Elanco Animal Health, Greenfield, IN).

The feed additives were included in the vitamin and mineral premix and were added to the TMR mixed in a stationary feed mixer (Unimix 1200. Casale, São Carlos, Brazil). Feed was mixed and offered at 0700 and 1300 h in amounts to allow for 7 to 10 % of offered as daily refusal per cow. Feed was pushed up at least 10 x/d to stimulate intake. Cows were milked 3 x/d starting at 0500, 1300, and 2000 h in an adjacent herringbone parlor.

Sample Collection and Analyses

Feed intake was calculated individually as the difference between feed offered and orts recorded daily. The composition of the consumed TMR in nutrients and of the offered TMR in ingredients are reported in Table 1. The composition of the offered TMR in ingredients was

calculated based on the offered as fed amounts of each feed multiplied by its DM concentration. The composition of the consumed diet in nutrients was the nutrient intake of all cows on a treatment (offered – orts) divided by the total DMI. The DM concentration of the corn silage was monitored weekly with a Koster Moisture Tester (Koster Crop Tester Inc., Brunswick, OH) and the TMR was adjusted accordingly. Samples of feeds and orts per cow were obtained daily and frozen for the formation of weekly composites based on equal as-fed amounts of daily samples. Composite samples were dried in forced-air oven at 55 °C for 72 h and ground to pass a 1-mm mesh screen (Wiley mill, Thomas Scientific, Swedesboro, NJ). The DM concentration was determined by drying at 100 °C for 24 h. The CP concentration was determined with a micro Kjeldahl apparatus (AOAC International, 2012), ash by incineration at 550 °C for 8 h, the ash-free NDF by filtration in porous crucibles with heat stable alpha-amylase and sodium sulfite (Van Soest et al., 1991), and the ether extract (EE) as in AOAC International (2012). The NFC fraction was calculated: $100 - (\text{CP} + \text{EE} + \text{ash} + \text{NDF})$. Starch was analyzed enzymatically according to Hall (2009). The particle size distribution of the fresh TMR was measured on weekly composites of daily samples with the Penn State Particle Separator using the 8 mm and 18 mm diameters screens and pan (Lammers et al., 1996).

Milk yield was recorded daily. Milk samples were collected in proportion to the amount produced on each of 3 consecutive milkings on d 6 and 7 of each experimental week. Samples were stored in flasks containing 2-bromo-2-nitropropane-1-3-diol under refrigeration for at most 2 d until shipping to a commercial laboratory. Milk solids concentration, SCC, and MUN were measured by mid-infrared analysis (Bentley Instruments Inc., Chaska, MN) at the Laboratory of the Paraná State Holstein Breeders Association (APCBRH, Curitiba, Brazil). Milk energy secretion (Milk E; Mcal/d) was (NRC, 2001): $[(0.0929 \times \% \text{ fat}) + (0.0547 \times \% \text{ protein}) + (0.0395 \times \% \text{ lactose})] \times \text{kg of milk}$. The secretion of ECM (kg/d) was: $\text{Milk E}/0.70$

(assumes 0.70 Mcal/kg of milk with 3.7 % fat, 3.2 % protein, and 4.6 % lactose). The 4% FCM (kg/d) was calculated with the Gaines equation (NRC, 2001): $0.4 \times \text{kg of milk} + 15 \times \text{kg of fat}$.

The BW and BCS were measured at 14-d intervals. The BW was measured after the morning milking in two consecutive days of the week. The daily BW gain was calculated as the slope of the linear regression of BW over days 0 to 58. The BCS (1 to 5, Wildman et al., 1982) was the mean of 3 independent evaluators.

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

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

Chewing activity and ingestion behavior were evaluated on d 24 and 52 by visual observation of the buccal activities of each cow at 5-min intervals continuously for 24 h. Buccal activities evaluated were: feed ingestion, water ingestion, rumination, and idleness.

Ingestion and rumination per unit of DMI were calculated using the intake of the day in which chewing activity was evaluated. A meal was empirically defined by at least two consecutive 5-min ingestion events following at least 10 min of idleness or rumination. To generate the meal pattern data, the minimum 10-min inter-meal interval was adopted based on the reasoning of Mullins et al. (2012) for a 12-min interval. Meal duration was the ratio between ingestion time (min/d) and meals/d. The duration of the first daily meal (conditioned meal) was measured with a chronometer during d 24 to 26 and 51 to 53. Five evaluators observed the behavior of all cows after offering feed at 0700 h until the last cow finished its first meal.

On d 26, 27, 50, and 51, the proportion of daily intake in the morning (0700 to 1300 h), afternoon (1300 to 1900 h), and night (1900 to 0700 h) was determined by measuring feed availability per cow at 0700, 1300, and 1900 h and orts at 1300, 1900, and 0700 h. Feed particle sorting behavior was evaluated according to Leonardi and Armentano (2003) on d 27 and 51. The proportion of particles above the 19 mm mesh diameter screen and above and below the 8 mm mesh screen of the Penn State Particle Separator (Lammers et al., 1996) was evaluated at 0700 and 1300 h for the offered TMR and at 1300, 1900, and 0700 h for refusals. Feed refusals at 1300 h were mixed with feed offered at 1300 h for measurement of the offered TMR particle size of each cow. The predicted intake (as-fed basis) of particles on each screen was: % TMR retained on screen x kg of TMR consumed. The observed intake of particles was: % TMR retained on screen x kg of TMR offered - % orts retained on screen x kg of orts. Sorting values below 100 % represent selective refusal, above 100 % represent preferential intake, and equal to 100 % represent no selection.

Rectal and skin surface temperature and respiration rate were obtained on d 4 and 7 of each experimental week. Digital thermometers were used to record the rectal temperature (Omron. MC-245. Dongbei. Dalian, China) at 0800 h (0825 h \pm 11 min), 1600 h (1633 h \pm 16 min), and 2200 h (2216 h \pm 15 min). The skin surface temperature was recorded at 0800 h

(0803 h \pm 5 min), 1600 h (1603 h \pm 5 min), and 2200 h (2201 h \pm 10 min) in the shaved shoulder blade (scapular region) with an infrared thermometer (88E. HighMed. São Paulo, Brazil). The skin was shaved 1 d before the measurements. The respiration rate was measured by visual counting of flank movements at 0800 h (0817 h \pm 10 min), 1600 h (1611 h \pm 14 min), and 2200 h (2209 h \pm 10 min). Three 15-sec counts of breath movements were executed and the mean was extrapolated to 1 min.

The sweating rate was evaluated weekly at 1700 h (1715 h \pm 44 min). The colorimetric technique used paper discs impregnated with cobalt chloride (Schleger and Turner, 1965). Filter paper (Whatman 1, 11 μ m porosity) was immersed in a 10 % cobalt chloride solution and then oven dried at 100 °C for 12 h. Paper discs (0.5 cm diameter) were cut and dried for 2 min. Three discs were placed on histological slides and fixed with transparent adhesive tape. The slides with disks were immediately placed in a sealed glass containing silica. A 3 x 10 cm rectangular area was shaved 1 d before the measurements on the left flank (Paralumber fossa) of the cows, 20 cm below the dorsal loin. The tape with discs was fixed over the shaved area. The time for each disc to change color from blue violet to light pink was recorded with a chronometer and the mean value was used to calculate the sweating rate ($\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$): $38,446.6/T$, where T is time in seconds. The surface area, total stored heat, and evaporative heat loss were calculated on d 14, 28, 42, and 56. The surface area (m^2) was (McLean, 1963): $0.15 (\text{m}^2/\text{kg}) \times \text{kg BW}^{0.56}$. Body temperature (°C) was (Zimbelman et al., 2010): $0.33 \times \text{surface temperature (}^\circ\text{C)} + 0.67 \times \text{rectal temperature (}^\circ\text{C)}$. The total stored heat (kcal) was (Sawka and Castellani, 2007): $\text{Body temperature (}^\circ\text{C)} \times \text{specific heat of tissue (}0.80 \text{ kcal/kg/}^\circ\text{C)} \times \text{BW (kg)}$. The evaporative heat loss (kcal/h) was (Silanikove, 2000): $\text{Sweating rate (g/m}^2/\text{h)} \times \text{surface area (m}^2) \times 0.58 \text{ kcal/g of sweat}$.

Vascular changes and blood flow of the caudal artery were evaluated on d 26 and 58 from 1600 to 1830 h. Images were registered by doppler-image ultrasonography at the fourth

coccygeal vertebra (Aiken et al., 2007) by using an ultrasound (Medsonic, Nicosia, Cyprus) with a multi-frequency linear array transducer (5-9 MHz). Three cross-sectional doppler flow scans were taken to determine the artery area and diameter, whereas the flow velocity and pulsatility index were measured over three cardiac cycles per cow.

On d 14, 25, 39, and 53, plasma samples from the coccygeal vessels were obtained at 0, 4, and 12 h post feeding for the determination of glucose and BUN concentration. Blood was obtained in vacutainer tubes with potassium fluoride for glucose analysis (Glicose Enzimática Líquida. Doles Reagentes para Laboratórios Ltda, Goiânia, Brazil) and with EDTA for BUN (Urea enzimática. Bioclin K047. Belo Horizonte, Brazil). On d 25 and 53, at 12 h post feeding, blood samples were also collected for analysis of BHBA, D-lactate, aspartate aminotransferase, and gamma glutamyl transferase. Samples for the enzymes were collected in heparinized tubes and analyzed by a kinetic UV *International Federation of Clinical Chemistry* method in a commercial laboratory (Laboratório Santa Cecília, Lavras, Brazil). The BHBA in serum was measured with handheld meters (FreeStyle Optium β -Ketone, Witney, UK) as validated by Pineda and Cardoso (2015). The analysis of D-lactate (D-Lactate Colorimetric Assay Kit, MAK058, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was performed in the same plasma samples used for glucose analysis. Plasma was obtained by centrifugation at 1,800 x g for 10 min before storage at -20 °C.

Jugular blood acid-base balance was analyzed on d 24 and 52 at 1530 h. Samples were obtained in heparinized tubes and analyzed with an AGS 22 blood gas analyzer (Drake Eletrônica e Comércio Ltda, São José do Rio Preto, Brazil) less than 1 h after sampling. All samples were collected within a 30 min interval, at random within block, and were kept under refrigeration from sampling to analysis.

Ruminal fluid samples were collect on d 57 with a flexible oro-gastric tube connected to a vacuum pump. Samples were obtained 11.3 h \pm 0.64 min after feeding. A sample was

frozen in liquid nitrogen to suppress fermentation and stored at -20 °C until preparation for analysis of VFA. The VFA were analyzed by GLC (7890A, Agilent Technologies, Wilmington, DE) equipped with capillary fused silica column (19091F-112; 25 m, 0.320 mm, 0.50 µm, J&W Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA). The total chromatographic run time was 16.5 min, divided into three heating cycles, as follows: 80 °C (1 min), 120 °C (20 °C/min for 3 min), and 205 °C (10 °C/min for 2 min). Hydrogen was used as the carrier gas at a flow rate of 1.35 mL/min and the temperature of the injector and detector was 260 °C. Nitrogen gas was used as the "make-up" gas at a rate of 40 mL/min. The split option at a ratio of 20:1 was used. The sample fatty acids identification was based on the retention time of methyl esters of fatty acid standards (Chem Service, West Chester, PA). Another sample was mixed to a 36 % formaldehyde solution for protozoa counting. The sample was stained according to Dehority (1984) and total protozoa was enumerated with an optical microscope in a Neubauer chamber (Warner, 1962).

Statistical Analysis

Lactation performance data from d 15 to d 56 was used for statistical analysis (d 0 to 14 was assumed to represent adaptation to treatments). Data from a multiparous cow on BEO was discarded due to death as the result of an abomasal ulcer. Data obtained over time were analyzed with the PROC MIXED of SAS (version 9.3, 2011; SAS Institute Inc., Cary, NC). The statistical model contained the continuous covariate effect (measurement of the same variable at the end of the standardization period), the random effect of block (1 to 10), the fixed effects of treatment (CTL, BEO or MON) and time (day or week), and the interaction between treatment and time. Cow nested within treatment was defined as random. For each variable, the best covariance structure was defined by the Schwarz's Bayesian criteria among first-order autoregressive and compound symmetry. Degrees of freedom were calculated

using the Kenward-Roger option. Similar models were used for variables measured once during the experiment and for variables without the covariate adjustment by removing the covariate, time, and its interaction with treatment from the previous model. The proportion of cows with rectal temperature ≥ 39.2 °C was analyzed with PROC GENMOD using logistic regression for binomial data. Two pre-planned contrasts were evaluated: CTL vs. BEO and BEO vs. MON. Significance was declared at $P \leq 0.05$ and trends at $P \leq 0.15$

RESULTS

Table 2 reports DMI, lactation performance, feed efficiency, and BW change during d 15 to 56 of the experimental period. The P -value for the interaction between treatment and time was greater than 0.20 for all variables evaluated. The supplementation of BEO tended to increase milk yield relative to CTL (+ 1.4 kg/d, $P = 0.11$) and ECM relative to MON (+ 1.3 kg/d, $P = 0.15$) and did not affect DMI ($P \geq 0.25$) or feed efficiency ($P \geq 0.55$). Milk protein secretion was increased by BEO relative to MON (+ 52 g/d, $P = 0.04$) and tended to be increased relative to CTL (+ 38 g/d, $P = 0.12$). Other trends were observed for gain induced by BEO relative to MON on the secretions of fat (+ 63 g/d, $P = 0.13$) and casein (+ 40 g/d, $P = 0.15$) and on milk protein concentration (+ 0.04 %, $P = 0.10$). Milk lactose concentration was increased by MON relative to BEO (+ 0.06 %, $P = 0.05$) and BEO was similar to CTL ($P = 0.85$). Relative to CTL, the BEO increased BW gain (+ 0.38 kg/d, $P < 0.01$) and the covariate adjusted BW (+ 10 kg, $P < 0.01$) and tended to increase BCS (+ 0.14, $P = 0.13$). The BEO also tended to increase BW gain relative to MON (+ 0.20 kg/d, $P = 0.09$).

Table 3 reports the total tract apparent digestibility of nutrients, DOMI during fecal and urine sampling, and the daily secretion of urinary allantoin. Treatments had no effect on diet digestibility ($P \geq 0.16$) and DOMI ($P \geq 0.44$). However, MON reduced ($P = 0.04$) the excretion of urinary allantoin relative to BEO and BEO was similar to CTL ($P = 0.64$), suggestive of reduced microbial protein yield on MON.

The ruminal fermentation profile and protozoa concentration are in Table 4. The proportion of acetate in ruminal VFA was increased by BEO relative to CTL ($P = 0.04$) and MON ($P = 0.02$) and butyrate was reduced ($P \leq 0.05$). The proportion of propionate tended to be reduced relative to CTL ($P = 0.15$) and MON ($P = 0.12$). The BEO tended to increase the acetate to propionate ratio relative to CTL ($P = 0.12$) and MON ($P = 0.07$). The proportion of methyl-butyrate tended to be reduced by BEO relative to CTL ($P = 0.13$) and was reduced ($P = 0.01$) relative to MON. The proportions of valerate and isobutyrate and the concentration of total protozoa in ruminal fluid were unaffected ($P \geq 0.36$) by treatments.

Ingestion, chewing, and particle size sorting behaviors are in Tables 5 and 6. The proportion of the daily intake at night was reduced by 6.3 %-units by MON compared to BEO ($P = 0.01$), but the proportions of the daily intake in the morning ($P = 0.69$) and afternoon ($P = 0.20$) were only numerically increased by MON. The BEO did not affect ($P \geq 0.60$) the proportion of the daily intake in periods of the day compared to CTL. Particle size sorting behavior was affected by treatments. In the morning, cows on BEO sorted more against long feed particles (> 19 mm) than CTL ($P = 0.02$) but were similar ($P = 0.47$) to MON in long particles sorting behavior. All treatments induced selection in favor of short particles (< 8 mm) in the morning (106 %, $P \geq 0.17$). In the afternoon, MON induced a greater rejection ($P = 0.04$) of medium size (8 – 19 mm) particles and in favor ($P < 0.01$) of small particles than BEO, and BEO was similar to CTL ($P \geq 0.47$). There was a trend ($P = 0.15$) for CTL to induce selection in favor of medium size particles at night compared to BEO, and cows on both BEO and MON ($P = 0.74$) showed rejection behavior for medium size particles. At night, BEO tended ($P = 0.13$) to increase sorting in favor of small feed particles compared to CTL, but was similar ($P = 0.40$) to MON. There was no treatment effect ($P \geq 0.49$) on the proportion of the offered TMR as refusals along the day.

Chewing activity and meal pattern are in Table 6. Trends ($P = 0.06$) were observed for BEO to reduce rumination duration (min/d) and rumination per DMI relative to CTL. The BEO also tended ($P = 0.06$) to reduce rumination per DMI and reduced ($P = 0.05$) chewing (ingestion + rumination) per DMI relative to MON. The BEO increased the number of meals in the afternoon compared to CTL ($P = 0.03$) and MON ($P < 0.01$), but did not affect the number of meals in the morning and afternoon ($P \geq 0.51$). There were trends ($P = 0.15$) for BEO to reduce meals per day compared to CTL and MON. In the afternoon, the duration of meals was reduced ($P < 0.01$) by BEO compared to MON. The daily duration of a meal was longer ($P = 0.01$) on MON compared to BEO and BEO was similar ($P = 0.29$) to CTL. The duration of the first daily meal also tended ($P = 0.08$) to be increased by MON relative to BEO and was similar ($P = 0.75$) for BEO and CTL.

Rectal and skin surface temperatures and respiration rate are in Table 7. The BEO tended ($P = 0.12$) to reduce the rectal temperature at 1600 h by 0.2 °C relative to CTL. The proportion of cows with rectal temperature ≥ 39 °C at 0800 h tended ($P = 0.09$) to be reduced by BEO compared to MON (Table 8). At 1600 h and 2200 h BEO reduced ($P \leq 0.05$) the proportion of cows with rectal temperature ≥ 39 °C compared to CTL and MON. The drop induced by BEO on rectal temperature apparently occurred during days of low mean THI (Figure 2). The skin surface temperature at 0800 h was increased ($P = 0.01$) by BEO relative to CTL and tended ($P = 0.07$) to be increased relative to MON (Table 7). Treatments had no effect ($P \geq 0.46$) on the respiration rate (Table 7). The BEO increased ($P = 0.05$) the sweating rate relative to CTL and MON (Table 9) and increased ($P = 0.01$) the calculated evaporative heat loss relative to CTL and tended ($P = 0.12$) to increase heat loss relative to MON. The BEO tended ($P = 0.08$) to increase the caudal artery diameter and increased ($P = 0.04$) artery area (Table 10) relative to CTL, but was similar to MON ($P \geq 0.89$). Blood flow velocity and

the pulsatility index were not affected by treatments ($P \geq 0.28$). The supplementation of BEO increased ($P \leq 0.03$) jugular blood oxygenation relative to CTL and MON (Table 11).

Blood metabolites are reported in Table 12. The BEO tended to increase BUN immediately before feeding ($P = 0.12$) and 12 h post-feeding ($P = 0.15$) and increased ($P = 0.05$) BUN 4 h post-feeding relative to CTL, but BUN of BEO cows was similar ($P \geq 0.33$) to MON. The concentrations of glucose, BHBA, D-lactate, and aspartate aminotransferase and gamma glutamyl transferases were not affected by treatments ($P \geq 0.30$). There was no evidence for a treatment effect on liver function or ruminal lactate absorption.

DISCUSSION

In this experiment, the trends for increased milk yield on BEO relative to CTL and ECM relative to MON were not associated to reduced DMI and increased feed efficiency, as previously observed by Silva et al. (2017) when the same BEO product was supplemented to cows with similar stage of lactation and milk yield. A different pattern of response to BEO was also observed for BW change. In this experiment, BEO increased BW gain, while it did not affect BW gain in the experiment of Silva et al. (2017). Milk protein secretion was also increased by BEO only in this experiment. The disparity in the intake and performance outcomes suggest that the effect of BEO interacted with other factors. Dosage is a reasonable explanation for the disparity in animal response to BEO among experiments (Calsamiglia et al., 2007, Khiaosa-ard and Zebeli, 2013). The dosage of BEO was 200 mg/kg of TMR DM in this experiment and 150 mg/kg of TMR DM in Silva et al. (2017). Diet composition and environment may also be involved in the inconsistent animal response to BEO supplementation (Calsamiglia et al., 2007). The diet of the experiment of Silva et al. (2017) had some starch coming from rehydrated and ensiled corn grain, probably more rapidly

fermentable in the rumen than the diet based on finely ground mature corn fed in this experiment. The experiment of Silva et al. (2017) was conducted during the transition from the dry-cold season to the rainy-hot season of Southeast Brazil, while this experiment was performed during the transition from the rainy to the dry season. The proportion of time with THI > 68 was 68.6 % in Silva et al. (2017) and 47.9 % in this experiment. The proportion of cows with rectal temperature > 39.2 °C at night was 14 %-units higher in Silva et al. (2017) than in this experiment. Understanding what factors determine the animal response to BEO is necessary for better defining usage recommendations. Future studies may be needed to further evaluate different BEO dosages and EO combinations at varying environmental and dietary scenarios.

The higher milk protein secretion in BEO than MON is in agreement with the higher ruminal microbial synthesis evaluated by the urinary allantoin excretion in BEO compared to MON. Tekippe et al. (2013) reported an increase in urinary allantoin excretion and milk protein yield in dairy cows fed 525 mg/d of a blend of cinnamaldehyde and eugenol. Khiaosa-ard and Zebeli (2013) detected a quadratic milk protein yield response to increasing dosages of EO. Cinnamon oil modified ruminal N metabolism by inhibiting peptidolysis *in vitro* (Cardozo et al., 2004). Cardozo et al. (2006) observed that capsicum oil reduced the ruminal concentration of large peptides and increased small peptides and AA in beef cattle. The reduction induced by BEO in the proportion of methyl-butyrate in ruminal VFA suggests that dietary AA deamination may have been reduced by BEO, in agreement with *in vitro* data (Lin et al., 2012). However, based on the lower BUN on CTL than BEO, there was no evidence that BEO and MON reduced ruminal AA deamination. Tekippe et al. (2011) observed that cows supplemented with 500 g/d of oregano leaves had increased BUN and ruminal ammonia-N concentration, suggesting a conflicting relationship between AA deamination and EO supplementation between *in vitro* and *in vivo* experiments. The increase

in milk protein secretion in response to BEO was apparently the result of increased MP supply through increased flow to the duodenum of AA from ruminal microbes. Our data cannot ascertain that BEO had an effect on ruminal dietary protein deamination.

The total tract nutrient digestibility was not responsive to BEO or MON, but BEO increased the proportion of acetate and tended to reduce propionate in ruminal VFA. The supplementation of BEO also reduced the proportion of butyrate in ruminal VFA. Hirstov et al. (2013) also reported decreased ruminal butyrate in cows supplemented with *Origanum vulgare* leaves containing 78.5 % of carvacrol. The trend for increased acetate to propionate ratio in this experiment contrasts with the reduction in the acetate to propionate ratio in response to the same BEO product in the experiment of Silva et al. (2017). The difference between experiments in ruminal fermentation profile induced by BEO may be a plausible explanation for the difference in animal response to this feed additive. A reduction in the acetate to propionate ratio was associated to improved feed efficiency in Silva et al. (2017) and the increase in the acetate to propionate ratio was associated to increased BW gain and milk protein yield in this experiment.

Both BEO and MON affected ingestion and rumination behaviors. Cows fed MON had a lower proportion of the daily intake at night, selected in favor of small feed particles in the afternoon, and had longer meal duration and fewer meals/d than cows fed BEO. Cows on BEO refused long feed particles in the morning relative to CTL and tended to have more meals/d and less rumination/DMI than CTL and MON. Reduced meal size can reduce the decline in pH after eating (Dado and Allen, 1993) and less rumination/DMI may reflect better ruminal fiber digestion within the same diet (Grummer et al., 1987), possibly related to the higher acetate to propionate ratio on BEO.

The animal response to BEO in variables describing body homeothermy was consistent between this experiment and the experiment of Silva et al. (2017). In both, BEO

increased the sweating rate and reduced the proportion of cows with high rectal temperature, without affecting the respiration rate and blood glucose concentration. The BEO increased the evaporative heat loss. The positive response of BEO on rectal temperature was apparently more evident on days of low THI. In the experiment of Silva et al. (2017), BEO increased the sweating rate significantly in a day of high temperature and low humidity (mean sweating rate of 190 g/m²/h) and had minor effect during a hot and humid day (mean sweating rate of 432 g/m²/h). In this experiment, conducted during a cooler environment than the experiment of Silva et al (2017), the mean sweating rate was expectedly low (mean sweating rate of 144 g/m²/h). The capacity of an animal to increase the sweating rate in response to BEO may be dependent on the basal sweating rate and a dry environment is apparently more favorable to the positive action of BEO on evaporative heat loss than a humid environment (Curtis, 1983; Gebremedhin et al., 2008). Ruminants have a maximum sweating capacity per unit of body surface area of around 350 g/m²/h for unclipped hair coat (Allen et al., 1970). The gain in sweating rate in response to a feed additive seems to be larger when the basal rate is low than when it is already high.

The increase in evaporative heat loss could reduce the maintenance energy required for heat dissipation (Fox and Tylutki, 1998). Lactating cows under heat stress have increased demand for glucose as an energy substrate (Rhoads et al., 2009). The relief in the maintenance energy required for heat dissipation could increase plasma glucose supply to peripheral tissues and for milk lactose synthesis. There was no indication that the reduction in body temperature induced by BEO was capable of increasing blood glucose in this experiment. Dias et al. (2017) observed that the increase in plasma niacin induced by yeast culture supplementation reduced various measures of body temperature and the respiration rate, and increased blood glucose and feed efficiency of dairy cows during summer. Niacin acts by increasing peripheral vasodilation and can increase the evaporative heat loss (Benyó

et al., 2006). The association of yeast products and BEO may be a strategy for magnifying the favorable effect of a feed additive on the maintenance energy required for body temperature regulation.

The positive effect of BEO on the vasodilation and evaporative heat loss were probably mediated by capsaicin (Gracias et al., 2001; Starr et al., 2008). Lee et al. (2000) reported decreased body temperature (- 0.3 °C) and increased skin surface temperature (+ 4.2 °C) in rats injected with 5 mg of capsaicin/kg of BW, similarly to the observed in this experiment. The activation of TRPV1(Transient Receptor Potential Vanilloid 1) on the presynaptic terminals impinging on the preoptic area and anterior hypothalamus results in increased excitatory neurotransmitter onto warm-sensitive neurons or increased inhibitory neurotransmitter onto cold-sensitive neurons (Caterina, 2007). Capsaicin, and other compounds, such as carvacrol (Suganthi and Manpal, 2013), cinnamaldehyde (Yanaga et al., 2006), and eugenol (Damiani et al., 2003), have been shown to induce blood vessels vasodilation. Monensin also potentiated the nitric oxide-dependent vasorelaxation in rat aortic rings and cultured porcine aortic endothelial cells (Schneider et al., 2002). Both BEO and MON increased the area of the caudal artery in this experiment, but only BEO increased the evaporative heat loss, suggesting that other mechanisms, in addition to vascular relaxation, determined the positive effect of BEO on the sweating rate. Capsaicin receptors are found on the surface of the oral cavity and in the tongue (Inoue et al., 2007). Carvacrol also has receptors in the tongue (Suganthi and Manpal, 2013) and eugenol is able to bind to such receptors (Xu et al., 2006). The conjunct action of BEO may potentiate the effect of EO on thermoregulation, justifying the use of blends in place of pure chemicals.

The BEO increase blood oxygenation, at similar respiration rate, as in Silva et al. (2017). Various EO have mucolytic and bronchodilator properties (Tamaoki et al., 1995; Kamyar and Hedayat, 2008). Capsaicin promotes activation of pulmonary C-fibers causing

arteriolar dilation (Roberts et al., 2014). Besides, its receptors may have increased expression in the bronchial airway epithelium (Groneberg et al., 2004). *Capsicum* extract increased blood hemoglobin concentration of dairy cows (Oh et al., 2013; Oh et al., 2015). The systemic action of BEO on blood oxygen concentration suggests possible action of EO on respiratory heat loss as a thermoregulatory mechanism, in addition to peripheral vasodilation.

CONCLUSIONS

The supplementation of lactating dairy cows with BEO increased milk protein yield, BW gain, and reduced the proportion of cows with high body temperature relative to CTL and MON. The positive response in lactation performance and evaporative heat loss was associated to altered ingestion and chewing behavior, and increased acetate to propionate ratio in ruminal fluid, blood vasodilation, oxygen concentration in venous blood, and sweating rate. The BEO acted as a ruminal and systemic modulator in dairy cows.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Fapemig (Minas Gerais Foundation for Research Support, Belo Horizonte, Brazil) and CNPq (National Research Council, Brasilia, Brazil) for the grants to the authors, to Grasp Indústria e Comércio Ltda (Curitiba, Brazil) for partially funding the project, to the members of Grupo do Leite of the University of Lavras for the help in data collection and animal care, and to Prof. Alexandre Vaz Pires (Esalq/USP, Piracicaba, Brazil) for the GLC analysis of VFA.

REFERENCES

Aiken, G. E., B. H. Kirch, J. R. Strickland, L. P. Bush, M. L. Looper, F. N. Schrick. 2007. Hemodynamic responses of the caudal artery to toxic tall fescue in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 85, 2337–2345.

Allen, T. E., J. W. Bennett, S. M. Donegan, and J. C. D. Hutchinson. 1970. Moisture, its accumulation and site of evaporation in the coats of sweating cattle. *J. Agric. Sci.* 74:247–258.

AOAC International. 2012. *Official Methods of Analysis* 19th ed. Assoc. Off. 409 Anal. Chem., Arlington, VA.

Benyó, Z., A. Gille, C. L. Bennett, B. E. Clausen, and S. Offermanns. 2006. Nicotinic acid-induced flushing is mediated by activation of epidermal langerhans cells. *Mol Pharmacol* 70:1844–1849.

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

Cardozo, P. W., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2004. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 82:3230–3236.

Cardozo, P. W., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2006. Effects of alfalfa extract, anise, *Capsicum*, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet. *J. Dairy Sci.* 84:2801–2808.

Caterina, M. J. 2007. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292:64–76.

Chen, X. B., and M. J. Gomes. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: An overview of technical details. *Int. Feed Res. Unit, Occasional Publ.* Rowett Research Institute, Aberdeen, United Kingdom.

Curtis, S. E. 1983. *Environmental Management in Animal Agriculture*. Iowa State Press, Ames.

Dado, R. G., and M. S. Allen. 1993. Relationship between eating behavior and ruminal pH for dairy cows consuming low or high fiber diets. Page 18 in *Abstr. Conf. Rumen Function*, Cornell Univ., Ithaca, NY.

Damiani, C. E. N., L. V. Rossoni, and D. V. Vassallo. 2003. Vasorelaxant effects of eugenol on rat thoracic aorta. *Vascul. Pharmacol.* 40:59–66.

Dehority, B. A. 1984. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:182–185.

Di Pasqua, R., N. Hoskins, G. Betts, and G. Mauriello. 2006. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *J. Agric. Food Chem.* 54:2745–2749.

Dias, J. D. L., R. B. Silva, L. E. C. Graças, K. Ferreira, L. C. Resende, R. C. Araujo, R. A. N. Pereira and M. N. Pereira. 2017. Supplementation to late lactation dairy cows during summer with dead yeast culture. *J. Dairy Sci.* X:XXX–XXX (Subject).

Duffield, T. F., A. R. Rabiee, and I. J. Lean. 2008. A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 2. Production effects. *J. Dairy Sci.* 91:1347–1360.

Ellis, J. L., J. Dijkstra, A. Bannink, E. Kebreab, and S. E. Hook. S. Archibeque, and J. France. 2012. Quantifying the effect of monensin dose on the rumen volatile fatty acid profile in high-grain fed beef cattle. *J. Anim. Sci.* 90:2717–2726.

Fox, D. G., and T. P. Tylutki. 1998. Accounting for the effects of environment on the nutrient requirements of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 81:3085–3089.

Gebremedhin, K. G., P. E. Hillman, C. N. Lee, R. J. Collier, S. T. Willard, J. D. Arthington, and T. M. Brown-Brandl. 2008. Sweating rates of dairy cows and beef heifers in hot conditions. *American Society of Agricultural and Biological Engineers*. 51:2167–2178.

Gill, A. O., and R. A. Holley. 2004. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:5750–5755.

Gracias, N. G., T. R. Cummins, M. R. Kelley, D. P. Basile, T. Iqbal, and M. R. Vasko. 2011. Vasodilatation in the rat dorsal hindpaw induced by activation of sensoryneurons is reduced by paclitaxel. *NeuroToxicology*. 32:140–149.

Groneberg, D. A., A. Niimi, Q. T. Dinh, B. Cosio, M. Hew, A. Fischer, and K. F. Chung. 2004. Increased expression of transient receptor potential vanilloid-1 in airway nerves of chronic cough. *Am J Respir Crit Care Med*. 170:1276–1280.

Grummer, R. R., A. L. Jacob, and J. A. Woodford. 1987. Factors associated with variation in milk fat depression resulting from high grain diets fed to dairy cows. *J. Dairy Sci*. 70:613–619.

Hall, M. B. 2009. Determination of starch, including maltooligosaccharides, in animal feeds: comparison of methods and a method recommended for AOAC collaborative study. *Journal of AOAC International*. 92:42–49.

Hashemzadeh-Cigari, F., G. R. Ghorbani, M. Khorvash, A. Riasi, A. Taghizadeh, and Q. Zebeli. 2015. Supplementation of herbal plants differently modulated metabolic profile, insulin sensitivity, and oxidative stress in transition dairy cows fed various extruded oil seeds. *Prev. Vet. Med*. 118:45–55.

Hristov, A. N., C. Lee, T. Cassidy, K. Heyler, J. A. Tekippe, G. A. Varga, B. Corl, and R. C. Brandt. 2013. Effect of *Origanum vulgare* L. leaves on rumen fermentation,

production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:1189–1202.

Inoue, N., Y. Matsunaga, H. Satoh, and M. Takahashi. 2007. Enhanced energy expenditure and fat oxidation in humans with high bmi scores by the ingestion of novel and non-pungent capsaicin analogues (Capsinoids). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71:380–389.

Ipharraguerre, I. R., and J. H. Clark. 2003. Usefulness of ionophores for lactating dairy cows: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 106:39-57.

Kamyar M and M. D. Hedayat. 2008. Essential oil diffusion for the treatment of persistent oxygen dependence in a three-year-old child with restrictive lung disease with respiratory syncytial virus pneumonia. *Explore.* 4:264–266.

Khiaosa-ard, R., and Q. Zebeli. 2013. Meta-analysis of the effects of essential oils and their bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in ruminants. *J. Anim. Sci.* 91:1819–1830.

Klevenhusen, F., A. Muro-Reyes, R. Khiaosa-ard, B. U. Metzler-Zebeli, and Q. Zebeli. 2012. A meta-analysis of effects of chemical composition of incubated diet and bioactive compounds on in vitro ruminal fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 176:61–69.

Lammers, B. P., D. R. Buckmaster, and A. J. Heinrichs. 1996. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. *J. Dairy Sci.* 79:922–928.

Lee, T. H., J. W. Lee, O. Toshimasa, A. Kobayashi, Y. Namba, S. Inou, and S. Kimura. 2000. Lack of integrative control of body temperature after capsaicin administration. *Korean Journal of Internal Medicine.* 15:103–108.

Leonardi, C., and L. E. Armentano. 2003. Effect of quantity, quality, and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:557–564.

Lin, B., Y. Lu., J. H. Wang, Q. Liang, and J. X. Liu. 2012. The effects of combined essential oils along with fumarate on rumen fermentation and methane production *in vitro*. *J. Anim. Feed Sci.* 21:198–210

McLean, J. A. 1963. The partition of insensible losses of body weight and heat from cattle under various climatic conditions. *Journal of Physiology.* 167:427–447.

Michiels, J., J. Missotten, D. Fremaut, S. De Smet, and N. Dierick. 2007. In vitro dose – response of carvacrol, thymol, eugenol and *trans* -cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora. 109:157–160.

Mullins, C. R., L. K. Mamedova, M. J. Brouk, C. E. Moore, H. B. Green, K. L. Perfield, J. F. Smith, J. P. Harner, and B. J. Bradford. 2012. Effects of monensin on metabolic parameters, feeding behavior, and productivity of transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:1323–1336.

NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, DC.

Oh, J., A. N. Hristov, C. Lee, T. Cassidy, K. Heyler, G. A Varga, J. Pate, S. Walusimbi, E. Brzezicka, K. Toyokawa, J. Werner, S. S. Donkin, R. Elias, S. Dowd, and D. Bravo. 2013. Immune and production responses of dairy cows to postruminal supplementation with phytonutrients. *J. Dairy Sci.* 96:7830–7843.

Oh, J., F. Giallongo, T. Frederick, J. Pate, S. Walusimbi, R. J. Elias, E. H. Wall, D. Bravo, and A. N. Hristov. 2015. Effects of dietary *Capsicum* oleoresin on productivity and immune responses in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:6327–6339.

Oh, J., E. H. Wall, D. M. Bravo, and A. N. Hristov. 2017a. Host-mediated effects of phytonutrients in ruminants: A review. *J. Dairy Sci.* 100:5974–5983.

Oh, J., M. Harper, F. Giallongo, D. M. Bravo, E. H. Wall, and A. N. Hristov. 2017b. Effects of rumen-protected *Capsicum* oleoresin on productivity and responses to a glucose tolerance test in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:1888–1901.

Oh, J., M. Harper, F. Giallongo, D. M. Bravo, E. H. Wall, and A. N. Hristov. 2017c. Effects of rumen-protected *Capsicum* oleoresin on immune responses in dairy cows intravenously challenged with lipopolysaccharide. *J. Dairy Sci.* 100:1902–1913.

Pineda, A., and F. C. Cardoso. 2015. Technical note: Validation of a handheld meter for measuring B-hydroxybutyrate concentration in plasma and serum of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:8818–8824.

Rhoads, M. L., R. P. Rhoads., M. J. Van Baale., R. J. Collier., S. R. Sanders, W. J. Weber., B. A. Crooker, and L. H. Baumgard. 2009. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. *J. Dairy Sci.* 92:1986–1997.

Roberts, A. M., J. Yu, and I. G. Joshua. 2014. Microvascular dilation evoked by chemical stimulation of C-fibers in rats. 2014. *J Appl Physiol.* 118: 55–60.

Russell, J. B. 2002. Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition. James B. Russell, Cornell Univ. Press, Ithaca, NY.

Sawka, M. N., and J. W. Castellani. 2007. How hot is the human body? *J. Appl. Physiol.* 103:419–420.

Schleger, A. V., and H. G. Turner. 1965. Sweating rates of cattle in the field and their reaction to diurnal and seasonal changes. *Australian Journal Agricultural Research.* 16:92–106.

Schneider, J., D. E. L. Kebir, C. Che, A. T. Dinh-xuan, D. El Kebir, and J. Mercier. 2002. Involvement of Na/Ca exchanger in endothelial NO production and endothelium-

dependent relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:837–844.

Shabala, L., L. Budde, B. Ross, T. Siegumfeldt, H. Jakobsen, and M. McMeekin. 2002. Responses of *Listeria monocytogenes* to acid stress and glucose availability revealed by a novel combination of fluorescence microscopy and microelectrode ion-selective techniques. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:1794–1802.

Silanikove, N. 2000. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. *Livest. Prod. Sci.* 67:1–18.

Starr, A., R. Graepel, J. Keeble, S. Schmidhuber, N. Clark, A. Grant, A. M. Shah, and S. D. Brain. 2008. A reactive oxygen species-mediated component in neurogenic vasodilatation. *Cardiovasc. Res.* 78:139–147.

Suganthi, R. U., and S. Manpal. 2013. Biological and pharmacological of actions carvacrol and its effects on poultry: an updated review. *World J. Pharmacy and Pharmaceutical Sci.* 5:3581–3595.

Tamaoki, J., A. Chiyotani, A. Sakai, H. Takemura, and K. Konno. 1995. Effect of enthol vapour on airway hyperresponsiveness in patients with mild asthma. *Respiratory Medicine*. 89:503–504.

Tekippe, J. A., A. N. Hristov, K. S. Heyler, T. W. Cassidy, V. D. Zheljazkov, J. F. S. Ferreira, S. K. Karnati, and G. A. Varga. 2011. Rumen fermentation and production effects of *Origanum vulgare* L. leaves in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:5065–5079.

Tekippe, J. A., R. Tacoma, A. N. Hristov, C. Lee, J. Oh, K. S. Heyler, and T. W. Cassidy. 2013. Effect of essential oils on ruminal fermentation and lactation performance of dairy cows. 7892–7903.

Ultee, A., E. P. W. Kets, and E. J. Smid. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology* 65:4606–4610.

Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583–3597.

Wall, E. H., P. H. Doane, S. S. Donkin, and D. Bravo. 2014. The effects of supplementation with a blend of cinnamaldehyde and eugenol on feed intake and milk production of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97:5709–5717.

Warner, A. C. I. 1962. Enumeration of rumen micro-organisms. *Microbiology.* 28:119–128.

Wildman, E. E., G. M. Jones, P. E. Wagner, R. L. Boman, H. F. Troutt, and T. N. Lesch. 1982. A dairy-cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J. Dairy Sci.* 65:495–501.

Xu, H., M. Delling, J. C. Jun, and D. E. Clapham. 2006. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat. Neurosci.* 9:628–635.

Yanaga, A., H. Goto, T. Nakagawa, H. Hikiami, N. Shibahara, and Y. Shimada. 2006. Cinnamaldehyde induces endothelium-dependent and -independent vasorelaxant action on isolated rat aorta. *Biol. Pharm. Bull.* 29:2415–2418.

Yousef, M. K. 1985. *Stress Physiology in Livestock*. 1st ed. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.

Zimbelman, R. B., L. H. Baumgard, and R. J. Collier. 2010. Effects of encapsulated niacin on evaporative heat loss and body temperature in moderately heat-stressed lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 93:2387–2394.

TABLES AND FIGURES

Table 1. Diet composition (% of DM) and particle size distribution (% of as fed) on treatments Control (CTL), Blend of Essential Oils (BEO), or Monensin (MON)

	CTL	BEO	MON
Corn silage		44.0	
Ryegrass hay		5.6	
Whole cottonseed		10.7	
Soybean meal (45.8 % CP)		13.0	
Soypass Cargill (44.5 % CP)		3.6	
Finely ground mature corn		20.6	
Limestone		0.8	
Sodium bicarbonate		0.8	
Magnesium oxide		0.3	
Salt		0.2	
Minerals and vitamins ¹		0.4	
CP	14.8	14.7	14.7
NDF	30.2	30.4	30.2
NDF from forages	21.3	21.4	21.3
Starch	31.2	31.3	31.2
Ether extract	4.1	4.0	4.0
Ash	5.9	5.8	5.8
NFC ²	44.6	44.8	45.5
DM, % of as fed	44.2	44.4	44.8
Feed particles > 19 mm ³	8.8 ± 1.24	7.8 ± 0.37	7.6 ± 1.10
Feed particles 8 - 19 mm	38.5 ± 0.50	37.2 ± 0.52	38.9 ± 0.44
Feed particles < 8 mm	52.7 ± 1.71	55.0 ± 0.88	53.5 ± 0.70

¹21.0 % Ca; 15.6 % P; 3.0 % Mg; 3.9% S; 150 ppm Co; 2,000 ppm Cu; 5,000 ppm Mn; 11,903 ppm Zn; 82 ppm Se; 200 ppm I; 1,000 KUI/kg Vit. A; 220 KUI/kg Vit. D; 6,200 UI/kg Vit. E

²Nonfiber carbohydrates = 100 - (CP + NDF + EE + Ash)

³Penn State Particle Separator. Mean and SD of weekly samples

Table 2. Intake, lactation performance, MUN, SCC, feed efficiency, BCS, and BW of dairy cows on treatments Control (CTL), Blend of Essential Oils (BEO), or Monensin (MON)

	Treatments				<i>P</i> -value ¹		
	CTL	BEO	MON	SEM	Treat	CTL vs. BEO	BEO vs. MON
DMI, kg/d	20.8	21.4	20.9	0.51	0.45	0.25	0.38
Milk, kg/d	33.0	34.4	33.2	0.70	0.24	0.11	0.21
ECM, kg/d	31.5	32.6	31.3	0.78	0.29	0.20	0.15
4% FCM, kg/d	29.9	31.0	29.7	0.77	0.30	0.21	0.16
Fat, kg/d	1.116	1.154	1.091	0.0331	0.29	0.30	0.13
Fat, %	3.39	3.36	3.33	0.058	0.68	0.64	0.72
Protein, kg/d	1.058	1.096	1.045	0.0225	0.12	0.12	0.04
Protein, %	3.23	3.20	3.16	0.019	0.03	0.27	0.10
Casein, kg/d	0.839	0.868	0.828	0.0285	0.34	0.30	0.15
Casein, %	2.59	2.58	2.51	0.096	0.68	0.90	0.51
Lactose, kg/d	1.490	1.551	1.523	0.0441	0.41	0.18	0.51
Lactose, %	4.52	4.51	4.57	0.027	0.08	0.85	0.05
Solids, kg/d	3.983	4.218	3.986	0.0864	0.30	0.16	0.21
Solids, %	12.10	12.02	12.05	0.073	0.59	0.32	0.68
MUN, mg/dL	17.7	18.6	18.8	0.62	0.22	0.23	0.66
Linear SCC, ² 1-9	4.10	3.80	3.97	0.434	0.80	0.51	0.71
Milk/DMI	1.58	1.60	1.59	0.043	0.95	0.77	0.94
ECM/DMI	1.51	1.52	1.49	0.035	0.76	0.97	0.55
BCS, 1-5	3.10	3.24	3.14	0.076	0.30	0.13	0.29
BW, kg	624	634	630	2.52	0.03	< 0.01	0.23
BW gain, ³ kg/d	-0.06	0.32	0.12	0.079	< 0.01	< 0.01	0.09

¹*P* < 0.01 for the fixed effect of time (days 15 to 56 or weeks 3 to 8) and *P* > 0.20 for the interaction between treatment and time

²Equivalency: 4.10 = 214,000 cells/mL, 3.80 = 174,000 cells/mL, and 3.97 = 196,000 cells/mL

³Slope of linear regression of BW over weeks 0, 2, 4, 6, and 8

Table 3. Total tract apparent digestibility of DM, OM, NDF, non-NDF OM (% of intake), and urinary allantoin (mmol/d) on treatments Control (CTL), Blend of Essential Oils (BEO) or Monensin (MON)

	Treatments				P-value		
	CTL	BEO	MON	SEM	Treat	CTL vs. BEO	BEO vs. MON
DMI, ¹ kg/d	21.2	22.1	21.8	0.90	0.46	0.23	0.68
DOMI, ² kg/d	14.2	14.7	15.0	0.78	0.51	0.44	0.75
DMD	68.9	67.8	69.6	1.86	0.72	0.63	0.43
OMD	70.8	70.3	72.4	1.54	0.52	0.79	0.28
NDFD	46.0	45.3	46.4	3.9	0.97	0.88	0.82
Non-NDFOMD	82.4	82.7	83.6	1.05	0.15	0.66	0.16
Allantoin	201	212	165	15.7	0.10	0.64	0.04

¹DMI during the period of feces and urine sampling

²Digestible OM intake

Table 4. Molar VFA proportions (% of total VFA) and total protozoa concentration ($\times 10^5/\text{mL}$) in ruminal fluid on treatments Control (CTL), Blend of Essential Oils (BEO), or Monensin (MON)

	Treatments				P-value		
	CTL	BEO	MON	SEM	Treat	CTL vs. BEO	BEO vs. MON
Acetate	61.3	63.2	61.1	0.63	0.05	0.04	0.02
Propionate	22.1	21.0	22.2	0.53	0.24	0.15	0.12
Butyrate	11.6	10.9	11.6	0.53	0.06	0.05	0.03
Valerate	1.7	1.7	1.6	0.04	0.66	0.36	0.66
Methyl-butyrate ¹	2.4	2.3	2.6	0.10	0.03	0.13	0.01
Isobutyrate	0.9	0.9	0.9	0.03	0.98	0.96	0.86
Acetate/Propionate	2.8	3.0	2.7	0.09	0.15	0.12	0.07
Protozoa	3.63	3.19	2.69	0.497	0.40	0.45	0.56

¹Sum of 3-methyl and 2-methyl butyrate which coelute

Table 5. Proportion of intake in periods of the day (% of daily intake), feed particles sorting behavior (Observed/Predicted, %), and orts (% of offered TMR) on treatments Control (CTL), Blend of Essential Oils (BEO), or Monensin (MON)

	Treatments				<i>P</i> -value ¹		
	CTL	BEO	MON	SEM	Treat	CTL vs. BEO	BEO vs. MON
Proportion of intake							
0700-1300 h	35.9	35.7	37.2	3.16	0.89	0.97	0.69
1300-1900 h	45.8	47.2	52.0	2.46	0.18	0.60	0.20
1900-0700 h	18.3	17.1	10.8	1.62	< 0.01	0.64	0.01
Feed particles sorting ²							
0700-1300 h							
> 19 mm ³	95	69	77	7.6	0.04	0.02	0.47
> 8 mm and < 19 mm	100	98	94	1.8	0.14	0.53	0.19
< 8 mm	103	105	109	2.1	0.15	0.59	0.17
1300-1900 h							
> 19 mm	72	76	67	7.5	0.73	0.73	0.43
> 8 mm and < 19 mm	95	96	91	1.67	0.10	0.68	0.04
< 8 mm	107	106	112	1.50	0.02	0.47	< 0.01
1900-0700 h							
> 19 mm	95	85	94	13.3	0.84	0.59	0.65
> 8 mm and < 19 mm	105	95	97	2.0	0.31	0.15	0.74
< 8 mm	101	110	105	4.4	0.32	0.13	0.40
Orts							
Orts 0700-1300 h	43.5	43.7	47.7	2.72	0.86	0.98	0.67
Orts 1300-1900 h	44.0	43.7	43.3	2.11	0.96	0.92	0.87
Orts 1900-0700 h	44.8	48.6	48.0	4.55	0.80	0.55	0.92
Daily orts ⁴	14.6	16.3	17.8	1.76	0.40	0.49	0.54

¹Proportion of intake in periods of the day: $P \leq 0.05$ for the fixed effect of day (26, 27, 50, and 51) and $P > 0.39$ for the interaction between treatment and day. Feed sorting and orts: $P \leq 0.01$ for the fixed effect of day (27 and 51) and $P > 0.48$ for the interaction between treatment and day

²< 100 % = rejection, > 100 % = preferential intake, 100 % = no selection. Sieves of the Penn State Particle Separator

³Long particles (> 19 mm), medium-length particles (> 8 mm and < 19 mm), and short particles (< 8 mm)

⁴Daily orts = (Orts 0700 h/Offered TMR per day) x 100

Table 6. Chewing activity and ingestion behavior on treatments Control (CTL), Blend of Essential Oils (BEO), or Monensin (MON)

	Treatments				<i>P</i> -value ¹		
	CTL	BEO	MON	SEM	Treat	CTL vs. BEO	BEO vs. MON
	min/d						
Ingestion	264	268	292	15.1	0.31	0.84	0.23
Rumination	507	456	483	20.1	0.16	0.06	0.30
Chewing ²	771	724	775	28.4	0.42	0.35	0.24
	min/kg of DMI						
Ingestion	12.5	12.5	14.1	0.93	0.22	0.93	0.14
Rumination	23.6	21.0	23.5	1.05	0.10	0.06	0.06
Chewing	36.2	33.5	37.6	1.87	0.14	0.17	0.05
	0700-1300 h						
Meal duration, min	24	23	26	4.8	0.78	0.76	0.52
Meals/period	3.6	3.6	3.4	0.20	0.67	0.74	0.59
	1300-1900 h						
Meal duration, min	26	23	31	1.43	< 0.01	0.16	< 0.01
Meals/period	4.5	5.4	4.2	0.26	0.01	0.03	< 0.01
	1900-0700 h						
Meal duration, min	19	18	18	1.55	0.82	0.56	0.88
Meals/period	3.5	3.5	3.8	0.34	0.74	0.99	0.51
First meal duration, min	39	37	49	6.2	0.16	0.75	0.08
Meal duration, min	23	21	25	0.97	0.04	0.29	0.01
Meals/d	11.6	12.5	11.6	0.49	0.27	0.15	0.15

¹Chewing activity: $P \leq 0.01$ for the fixed effect of day (24 and 52) and $P > 0.18$ for the interaction between treatment and day. First meal duration: $P \leq 0.01$ for the fixed effect of day (24 to 26 and 51 to 53) and $P > 0.35$ for the interaction between treatment and day

²Ingestion + Rumination

Table 7. Skin surface and rectal temperatures and respiration rate on treatments Control (CTL), Blend of Essential Oils (BEO), or Monensin (MON)

	Treatments				<i>P</i> -value ¹		
	CTL	BEO	MON	SEM	Treat	CTL vs. BEO	BEO vs. MON
	Rectal, °C						
0800 h	38.3	38.1	38.4	0.12	0.74	0.46	0.59
1600 h	38.9	38.7	38.8	0.08	0.27	0.12	0.22
2200 h	38.5	38.4	38.5	0.13	0.72	0.51	0.49
	Skin surface, °C						
0800 h	31.6	32.3	31.9	0.18	0.03	0.01	0.07
1600 h	33.1	33.4	33.4	0.17	0.77	0.64	0.83
2200 h	33.7	33.9	33.9	0.16	0.36	0.22	0.94
	Respiration, breaths/min						
0800 h	48	48	46	2.8	0.74	0.97	0.52
1600 h	59	57	57	2.9	0.70	0.43	0.83
2200 h	55	56	54	2.8	0.78	0.46	0.49

¹ $P \leq 0.01$ for the fixed effect of day (2 x/wk, 16 measurements/cow) and $P > 0.48$ for the interaction between treatment and day

Table 8. Proportion of cows (%) with rectal temperature $\geq 39.2^{\circ}\text{C}$ at 0800, 1600, and 2200 h on treatments Control (CTL), Blend of Essential Oils (BEO), or Monensin (MON). Observations/treatment: CTL and MON =160, and BEO = 144.

	Treatments			CTL vs. BEO			BEO vs. MON			Odds ratio	95 % CI ³	
	CTL	BEO	MON	Est ¹	SE ²	<i>P</i> -value	Est ¹	SE ²	<i>P</i> -value			
0800 h	5.6	3.4	8.1	0.50	0.570	0.37	0.89	0.539	0.09	0.67	0.27	1.62
1600 h	30.0	18.7	30.6	0.61	0.274	0.02	0.64	0.273	0.02	0.97	0.60	1.56
2200 h	20.0	10.4	18.1	0.76	0.336	0.02	0.64	0.341	0.05	1.12	0.64	1.97

¹Parameter estimate generated with the GENMOD procedure of SAS using logistic regression for binomial data. BEO is zero

²Standard error of the estimate

³Profile likelihood 95 % confidence interval for odds ratio

Table 9. Surface area, sweating rate, stored heat, body temperature, and evaporative heat loss (EHL) on treatments Control (CTL), Blend of Essential Oils (BEO), or Monensin (MON)

	Treatments			SEM	<i>P</i> -value ¹		
	CTL	BEO	MON		Treat	CTL vs. BEO	BEO vs. MON
Surface area, m ²	5.48	5.57	5.54	0.062	0.35	0.17	0.67
Sweating rate, g/m ² /h	135	163	134	12.0	0.10	0.05	0.05
Stored heat, kcal	19.0	19.5	19.4	0.39	0.39	0.20	0.78
Body temperature, °C	36.7	36.6	36.7	0.11	0.77	0.85	0.50
EHL, kcal/h	419	569	481	41.7	0.04	0.01	0.12

¹Sweating rate: $P \leq 0.01$ for the fixed effect of week (1 to 8) and $P > 0.83$ for the interaction between treatment and week. Body temperature: $P \leq 0.01$ for the fixed effect of day (16/cow) and $P > 0.30$ for the interaction between treatment and day. Surface area, stored heat, and evaporative heat loss: $P \leq 0.01$ for the fixed effect of day (14, 28, 42, and 56) and $P > 0.36$ for the interaction between treatment and day

Table 10. Blood flow, and diameter and area of the caudal artery on treatments Control (CTL), Blend of Essential Oils (BEO), or Monensin (MON)

	Treatments			SEM	P-value ¹		
	CTL	BEO	MON		Treat	CTL vs. BEO	BEO vs. MON
Flow velocity, cm/s	11.2	12.6	14.0	0.95	0.10	0.28	0.30
Pulsatility index	2.9	2.5	2.3	0.27	0.32	0.39	0.54
Diameter, cm	0.309	0.341	0.341	0.0169	0.08	0.08	0.99
Area, cm ²	0.062	0.076	0.075	0.0049	0.07	0.04	0.89

¹ $P \leq 0.01$ for the fixed effect of day (26 and 58) and $P > 0.23$ for the interaction between treatment and day

Table 11. Jugular blood acid-base balance 9 h post-feeding on treatments Control (CTL), Blend of Essential Oils (BEO), or Monensin (MON)

	Treatments			SEM	P-value ¹		
	CTL	BEO	MON		Treat	CTL vs. BEO	BEO vs. MON
pCO ₂ , ² mm Hg	42.9	43.8	42.9	3.17	0.99	0.91	0.97
pO ₂ , ³ mm Hg	30.3	33.3	29.7	0.85	0.02	0.02	< 0.01
pH	7.42	7.42	7.41	0.011	0.60	0.88	0.37
HCO ₃ ⁻ , mmol/L	27.3	27.2	26.9	0.42	0.77	0.90	0.60
Total CO ₂ , mmol/L	28.5	28.4	28.1	0.43	0.79	0.90	0.62
Base excess, mmol/L	3.1	3.0	2.5	0.47	0.61	0.92	0.43
SatO ₂ , ⁴ %	58.0	64.1	56.3	1.75	0.02	0.02	< 0.01
O ₂ ct, ⁵ %	12.9	14.4	12.6	0.40	0.02	0.03	< 0.01

¹ $P \leq 0.01$ for the fixed effect of day (24 and 52) and $P > 0.16$ for the interaction between treatment and day

²Partial pressure of CO₂

³Partial pressure of O₂

⁴% oxygen saturation of hemoglobin

⁵% oxygen of the total volume

Table 12. Blood urea-N (BUN) and plasma glucose at 0, 4, and 12 h post-feeding, and BHBA, D-lactate, aspartate aminotransferase (AST), and gamma glutamyl transferase (GGT) at 12 h post-feeding on treatments Control (CTL), Blend of Essential Oils (BEO), or Monensin (MON)

	Treatments				<i>P</i> -value ¹		
	CTL	BEO	MON	SEM	Treat	CTL vs. BEO	BEO vs. MON
BUN 0 h, mg/dL	17.1	18.5	19.4	0.66	0.04	0.12	0.33
BUN 4 h, mg/dL	18.4	20.8	20.4	0.82	0.10	0.05	0.69
BUN 12 h, mg/dL	14.7	16.6	16.3	0.92	0.31	0.15	0.76
Glucose 0 h, mg/dL	67.0	67.3	66.4	1.28	0.87	0.89	0.62
Glucose 4 h, mg/dL	61.1	62.2	63.5	1.39	0.57	0.67	0.56
Glucose 12 h, mg/dL	62.0	62.2	63.3	1.65	0.75	0.91	0.56
BHBA, mmol/L	1.12	1.19	1.23	0.101	0.72	0.66	0.75
D-lactate, μ M	51.9	62.6	51.8	6.11	0.50	0.34	0.30
AST, U/L	32.9	30.7	27.2	3.19	0.34	0.58	0.37
GGT, U/L	71.8	77.2	76.5	7.11	0.84	0.59	0.37

¹ $P \leq 0.03$ for the fixed effect of day (14, 25, 39 and 53) and $P > 0.26$ for the interaction between treatment and day

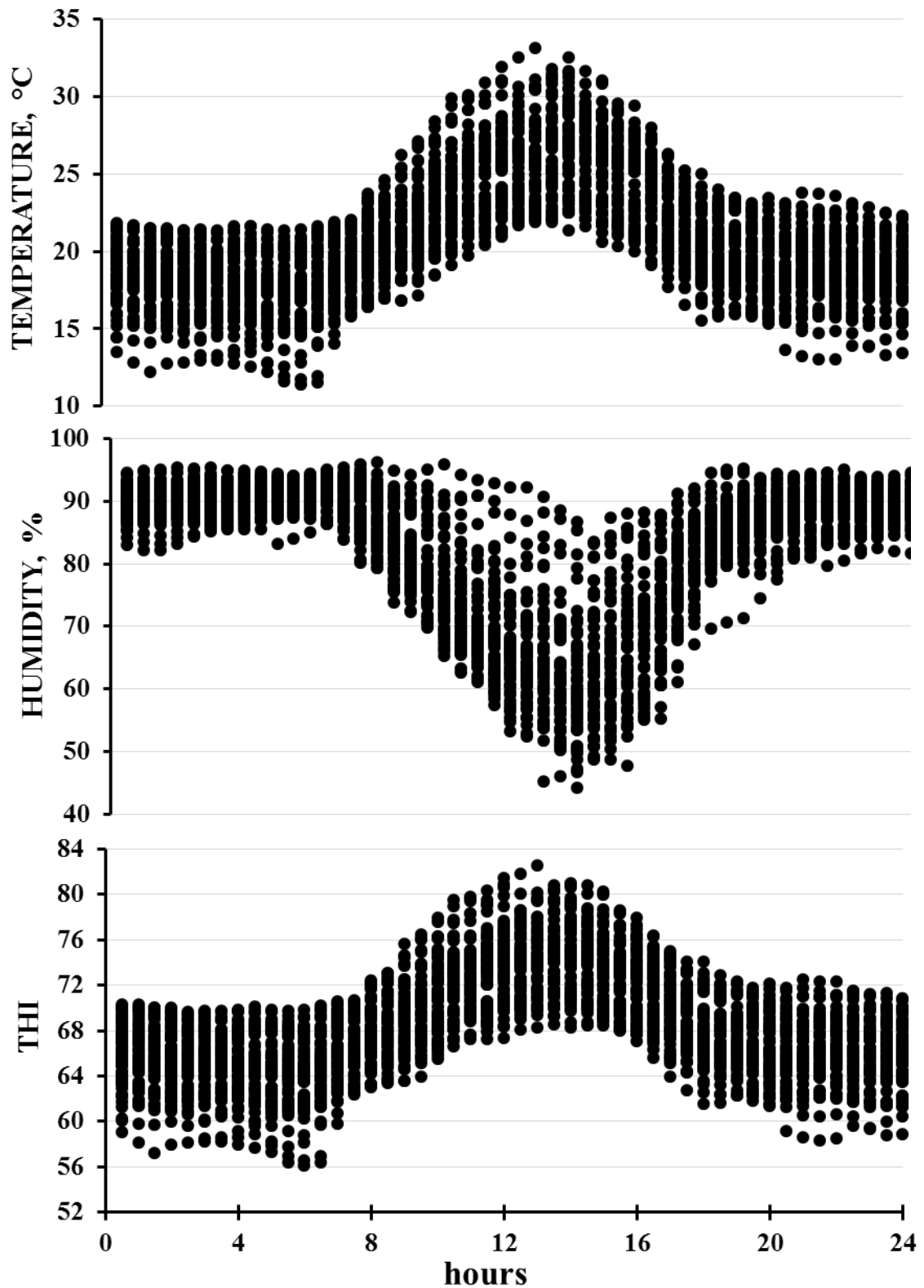


Figure 1. Temperature-Humidity Index (THI) inside the tie stall during the experiment. 2784 recordings at 30-min intervals. Mean THI 68.2 ± 4.44 (mean \pm SD). Proportion $>$ THI 68: 47.9 % of time. Temperature: $20.7 \pm 3.8^\circ\text{C}$. Humidity: 81.8 ± 11.3 %.

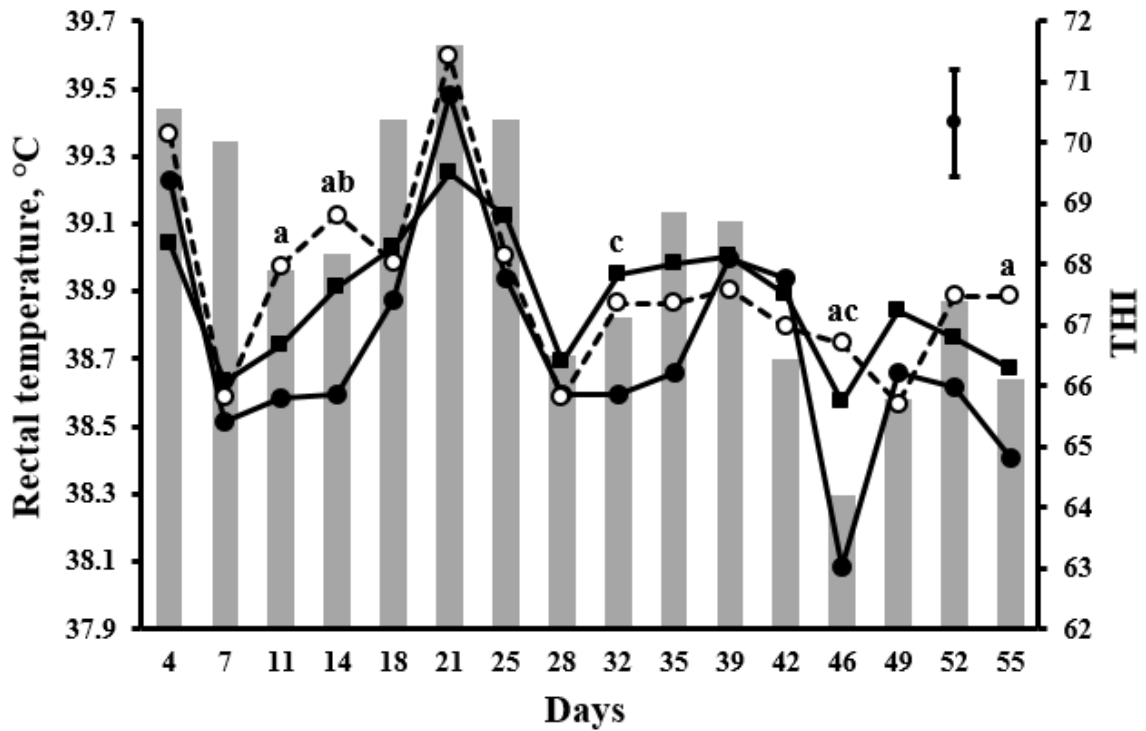


Figure 2. Rectal temperature at 1600 h on treatments Control (CTL) (---○---), Blend of Essential Oils (BEO) (—●—), or Monensin (—■—) (MON). $P = 0.27$ for treatment, $P < 0.01$ for day, and $P = 0.18$ for the interaction between treatment and day. Slice option of SAS: a = CTL vs. BEO $P \leq 0.04$; b = BEO vs. MON $P = 0.04$; and c = BEO vs. MON $P \leq 0.12$. Temperature-Humidity Index (THI) inside the tie stall (■).