THIAGO HENRIQUE ANNIBALE VENDRAMINI

Avaliação de aditivos na alimentação de vacas leiteiras

Pirassununga, SP

2014

THIAGO HENRIQUE ANNIBALE VENDRAMINI

Avaliação de aditivos na alimentação de vacas leiteiras

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de Concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Francisco Palma Rennó

Pirassununga

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3065
FMVZ

Vendramini, Thiago Henrique Annibale
Avaliação de aditivos na alimentação de vacas leiteiras / Thiago Henrique Annibale
Vendramini. -- 2014.
81 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga 2015.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Palma Rennó.

1. Quitosana. 2. Monensina. 3. Óleos essenciais. 4. Rúmen. 5. Digestibilidade. I. Título.

São Paulo, 28 de outubro de 2014
CEUA N 7072050214

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Francisco Palma Rennó

Executante: Francisco Palma Rennó

Depto/Disc: Nutrição E Produção Animal

Pesquisadores associados: Thiago Henrique Annibale Vendramini (fmvz-usp); Francisco Palma Rennó (orientador)

Título do projeto: "Avaliação Comparativa de Diferentes Aditivos na Alimentação de Vacas Leiteiras".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

Baseada na busca pela adequada exploração da capacidade produtiva do animal e a máxima obtenção da lucratividade, necessária no cenário mundial apresentado nos últimos anos, surgiram novas alternativas que influenciam positivamente o melhor desempenho do animal, como exemplo, a utilização de ionóforos na alimentação de bovinos. A hipótese científica a ser avaliada neste projeto de pesquisa sugere que a utilização de óleos essenciais (Crina® Ruminants, DSM Nutritional Products) ou quitosana na alimentação de vacas leiteiras apresentam resultados similares a monensina sódica, e influenciam positivamente o desempenho produtivo, digestão e metabolismo de vacas leiteiras no início de lactação. Neste experimento serão utilizadas 24 vacas da raça Holandesa, multiparas, com aproximadamente 150 dias de lactação no início do fornecimento das dietas experimentais. Destes animais, oito serão vacas que foram implantados cirurgicamente com cânulas ruminais, previamente.

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 15/10/2014, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: VENDRAMINI, Thiago Henrique Annibale

Título: **Avaliação de aditivos na alimentação de vacas leiteiras**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico a realização deste sonho e desta obra a meus pais, Carlos Alberto Vendramini e Tânia Annibale Vendramini, pela vida, criação, amor e toda felicidade, e principalmente por acreditarem num sonho, confiarem em menino e sonharem com um grande homem como seu filho.

Aos meus queridos avós, estejam eles torcendo lá com papai do céu ou aqui bem pertinho, em desculpas pela ausência nesta busca por este sonho em outra cidade, mas ao mesmo tempo pela torcida, admiração e amor.

A minha irmã Thaís Cristina Annibale Vendramini, pelo carinho e amor, por sempre acreditar em seu irmão, por toda admiração, e pelo desejo da felicidade de uma vida inteira sempre perto de você.

E com grande gratidão ao meu melhor amigo peludo, tigrado e de quatro patas, que me fez almejar a medicina veterinária, e o qual não pude ajudar e estar presente nos últimos meses de sua vida, muito pelo fato de estar em busca deste sonho, dedico agora, com toda certeza de saudade, carinho, amor e amizade.

*A estes dedico a obra, todo trabalho, e a realização deste sonho
como forma de gratidão por tudo o que fizeram
por toda felicidade e todo amor
e por toda minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus que me deu condições e saúde para que eu pudesse chegar até aqui e realizar este trabalho e sonho.

Agradeço aos meus pais Carlos Alberto Vendramini e Tânia Annibale Vendramini por todo carinho, amor, educação e felicidade, por toda torcida, incentivo, e todo esforço para proporcionar o caminho e a realização deste sonho. Vocês são a base desta conquista

Agradeço do fundo do coração a minha irmã Thaís Cristina Annibale Vendramini por toda torcida, toda admiração e todo amor que nenhuma distância é capaz de superar. Que sejamos sempre companheiros e felizes sempre perto um do outro.

Aos meus amados avós Alfeu Annibale e Neyde Orsini Annibale, também pela admiração, pelo carinho, e pela torcida por um neto, que apesar da distância para conquistar este sonho, nunca se esquecerá do amor, da saudade e da felicidade de estar ao lado de seus queridos avós.

Aos meus avós Julia Etelvina Ramos Vendramini e Virgílio Vendramini, agradeço o amor, a fé, a força e a enorme torcida que sei que sempre ocorreram independente se ao meu lado fisicamente ou espiritualmente.

Ao meu melhor amigo e inesquecível companheiro Tigrão, pela felicidade de uma vida inteira ao seu lado, pela certeza de uma presença por toda vida, por todo amor e toda saudade.

Aos meus tios Ricardo Annibale e Regina Greco Annibale e meus primos, Renato Annibale e Rubens Annibale, agradeço pelo carinho, pelo cuidado, pela torcida e pela admiração.

Pelo carinho, força, fé, todas orações e torcida agradeço também a senhora Joana Greco e ao senhor Fábio Greco, ao grande amigo Heraldo Orsini Junior e sua esposa Rose.

A todos demais familiares agradeço pela torcida e pelo incentivo

Agradeço com todo amor, carinho a linda namorada Milena D. Lacerenza, por todo carinho, todo incentivo, toda torcida, por todo amor, toda felicidade e por todos os incríveis e maravilhoso momentos propiciados ao seu lado desde que lhe conheci, e que

foram muito importantes na conquista deste sonho. Agradeço ainda a sua família toda torcida, força e carinho dispensados.

Agradeço ao Prof. Francisco Palma Rennó, pelos ensinamentos, pelo trabalho, pela confiança depositada em mim desde o início da nossa já longa caminhada juntos, pela sua orientação e dedicação, e pelo carinho e oportunidade de realização deste sonho.

À Universidade de São Paulo, a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, e Departamento de Nutrição e Produção Animal, incluindo seus professor e funcionários pela formação e realização desta conquista.

Ao companheiro de faculdade, de IC, de mestrado, de muito trabalho, de vários anos, companheiro de histórias, de pesquisa, de natais, de tristeza, de risadas, de férias, de experimento, ao companheiro de conquista, ao companheiro Caio Seite Takiya agradeço o companherismo, a ajuda, incentivo, dedicação, conversas, trabalho e felicidade. Meu muitíssimo obrigado meu grande amigo.

Ao amigo Thiago Henrique da Silva, agradeço toda ajuda, risadas, toda dedicação, colaboração, todo incentivo, todo trabalho, todas histórias, todos ótimos momentos ao seu lado na execução desse projeto e por todo companheirismo.

Aos amigos Gustavo Calomeni, Rodrigo Gardinal, José Esler e Jefferson Gandra, agradeço toda contribuição nestes anos, todo incentivo e toda amizade

À especial Gabriela Alves Reis agradeço pelo carinho, pelo cuidado, por toda torcida, ajuda, toda força, dedicação, todo incentivo e toda importância no caminho de realização deste sonho.

Ao amigo Filipe Zanferari, meus sinceros agradecimentos por toda dedicação, por toda ajuda, por toda colaboração, toda amizade, pelas conversas, por todos ensinamentos, todas histórias, todo incentivo, pela inspiração, e pela responsabilidade de despertar uma vontade cada vez maior em estudar e trabalhar da melhor maneira possível.

A todos integrantes do grupo de pesquisa do Laboratório de Pesquisa em Bovinos Leiteiros da FMVZ USP, Tiago Del Valle, Pablo, Elmeson (Mineiro), Rafael (Bizão), Lenita, Guilherme e Vitor, e todos outros companheiros que já passaram por este laboratório, agradeço pela contribuição, trabalho e convivência.

A todos animais pela felicidade de conviver bem perto destes e pela viabilidade de execução do projeto.

A todos alunos de iniciação científica que de alguma forma contribuíram em muito para realização deste projeto, em especial a Barrosã, Mel, Dado e Jéssica.

A todos estagiários, que colaboraram neste trabalho.

A meus grande amigos funcionários, sem citar nomes, para não se esquecer de nenhum e o qual são vários, mas que vão desde os que me acompanham desde a entrada neste laboratório de pesquisa, até o mais novos, e que foram de suma importância para realização deste trabalho.

A todos amigos de graduação, de acampamento, de pós graduação, ou de outras ocasiões pela torcida e amizade.

A minha segunda casa, o local que vi e que me viu muito crescer nestes anos, e que desejo e sempre farei de tudo para o maior e melhor desenvolvimento possível, o Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite por fornecer todas as condições estruturais e financeiras para a realização deste projeto.

À FAPESP e a CAPES pelo apoio financeiro pela concessão de auxílio à pesquisa que possibilitou a realização deste estudo.

Em especial aos amigos Caio Seiti Takiya, Filipe Zanferari e Thiago Henrique da Silva por sempre, sempre estarem ao meu lado trabalhando desde o começo ao fim deste projeto, em todas as fases de realização deste trabalho;

Enfim, a todos aqueles que, de alguma forma colaboraram, torceram, incentivaram ou se dedicaram para realização deste trabalho, que na realidade é um grande sonho.

“All our dreams can come true if we have the courage to pursue them.”

Walt Disney

(Todos os nossos sonhos podem se tornar realidade, se tivermos a coragem para prosseguir)

“Thiago, você é meu ídolo. Te amo.”

Seu Pai Carlos

Vendramini

RESUMO

VENDRAMINI, T. H. A. **Avaliação de aditivos na alimentação de vacas leiteiras.** [Evaluation of feed additives for dairy cows]. 2015. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

Objetivou-se avaliar a utilização de diferentes aditivos na alimentação de vacas em lactação sobre o consumo e digestibilidade aparente total da matéria seca e nutrientes, fermentação ruminal, produção e composição do leite, perfil metabólico e balanço de nitrogênio. Foram utilizadas 24 vacas da raça Holandesa, sendo destas 8 canuladas no rúmen, com média de produção de leite de $31,44 \pm 4,83$ kg, peso corporal médio de $586,07 \pm 79,63$ kg e com $175,89 \pm 99,74$ dias de lactação no início do fornecimento das dietas experimentais. Distribuídas em seis quadrados latinos 4x4, contemporâneos e balanceados, para receber as seguintes dietas experimentais: 1) Controle (CT), composta por dieta basal sem a inclusão de aditivos; 2) Crina (CRI) (Crina[®] Ruminants, DSM-TORTUGA), produto composto por uma mistura de óleos essenciais, sendo utilizado 1 g/vaca/dia; 3) Quitosana (QUI), com inclusão de quitosana na ordem de 150 mg/kg de peso vivo; 4) (MON) (Monensina DSM-TORTUGA), com inclusão de monensina na dose 24 mg/kg de matéria seca. Não foram observadas diferenças ($P < 0,05$) entre os tratamentos para consumo de matéria seca e nutrientes. Para digestibilidade da matéria seca e matéria orgânica a dieta QUI apresentou maiores valores ($P < 0,05$) quando comparados a CRI. Em relação à digestibilidade da proteína bruta, a dieta com Crina foi menor ($P < 0,05$) em relação aos demais aditivos. Não foram observadas diferenças ($P < 0,05$) para produção e composição do leite entre as dietas experimentais. Os consumos de energia digestível e metabolizável foram maiores para os animais suplementados com quitosana em relação as dietas CO e MON. As eficiências da utilização de energia foram superiores para CO em relação a dieta com quitosana. A inclusão de monensina aumentou o colesterol total sérico em comparação a dieta controle. A excreção de nitrogênio fecal (g/dia), foi menor para CRI em relação aos demais aditivos, para % nitrogênio fecal total foi observada redução em relação a dieta com a adição de quitosana apenas. O balanço de nitrogênio em (g/dia) este foi maior para QUI, em relação MO. Quanto aos parâmetros fermentativos a inclusão de monensina e quitosana nas dietas reduziu a concentração de acetato (mmol/L), e a dieta CRI, aumentou ainda a concentração de propionato em mmol/L. Para a concentração de

butirato, em mmol/L, a inclusão de monensina reduziu a concentração desta variável em relação à dieta controle, já os AGCR em mmol/L, todos os aditivos demonstraram efeito de redução ($P<0,05$), em relação à dieta controle. Para a concentração total de ácidos graxos de cadeia curta (mmol/L), as dietas com inclusão de Crina e monensina mostraram redução desta variável em relação à dieta controle. Assim, é possível concluir que quanto aos óleos essenciais (Crina Ruminants), as respostas não foram positivas para as variáveis avaliadas, possivelmente ocasionada pela intensa atividade antimicrobiana, não seletiva apenas aos microrganismos desejados, levando a efeitos desfavoráveis, entretanto a utilização de quitosana na alimentação de vacas leiteiras apresentam resultados semelhantes à utilização de monensina sódica ou superiores a dieta controle dependendo das variáveis a serem avaliadas, e pode ser uma grande alternativa na nutrição destes animais.

Palavras-chave: Quitosana. Monensina. Óleos Essenciais. Rúmen. Digestibilidade.

ABSTRACT

VENDRAMINI, T. H. A. **Evaluating of feed additives for dairy cows.** [Avaliação de aditivos na alimentação de vacas leiteiras.]. 2015. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

The objective of this study was to evaluate the effects of different additives in dairy cows feeding on nutrient intake, total apparent digestibility of dry matter and nutrients, ruminal fermentation, milk yield and composition, concentrations of blood parameters and energy and nitrogen balances; 24 Holstein cows 31.44 ± 4.83 kg/day of milk yield, 586.07 ± 79.63 kg of BW and 175.89 ± 99.74 days in milk; mean $\pm$ SD), 16 intact and 8 ruminally fistulated. The animals were randomly assigned in six 4 x 4 Latin-square (contemporaneous and balanced) design to receive one of following diets: 1) Control (CO), diet without inclusion of monensin, chitosan or essential oils; 2) Crina® (CRI), inclusion of the mixture of essential oils (Crina® Ruminants - DSM Nutritional products TORTUGA) at 1g/cow/day; 3) Chitosan (QUI), inclusion of 150 mg/kg BW of chitosan, and; 4) Monensin (MON), inclusion of 24 mg/kg of diet DM of sodic monensin (DSM – Monesin, TORTUGA). No differences in DMI and nutriente intakes were observed ($P < 0.05$) for cows fed different treatments. Total apparent digestibility of DM and organic matter were higher for cows fed Q when compared to cows fed CR. The crude protein digestibility was decreased when cows were fed CR when compared to cows fed the diets containing other additives (M and Q). There were no differences ($P < 0.05$) in milk yield and composition among cows fed experimental treatments. The intakes of digestible and metabolizable energy were higher for cows fed Q than cows fed C and M. The efficiency of energy utilization was higher for cows fed C when compared to cows fed Q. Monensin increased serum total cholesterol compared to C. The excretion of fecal nitrogen (g /day) was lower for the animals supplemented with CR compared to other additives to fecal nitrogen excretion (% of total nitrogen) differed just for animals fed Q. Cows fed Q had higher nitrogen balance than cows fed M. Experimental treatments did not alter pH, concentration of ruminal acetate (mmol / L) was decreased when cows were fed with M and Q, compared to C. Higher concentration of propionate (mmol / L) was observed for cows fed M than cows fed CR. Moreover, cows fed M had butyrate concentration (mmol / L) decreased compared to cows fed C,

and short chain fatty acids concentration (mmol / L) was decreased when additives were added to diets. Total concentration of short chain fatty acids (mmol / L) was reduced when monensin and essential oils were added to the diet. Thus, we conclude that the essential oils (Crina Ruminants), responses were not positive for the variables evaluated, possibly caused by intense antimicrobial activity not only selective to the desired microorganisms, leading to adverse effects. However the use of chitosan in dairy cows have similar results of monensin use or above the control diet depending on the variables evaluated, and can be a great alternative nutrition of this animals.

Keywords: Chitosan. Monensin. Essential Oils. Rumen. Digestibility.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição químico-bromatológica dos alimentos utilizados.....	39
Tabela 2 -	Proporção dos ingredientes no concentrado e na ração (%MS).....	40
Tabela 3 -	Composição químico-bromatológica do concentrado e da dieta	40
Tabela 4 -	Consumo de matéria seca e de nutrientes em função das dietas experimentais	47
Tabela 5 -	Digestibilidade da matéria seca e de nutrientes em função das dietas experimentais	49
Tabela 6 -	Produção e composição do leite em função das dietas experimentais	52
Tabela 7 -	Balanço de energia em função das dietas experimentais	55
Tabela 8 -	Variáveis sanguíneas em função das dietas experimentais	58
Tabela 9 -	Fermentação ruminal em função das dietas experimentais.....	60
Tabela 10 -	Balanço de nitrogênio em função das dietas experimentais.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- pH ruminal em função das dietas experimentais	61
Figura 2 - Concentrações ruminais de acetato em função das dietas experimentais.....	61
Figura 3 - Concentrações ruminais de propionato em função das dietas experimentais.....	62
Figura 4 - Concentrações ruminais de butirato em função das dietas experimentais....	63
Figura 5 - Concentrações ruminais de ácidos graxos de cadeia ramificada em função das dietas experimentais	63
Figura 6 - Concentrações ruminais de ácidos graxos de cadeia curta em função das dietas experimentais.....	64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	HIPÓTESE E OBJETIVOS	20
3	REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1	A ATUAL CADEIA PRODUTIVA DO LEITE E SUAS PERSPECTIVAS.....	21
3.2	O PAPEL DA NUTRIÇÃO ATUAL E A UTILIZAÇÃO DOS ADITIVOS.....	22
3.3	MODULADORES DE FERMENTAÇÃO RUMINAL – IONÓFOROS.....	23
3.4	IONÓFOROS - MONENSINA	24
3.5	DESAFIOS DO USO DA MONENSINA FRENTE ÀS QUESTÕES DE BIOSSEGURANÇA ALIMENTAR	27
3.6	ADITIVOS NATURAIS COMO ALTERNATIVA AO USO DE IONÓFOROS	29
3.7	ÓLEOS ESSENCIAIS	29
3.8	QUITOSANA	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	LOCAL E ANIMAIS	37
4.2	DELINEAMENTO E DIETAS EXPERIMENTAIS	37
4.3	CONSUMO DE MATÉRIA SECA E NUTRIENTES	38
4.4	DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL.....	40
4.5	PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE.....	41
4.6	FERMENTAÇÃO RUMINAL.....	42
4.7	BALANÇO DE ENERGIA	43
4.8	BALANÇO DE NITROGÊNIO	43
4.9	PARÂMETROS SANGUÍNEOS	45
4.10	AVALIAÇÃO DO PESO E ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL	45
4.11	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	CONSUMO E DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL	47
5.2	PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE.....	51
5.3	BALANÇO DE ENERGIA	54
5.4	PARÂMETROS SANGUÍNEOS	57
5.5	FERMENTAÇÃO RUMINAL.....	60

5.6	BALANÇO DE NITROGÊNIO	67
6	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

No intuito de se otimizar a capacidade produtiva dos animais de produção, aliada a obtenção da máxima lucratividade, diversos produtos e tecnologias têm sido desenvolvidos ao longo dos anos, com destaque às substâncias alimentares aditivas, como os antimicrobianos. Substâncias antimicrobianas são utilizadas como produtos que visam manipular os padrões de fermentação ruminal, desde a década de 50. Estas substâncias podem ser divididas em dois grupos, ionóforos e não ionóforos, de acordo com o seu modo de ação, sendo os ionóforos os mais utilizados e pesquisados pela comunidade científica.

Antibióticos ionóforos são, normalmente, responsáveis pela redução de perdas de energia e proteína no rúmen e, conseqüentemente, pela melhoria do desempenho ou eficiência produtiva dos animais.

A monensina é o principal ionóforo comercializado no mundo, sendo amplamente utilizado. Entretanto, mais recentemente, seu uso na alimentação animal tem sido questionado por questões de aceitação social, visto os possíveis riscos, embora até então não comprovados, à biossegurança alimentar, já que seu uso rotineiro na alimentação animal poderia representar problemas de resistência ao uso de antibióticos pelos humanos. Baseada nessa hipótese, a União Européia (UE) considerando o princípio da precaução, em 2006, banuiu os antimicrobianos como promotores de crescimento animal (Regulamentação 1831/2003/EC), estando os ionóforos incluídos na lista.

No Brasil, a monensina sódica ainda tem seu uso liberado para ser incluído em dietas para ruminantes em fases de crescimento, terminação e vacas lactantes. Entretanto, é evidente o papel da União Europeia como formadora de opinião, sendo plausível admitir que outros consumidores mundiais sejam pressionados a seguir esta decisão em um futuro próximo e, desta maneira, adotar a restrição da utilização destes aditivos.

Diante do exposto—compostos naturais alternativos vem sendo desenvolvidos com o propósito de promover efeitos similares aos ionóforos. Dentre os compostos naturais utilizados, pode-se destacar os óleos essenciais e a quitosana. Estes compostos têm despertado interesse quanto ao seu uso, por apresentarem em pesquisas recentes,

respostas semelhantes à utilização de ionóforos, no que tange o balanço populacional de micro-organismos no ambiente ruminal.

Os óleos essenciais são compostos secundários, obtidos por destilação a vapor ou extração por solvente de várias partes de plantas (por exemplo, folhas, flores, caules e sementes). Crane et al. (1957) inicialmente demonstraram os efeitos dos óleos essenciais sobre a fermentação ruminal, verificando que alguns destes óleos eram capazes de inibir a formação de CH_4 . Atividades antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, inseticida, antiprotozoários e antioxidante já foram observadas em muitos óleos essenciais (Burt, 2004)

De forma similar, Goiri et al. (2009a) propôs a utilização de quitosana como modulador da fermentação ruminal e do processo digestivo. A quitosana é um biopolímero atóxico e biodegradável que tem ganhado diversas aplicações na medicina e na conservação de alimentos, principalmente pelas suas atividades antimicrobianas. Tang et al. (2010), mencionaram que esse polissacarídeo possui amplo espectro de ação com doses mínimas inibitórias contra ambas bactérias, gram-positivas e gram-negativas.

No entanto, até então, são escassos resultados na literatura que avaliaram a utilização desses potenciais aditivos, como os óleos essenciais e a quitosana, ambos substitutos da monensina, sob as mesmas condições de estudo. Sendo assim, a hipótese científica a ser avaliada neste projeto de pesquisa sugere que a utilização de óleos essenciais (Crina[®] Ruminants, DSM Nutritional Products – compostos de óleos essenciais, incluindo óleo de timol, eugenol, vanilina, guaiacol e limoneno) e quitosana na alimentação de vacas leiteiras apresentam resultados similares à utilização de monensina sódica, e influenciam positivamente o desempenho produtivo, digestão e metabolismo de vacas leiteiras no início de lactação.

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

A hipótese científica a ser avaliada neste projeto de pesquisa sugere que a utilização de óleos essenciais e quitosana na alimentação de vacas leiteiras apresentam resultados similares à utilização de monensina sódica, influenciando positivamente o desempenho produtivo, digestão e metabolismo de vacas leiteiras no terço médio de lactação.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a utilização de diferentes aditivos na alimentação de vacas em lactação sobre o consumo e digestibilidade aparente total da matéria seca e nutrientes, a fermentação ruminal, produção e composição do leite, perfil metabólico e balanço de energia e nitrogênio.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A ATUAL CADEIA PRODUTIVA DO LEITE E SUAS PERSPECTIVAS

Os avanços da cadeia produtiva do leite no Brasil e no mundo crescem a cada ano, e tanto a produção leiteira quanto o consumo de lácteos tem passado por profundas transformações. Conforme projeção do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção de leite no Brasil deve aumentar 5% em 2014. Se confirmado o aumento, a produção deve chegar a 36,75 bilhões de litros em um ano. Segundo o próprio IBGE, em 2013, a produção leiteira foi de 35 bilhões de litros, sendo 35% a mais que os 26 bilhões contabilizados em 2007.

O país saiu de uma produção de 7,3 bilhões de litros de leite na década de 70 para atuais 35 bilhões de litros. A expectativa é de que o país assuma em 2014 a terceira colocação em produção mundial de leite.

Segundo o levantamento do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Mapa), o consumo per capita anual brasileiro é de 172,6 litros por habitante, enquanto o recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é de 200 litros, de acordo com as previsões publicadas no relatório do SIS Sebrae Produtos Lácteos - Expansão e oportunidades de mercado, a projeção de consumo de leite no Brasil para os próximos oito anos é de um aumento de cerca de 15%

No Brasil, em 2014, por exemplo, 41 países importaram lácteos da produção nacional. Este ano, o país enviou ao exterior 50 milhões de litros de leite a mais que importou, conseguindo superávit na balança comercial, situação bem diferente dos anos anteriores, sendo atualmente a Venezuela é nosso maior comprador de UHT (leite longa vida), iogurte e leite em pó.

Demonstrando este crescimento também mundial, Vandehaar e St-Pierre (2006), afirmam que nos últimos 100 anos, nos Estados Unidos, a produção de leite por vaca mais que quadruplicou e este aumento pode ser atribuído ao aumento do potencial genético e à evolução da nutrição e do manejo. Além da melhoria do potencial genético

e do manejo, a nutrição se mostra como uma das principais ferramentas para o aumento da produtividade e o crescimento da cadeia produtiva do leite.

3.2 O PAPEL DA NUTRIÇÃO ATUAL E A UTILIZAÇÃO DOS ADITIVOS

Segundo Instrução Normativa 13/2004, do Ministério da Agricultura, aditivo para produtos destinados à alimentação animal é: substância, micro-organismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizado normalmente como ingrediente, tendo ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios e atenda às necessidades nutricionais ou tenha efeito anticoccidiano.

Dentro desta conjuntura da nutrição como uma das principais ferramentas para a produção leiteira atual, um dos mais importantes tópicos na nutrição de ruminantes é o estudo destas substâncias capazes de modular a fermentação ruminal, a fim de melhorar o aproveitamento dos nutrientes pelos microorganismos ruminais.

Os microorganismos ruminais utilizam dos nutrientes ingeridos para produzir ácidos graxos de cadeia curta e sintetizar proteína microbiana. Contudo, este processo fermentativo não é tão eficiente na conservação de energia (perda de metano) e de proteína (perda por meio de nitrogênio amoniacal) que pode limitar a performance produtiva e contribuir para a perda de nutrientes no ambiente.

Segundo Segabinazzi (2008) é necessária a otimização do desempenho dos ruminantes através da manipulação dos padrões da fermentação ruminal, de modo que as alterações na composição da microbiota do rúmen potencializem a síntese de produtos provenientes da digestão dos alimentos, tornando-a mais eficaz e menos dispendiosa em termos de energia.

3.3 MODULADORES DE FERMENTAÇÃO RUMINAL – IONÓFOROS

A adição de aditivos moduladores de fermentação ruminal é uma estratégia amplamente empregada nas dietas de vacas leiteiras em razão de melhorar a conversão alimentar (MORRIS et al., 1990; OWENS et al., 1991) e ainda, por sua praticidade no fornecimento da ração diária.

O uso das substâncias antimicrobianas com finalidade de aditivo zootécnico, melhorador de desempenho na alimentação animal iniciou-se na década de 50. Estes podem ser divididos em dois grupos, ionóforos e não ionóforos, de acordo com o seu modo de ação.

Antibióticos ionóforos tem tido muito sucesso na redução de perdas de energia e proteína no rúmen e no aumento do desempenho dos animais. O motivo destes ionóforos aumentarem o desempenho de animais é atribuído principalmente a melhora da eficiência energética devido ao aumento da digestibilidade dos alimentos, ao aumento da produção do ácido propiônico, com consequente redução da relação acetato/propionato, uma diminuição da produção de metano e ácido láctico, e por reduzir a perdas de proteína e aminoácidos que seriam potencialmente fermentados em nível de rúmen (RUSSELL; STROBEL, 1989).

Além disso, segundo o NRC (2001) a utilização de ionóforos, como a monensina, para animais não lactantes além do aumento da eficiência alimentar, é útil na prevenção das coccidioses e aumenta o ganho de peso.

O uso de ionóforos é um bem sucedido exemplo de como a manipulação da fermentação ruminal contribui para o aumento do desempenho animal. Todavia, a legislação classifica os ionóforos como antibióticos, o que faz seu uso ser cada vez mais criticado pela sociedade consumidora.

Existem mais de 70 tipos diferentes de ionóforos, como a monensina, lasolocida, salinomicina, narasina, tetronasina, lisocelina, dianemicim, nigercim, ramacidim, laidlomocina, entre outros.

Os ionóforos são assim chamados em função da sua propriedade transportadora de íons, possuindo capacidade de formar complexos lipossolúveis com cátions e mediar seu transporte através das membranas lipídicas (PRESSMAN, 1968).

O modo de ação da monensina sódica prevê uma mudança no movimento de íons através de membranas, alterando o gradiente de prótons e, consequentemente, o pH

dentro da célula. Desta forma, este gasto de energia pela ativação da bomba iônica, buscando reestabelecer o potencial de membrana, pode levar a redução no crescimento microbiano. Quando as reservas energéticas se exaurem, a bomba iônica deixa de operar, a osmolaridade intracelular aumenta e a pressão osmótica faz com que a água entre na célula, podendo rompê-la (Mcguffey et al., 2001).

3.4 IONÓFOROS - MONENSINA

Os principais ionóforos comercializados no Brasil são a Monensina Sódica e a Lasalocida Sódica, embora uma série de outros aditivos, como a Salinomicina, Virginiamicina, entre outros, possam ser utilizados com o mesmo propósito. A Monensina é amplamente utilizada e a maioria das pesquisas envolvendo a utilização de ionóforos se baseiam na utilização da mesma.

Ionóforos, como a monensina sódica, são compostos produzidos por bactérias, sobretudo do grupo *Streptomyces cinnamonensis*, que, sendo altamente lipofílicos e tóxicos a muitos microrganismos, são definidos como antibióticos (HANEY; HOEHN, 1967).

Em um estudo tradicional realizado por Schelling (1984), foi proposto sete modos de ação, através dos quais, monensina, melhora o desempenho de ruminantes e segundo o autor são: 1) modificação na produção de ácidos graxos voláteis, 2) alteração no consumo de alimentos, 3) alteração na produção de gases, 4) modificação na digestibilidade dos alimentos, 5) alteração no enchimento do rúmen e taxa de passagem, 6) alteração na utilização de proteína e 7) outros modos de ação.

Fatores como o volumoso utilizado, o período de lactação, o nível de produção e a dose utilizada de monensina sódica interagem e geram resultados muitas vezes contraditórios nos estudos que envolvem monensina sódica para vacas em lactação, indicando haver interações entre fatores dietéticos e fisiológicos envolvidos.

Segundo a literatura, vacas em início de lactação alimentadas com 300 mg de monensina/dia, apresentam redução na consumo de matéria seca (CMS), sem redução a produção de leite, produção de leite corrigida para o teor de gordura, além de amenizar a perda de peso normal do pós parto (SAUER et al., 1989). Campos Neto et al. (1995) constataram que a adição de 300 mg monensina sódica na alimentação de bovinos

leiteiros em início de lactação, aumentou a produção de leite em 13,5% com redução da IMS. Resultados semelhantes foram encontrados por Hayes et al. (1996), quando avaliaram o efeito da monensina em vacas alimentadas a pasto. O grupo suplementado com monensina apresentou produção de leite de 1,38 L/dia maior que o grupo controle.

Já Eifert et al. (2005), utilizando silagem de milho como volumoso para vacas no início da lactação, com dose de 16 mg/kg MS de monensina, não encontraram diferença no consumo de matéria seca (17,8 vs. 17,8 kg/dia) e na produção de leite (26,6 vs. 25,9 kg/dia) em relação a dieta controle, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados por Martineau et al. (2007) quando utilizaram silagem de leguminosas para animais no mesmo período de lactação e com dose de monensina de 24 mg/kg MS.

Oelker et al. (2009) avaliaram dois tipos de volumosos, feno de alfafa e silagem de milho para vacas no terço médio de lactação, e com suplementação de 17 mg/kg MS de monensina e observaram diferença ($p < 0,05$) para produção de leite (38,4 vs. 34,5 kg/dia) e digestibilidade da matéria seca (70,0 vs. 64,6%), quando comparadas ao controle. No entanto, não observaram diferença no consumo de matéria seca (21,7 vs. 20,6 kg/dia), respectivamente, para silagem de milho e feno de alfafa.

Observando a suplementação de monensina em diferentes períodos de lactação, as revisões de Ipharraguerre e Clark (2003) e McGuffey et al. (2001) sugerem que a redução no consumo, característica verificada em bovinos de leite, parece ser mais frequente quando as vacas estão no terço médio e final da lactação

Quanto à digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes, resultados de pesquisas refletem dados inconsistentes sobre o efeito da monensina sódica. Alguns estudos mostram aumento na digestibilidade da fibra (SPEARS, 1990; OSBORNE et al. 2004). Este efeito pode estar relacionado ao aumento de pH promovido pela suplementação de monensina, que desta forma poderia proporcionar melhores condições aos microorganismos ruminais para digestão da fibra (VARGA, 1997). Plazier et al. (2000) reportaram aumento na digestibilidade da proteína quando suplementaram vacas leiteiras no início da lactação. Da Silva et al. (2007); Gehman et al. (2008) e Oelker et al. (2009) não observaram efeito da utilização da monensina sobre a digestibilidade da proteína em vacas na mesma fase de lactação.

Quanto à fermentação ruminal estudos têm demonstrado que a monensina sódica atua selecionando determinadas cepas de bactérias podendo levar a mudanças no processo de fermentação ruminal (BERGEN; BATES, 1984; RUSSELL, 1987). A

presença da monensina pode favorecer o crescimento de certas bactérias em relação a outras, assim o metabolismo da bactéria beneficiada pode afetar o desempenho do animal hospedeiro e proporcionar vantagens nutricionais ou metabólicas em relação ao animal não suplementado (DUFFIELD; BAGG, 2000).

Duffield et al. (2008b), em estudo metanalítico, avaliou 77 experimentos, e demonstrou que a suplementação com monensina leva a redução de 0,3 kg no consumo e aumento de 0,7 kg na produção de leite, representando aumento de 2,5% na eficiência. Foi observado ainda redução de 1,3 g/kg no teor de gordura do leite, aumento de 0,3 g/kg no teor de proteínas, além de alteração do perfil de ácidos graxos no leite, com redução de ácidos graxos de cadeia curta e esteárico, e aumento de ácidos graxos insaturados. A monensina ainda melhorou o escore de condição corporal e fez com que as vacas ganhassem mais peso em relação à dieta controle.

A monensina proporciona ainda mudança nos parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras, principalmente no metabolismo energético através da glicose, ácidos graxos não esterificados e β -hidroxibutirato. Da Silva et al. (2007) avaliaram a suplementação de monensina em dose de 20 mg/kg ms em vacas no início de lactação, e não encontraram nenhum efeito sobre o colesterol total, colesterol-HDL e triglicérides, no entanto observou efeito da monensina sobre a concentração plasmática de colesterol-LDL em relação à ração controle.

Duffield et al. (2008a), em outro trabalho metanalítico, avaliaram os efeitos metabólicos da monensina sódica e observaram que a monensina aumenta a glicemia em 3% e a concentração sérica de ureia em 6%, sem influenciar as concentrações de colesterol, insulina e cálcio no sangue e de ureia no leite.

No mesmo trabalho Duffield et al. (2008a), observou que a suplementação de monensina sódica em dietas de vacas leiteiras tem grande influência sobre a atividade das enzimas hepáticas (aspartato aminotransferase, gama-glutamyltransferase e fosfatase alcalina), pois com a suplementação, o aporte de propionato e aminoácidos aumentam em nível hepático, e por consequência acabam aumentando a atividade dessas enzimas no fígado.

Segundo McGuffey et al. (2001); Ipharraguerre e Clark (2003) e Duffield et al. (2008a), a dose de monensina sódica para vacas leiteiras em qualquer período de lactação ou submetidas a qualquer tipo de volumoso é recomendada, 16 mg/kg MS ou 24 mg/kg MS, sendo esta última forma utilizada para animais em produção, e a primeira em animais em crescimento ou em período de transição. Doses superiores a estas não

são recomendadas, pois podem causar queda no desempenho produtivo dos animais ou até mesmo intoxicações (PLAIZER et al. 2000).

Gandra et al. (2010), avaliou concentrações crescentes de monensina sódica nas dietas de vacas leiteiras no terço médio de lactação e seus efeitos sobre consumo digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes, produção e composição do leite, fermentação ruminal, síntese de proteína microbiana, parâmetros sanguíneos e resíduos de monensina no leite. Observaram redução linear do consumo e resposta quadrática sobre a produção de leite, resultando na maior eficiência produtiva quando a dose utilizada foi de 24 mg/kg de matéria seca da dieta, similar ao observado em estudos anteriores.

3.5 DESAFIOS DO USO DA MONENSINA FRENTE ÀS QUESTÕES DE BIOSSEGURANÇA ALIMENTAR

A utilização da monensina sódica para vacas leiteiras se mostra desta maneira um atraente aditivo para ser amplamente utilizado na alimentação destes animais. Aparentemente, sua utilização não traz qualquer risco à saúde humana, uma vez que os resíduos, quando detectados, estão em concentrações baixíssimas, mesmo com doses muito elevadas do ionóforo na dieta.

Wilkinson et al. (1997) reportaram em oito estudos nos quais vacas leiteiras foram suplementadas com doses de monensina de 278 a 1125 mg/dia, e foram realizadas análises de resíduos no leite, não foram observados valores que se caracterizavam como nocivos à saúde humana em nenhum dos estudos, apesar dos métodos de análise utilizados serem altamente sensíveis.

Em outro trabalho com vacas leiteiras em início de lactação suplementadas com doses crescentes de monensina de 72, 144, 240 mg/kg MS, os autores não detectaram resíduos de monensina que caracterizassem riscos à saúde humana. O valor do resíduo detectado de monensina para a dose de 240 mg/kg MS, que representa 10 vezes a dose usual, foi da ordem de 5 ng/L. (BAGG et al. 2005)

Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO) através do Codex Alimentarius Commission, o limite máximo para a presença de monensina sódica no leite é da ordem de 2 µg/l. Para a carne

bovina esse valor está em torno de 10 µg/kg, e sendo o fígado órgão de eleição para detecção de resíduos de monensina, limite máximo é de 20 µg/kg.

Em estudo feito em relação às concentrações residuais de monensina sódica no leite Gandra et al., (2009) relataram que encontram-se dentro do limite máximo de 2 µg/l permitido pela (FAO/WHO). No estudo foi observado os valores de 2,35 ng/l, para a ração controle; 3,52 ng/l para as rações com 24 mg/kg ms de monensina e 3,85 ng/l para as rações com 48 mg/kg ms de monensina.

Como já mencionado anteriormente, o uso de monensina na alimentação animal é envolto de reduzida aceitação social, e após anos de pesquisas, mesmo com resultados opostos, sua inclusão nas dietas dos animais ainda é questionável, visto os possíveis riscos, embora até então não comprovados, à biossegurança alimentar dos humanos.

Em 2006, a União Europeia banuiu os antimicrobianos como promotores de crescimento animal (Regulamentação 1831/2003/EC), estando os ionóforos incluídos na lista. A alegação é a possível presença de resíduos no leite e na carne, além da maior probabilidade de aparecimento de resistência bacteriana aos antimicrobianos usados na medicina humana.

No Brasil, a monensina sódica tem seu uso liberado para ser incluído em dietas para ruminantes em crescimento, terminação e vacas lactantes (Oliveira et. al., 2005). Entretanto, é evidente o papel da União Europeia como formadora de opinião, sendo plausível admitir que outros consumidores mundiais sejam pressionados a seguir esta decisão em futuro próximo e desta maneira a restrição da utilização destes aditivos. Segundo Mingoti (2013), frente as diferentes questões econômicas e de saúde pública, existe um crescente interesse científico por alternativas que mimetizem os efeitos dos ionóforos, sendo seguras ao consumo humano e, ao mesmo tempo, aceitas pela sociedade consumidora.

3.6 ADITIVOS NATURAIS COMO ALTERNATIVA AO USO DE IONÓFOROS

Após a restrição da União Européia quanto a utilização dos antimicrobianos como promotores de crescimento, novas alternativas naturais vem sendo pesquisadas para substituição dos ionóforos.

Neste contexto surgem e ressurgem diversas alternativas com a necessidade de adequar o modelo de suplementação com as restrições do cenário internacional, e a possibilidade de mudanças também na produção nacional.

Estudos relacionados ao uso de aditivos naturais na nutrição animal ainda são pouco explorados, e com isso, o conhecimento da eficácia dos mesmos são escassos, porém, a linha de pesquisa relacionada ao uso destes vem crescendo e as substâncias utilizadas são variadas.

Diversas possibilidades de utilização e substituição dos aditivos usuais (monensina) destacam-se como alternativas, entre elas podemos citar, leveduras, probióticos, enzimas, ou compostos naturais com possíveis características a serem aproveitadas para a alimentação animal promovendo melhor desempenho destes.

A fim de encontrar alternativas para modulação ruminal, pesquisas vem sendo conduzidas substituindo os ionóforos por produtos alternativos de melhor impacto para o mercado consumidor, dentre as alternativas destacam-se os óleos essenciais (Calsamiglia et al., 2006)

3.7 ÓLEOS ESSENCIAIS

Nos últimos anos, resgatou-se o interesse que começou a cerca de 50 anos na utilização de tais compostos, o qual foi desestimulado com o uso dos ionóforos (CRANE, 1957).

Segundo a Comissão Européia para o Desenvolvimento as pesquisas com óleos essenciais se intensificaram por duas razões principais: em primeiro lugar, para encontrar uma alternativa natural após a proibição do uso de antibióticos como aditivos

para alimentação animal em vários países, e segundo, pelo aumento de preocupações sobre os efeitos ambientais da produção de ruminantes.

Óleos essenciais podem ser uma ferramenta útil para melhorar a eficiência de utilização dos nutrientes e desempenho em ruminantes e para reduzir os efeitos sobre o meio ambiente (GIANNENAS et al., 2011).

Estes óleos essenciais são compostos secundários, obtidos por destilação a vapor ou extração por solvente de várias partes de plantas (por exemplo, folhas, flores, caules e sementes). Estes óleos são os componentes voláteis responsáveis na maioria das vezes pelo aroma característico de especiarias.

O suplemento Crina® Ruminantes é uma mistura de componentes de óleo essenciais contendo de 100 a 300 g / kg de compostos fenólicos incluindo cresol, resorcinol, timol, eugenol, guaiacol (ROSSI, 1994).

Os possíveis mecanismos de atuação dos óleos essenciais estão, em sua maioria, associadas à membrana celular, como o transporte de elétrons e gradiente de íons, translocação de proteínas, fosforilações e outras reações enzimáticas (DORMAN; DEANS, 2000). Como componentes ativos em muitas especiarias e conservantes, óleos essenciais têm sido historicamente utilizados para inibir o crescimento bacteriano.

A maioria dos trabalhos envolvendo os óleos essenciais é realizada *in vitro*. Estes trabalhos são úteis para uma avaliação inicial da atividade dos óleos essenciais, suas atividades antimicrobiana, dosagens, e adequadas concentrações, para posteriormente ser avaliada *in vivo*.

Há cerca de 50 anos, Crane et al. (1957) foram provavelmente os primeiros a demonstrar os efeitos dos óleos essenciais sobre a fermentação ruminal, verificando que limoneno e pineno eram capazes de inibir a formação de CH₄. Atividades antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, inseticida, antiprotozoários e antioxidante já foram observadas em muitos óleos essenciais (BURT, 2004).

Os óleos essenciais apresentam uma atividade antibacteriana seletiva, com o espectro de atividade antibacteriana variando com os compostos testados (JANSSEN et al., 1986; LIS-BALCHIN; DEANS, 1997; DEMETZOS et al., 1997).

Quanto a alterações do consumo dos animais suplementados, Benchaar et al. (2007b) não observaram alteração no consumo de matéria seca quando as vacas em lactação foram alimentadas com uma mistura de óleos essenciais (750 mg / d; Crina Ruminantes. Trabalhando em uma dosagem maior de uma mistura de compostos de óxido de etileno (2 e 4 g / cabeça por dia) o mesmo autor em outro trabalho observou

aumento na ingestão de matéria seca de bovinos de corte alimentados com silagem (BENCHAAR et al., 2006b).

Para o efeito do tratamento com óleos essenciais sobre a produção de leite, Giannenas et al. (2011) trabalharam com 80 ovelhas em lactação suplementadas com óxido de etileno aos níveis de 50, 100, e 150 mg / kg e observaram significativamente ($P > 0.05$) o efeito do tratamento sobre a produção diária de leite, sendo significativa a inclusão de óleos essenciais, em dose-dependente, de maneira que a produção média de leite foi 1,565 L / d para controle versus 1,681, 1,876 e 2,119 L / d.

Já Tassoul e Shaver (2009) relataram nenhum efeito na produção de leite trabalhando com vacas no início de lactação, diferentemente de Kung et al. (2008) que observaram aumento de produção em vacas no meio de lactação.

Benchaa et al. (2006b), também não encontraram mudança na produção e composição do leite de vacas alimentadas com 2 g/vaca/dia de Crina Ruminants. Quanto à composição do leite, o mesmo autor, encontrou diferença na concentração de lactose do leite, que foi maior para as vacas suplementadas com o aditivo.

Estudos anteriores ainda sugeriram que os óleos essenciais poderiam alterar a fermentação ruminal (OH et al., 1967). A atividade microbiana, medida pela produção de gás durante incubações *in vitro*, foi inibida ou aumentada dependendo da natureza do óleo essencial adicionado (OH et al., 1967, 1968).

Em uma grande revisão de literatura sobre óleos essenciais Calsamiglia et al. (2007), compilando trabalhos *in vitro* e *in situ*, concluiu sobre os efeitos ruminais dos óleos essenciais que os mesmos inibem a desaminação e metanogênese resultando em menor $\text{NH}_3\text{-N}$, metano, e acetato e propicia concentrações mais elevadas de propionato e butirato. Entretanto as respostas são variáveis aos óleos essenciais, a combinação dos mesmos, e sua suplementação. Além disto o autor conclui que os efeitos de alguns destes óleos essenciais são dependentes do pH e dependentes da dieta.

Nagy e Tengerdy (1968) descobriram que a adição de óleos essenciais extraídos de Sagebush (um nome comum aplicado geralmente para lenhosas e herbáceas, várias espécies de plantas no gênero *Artemisia tridentata*) alterou a composição da população bacteriana durante 24 h de incubação *in vitro* em fluido ruminal. Fernandez et al. (1997) mostraram que um produto comercial de compostos de óleos essenciais misturados inibiu a degradação da proteína no rúmen, aumentando assim o aporte de proteína dietética para o trato digestório posterior ao rúmen.

Estudos *in vivo* evidenciaram que os óleos essenciais apresentaram efeitos sobre as concentrações de AGCC semelhantes à monensina, e promoveram aumento na concentração de propionato e leve queda na relação C2:C3 (CHAVES et al., 2008). Estudos observaram que óleos essenciais reduziram a produção de CH₄ entre 74% e 69%, efeito inclusive mais pronunciado do que o observado para a monensina (BUSQUET et al., 2005a). O mesmo grupo de pesquisadores verificou que estas substâncias aumentaram a proporção de propionato e reduziram a de acetato (BUSQUET et al., 2005b). Óleos essenciais podem ainda inibir a proteólise ou estimular a quebra de peptídeos, já que foi comprovada diminuição de 18% na concentração de peptídeos de cadeia longa devido à adição de 5 mg/L de uma mistura de óleos essenciais (CASTILLEJOS et al., 2006).

Quanto a ingestão de matéria seca e produção de leite, Tassoul e Shaver (2009) constataram que 1 g/d de mistura de óleos essenciais (Crina[®] Ruminants) reduziu em 7% a ingestão de matéria seca, com ausência de efeito sobre a produção de leite. A mistura de óleos essenciais Crina Ruminants, consiste de uma mistura incluindo óleo de timol, eugenol, vanilina, guaiacol e limoneno (Mcintosh et al., 2003; CASTILLEJOS et al., 2005).

Entretanto os trabalhos dispostos na literatura são altamente variáveis com a utilização de óleos essenciais. Por exemplo, conforme trabalho já mencionado, Tassoul e Shaver (2009) relataram nenhum efeito na produção de leite e depressão na ingestão de matéria seca, o mesmo produto que resultou no aumento da produção de leite no estudo de Kung et al. (2008).

Segundo Benchaar et al. (2009) esta variabilidade na resposta animal não é surpreendente e é resultado de uma série de fatores, incluindo a fonte do óleo essencial a composição da dieta utilizada, dosagens, condições experimentais e diversas outras.

3.8 QUITOSANA

Na mesma essência da necessidade de se modular a fermentação ruminal e as limitações da utilização de ionóforos, Goiri et al. (2009b) propuseram a utilização de quitosana, com resultados promissores. As propriedades antimicrobianas da quitosana foram inicialmente descritas por Allan e Hardwiger (1979). A quitosana (polímero N-

acetil-D-glicosamina) é um biopolímero natural derivado da desacetilação da quitina (GOIRI et al., 2009a). Sendo a quitina o biopolímero mais abundante da natureza após a celulose, é o polissacarídeo mundialmente distribuído como componente principal do exoesqueleto de crustáceos e insetos, assim como da parede celular de algumas bactérias e fungos (SENEL et al., 2004).

Por ser um biopolímero atóxico e biodegradável, a quitosana tem recebido muita atenção pelo grande potencial de aplicações na medicina e na preservação de alimentos, notadamente por sua propriedade antimicrobiana (SHAHIDI et al., 1999; JEON et al., 2002; SUDARSHAN et al., 1992; FANG et al., 1994). Ainda, segundo Assis e Silva (2003), a quitosana apresenta baixo custo por ser subproduto da indústria pesqueira.

Em uma ampla revisão de literatura Senel et al. (2004) descreveram determinadas aplicações da quitosana na medicina veterinária, com destaque para sua utilização como material para curativos e bandagens em geral, agente antimicrobiano, modelo de enxertos de pele, agente hemostático e veículo de liberação de drogas e vacinas na indústria farmacêutica.

Em um outro estudo Huang et al. (2005) observaram melhorias na eficiência alimentar em frangos suplementados com quitosana, a qual demonstrou resultados semelhantes aos grupos de animais recebendo Flavomicina como controle positivo. A quitosana atuou sobre a digestibilidade de nutrientes no íleo favorecendo o número de bactérias benéficas em detrimento às patogênicas.

No primeiro estudo reportado na literatura avaliando modificações na fermentação ruminal, Goiri et al. (2009a) avaliaram de diferentes especificações de quitosana em ensaios *in vitro*, utilizando como substrato a silagem de milho. Estes autores observaram que a utilização de quitosana reduziu a digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO) e a concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Em relação à proporção molar dos AGCC, foi observado redução de acetato e aumento na concentração de propionato.

De forma similar aos estudos *in vitro*, Goiri et al. (2010a) em um estudo *in vivo*, utilizando ovelhas não lactantes, canuladas no rúmen, recebendo uma dieta composta por 50% de feno de alfafa e 50% de concentrado, não observaram efeito da quitosana sobre o total de AGCC e a proporção molar de acetato, porém relataram aumento da proporção molar de propionato, com redução da relação acetato:propionato, da proporção molar de ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR) no rúmen, e da

concentração de N-NH₃. Não houve efeito da quitosana sobre o consumo e a digestibilidade da matéria orgânica, proteína bruta e extrato etéreo, porém, segundo os autores, houve uma tendência a redução da digestibilidade da fibra ($P=0,09$). Desta forma, foi observado que a quitosana altera a fermentação ruminal favorecendo o uso mais eficiente da energia.

A eficiência antimicrobiana da quitosana é bem documentada na literatura (MUZZARELLI et al., 1990; SHAHIDI et al., 1999; JEON et al., 2002). De acordo com Tang et al. (2010), esse polissacarídeo possui amplo espectro de ação com doses mínimas inibitórias contra ambas bactérias, gram-positivas e gram-negativas.

A atividade antimicrobiana da quitosana contra diversas bactérias e fungos é influenciada por diversos fatores como o tipo de quitosana, o grau de polimerização, peso molecular, tipo de bactéria e outras propriedades químicas e físicas (CHOI et al., 2001; NO et al., 2002; SENEL et al., 2004).

A literatura ainda é inconclusiva quanto à atividade da quitosana, a maioria dos trabalhos atuais tende a classificá-la como um bacteriostático, apesar de não elucidar seguramente os mecanismos de ação (COMA et al., 2002; POTARA et al., 2011; TAO et al., 2011).

Como mencionado a atividade antimicrobiana não é bem definido até o momento, mas várias hipóteses têm sido sugeridas. A hipótese mais provável é a mudança na permeabilidade celular devido às interações entre a quitosana policatiónica e as cargas eletronegativas na superfície da célula. A quitosana interage com a superfície lipopolissacarídea (LPS) das bactérias gram negativas e da mesma forma com a fração peptideoglicana das bactérias gram positivas, ambas aniônicas. Entretanto, determinados estudos apontam que bactérias gram positivas são mais susceptíveis do que as bactérias gram negativas (WANG, 1992; NO et al., 2002; SENEL et al., 2004; KUMAR et al., 2005).

Raafat et al. (2009) avaliaram o mecanismo de ação da quitosana como antimicrobiano e concluíram que a ligação da quitosana aos polímeros da parede celular bacteriana causaram efeitos secundários celulares por desestabilização e posterior interrupção da membrana.

Ghaouth (1992) descreveu que o mecanismo antifúngico da quitosana envolve a alteração da morfogenia da parede celular com a presença das moléculas de quitosana interferindo diretamente no crescimento de fungos, similarmente aos efeitos observados em células bacterianas. Porém, os estudos a respeito da atuação da quitosana são

recentes e devem ainda gerar maior número de resultados a fim de identificar todos os fatores envolvidos com sua atividade antimicrobiana.

Goiri et al. (2009a) propôs a utilização de quitosana como modulador da fermentação ruminal e do processo digestivo. Em estudos mais recentes tentando apresentar as possíveis respostas da utilização da quitosana em ruminantes, Araújo (2011), trabalhando com novilhos Nelore canulados no rúmen, não observou diferença no consumo de matéria seca com a inclusão de concentrações crescentes de quitosana nas dietas (0, 50, 100 e 150 mg/kg de PV). A digestibilidade da MS e da MO apresentaram resposta linear crescente. Já a digestibilidade do Extrato etéreo (EE) e dos carboidratos totais não apresentaram diferenças significativas. Com relação aos parâmetros ruminais, o pH ruminal não apresentou diferença entre as dietas experimentais, porém foi observado efeito quadrático para a concentração de amônia, com redução para a dose de 150 mg/kg. Não houve alteração da produção de proteína microbiana ruminal, nem na concentração total de AGCC, assim como reportaram Goiri et al. (2010a). Também, segundo Araújo (2011), foi observado redução da proporção molar de acetato, com aumento da proporção de propionato, indicando que o uso da quitosana altera a fermentação ruminal, priorizando rotas energeticamente mais eficientes.

Mingoti (2013) avaliou diferentes concentrações de quitosana nas dietas de vacas em lactação, com a inclusão de 0, 50, 100 e 150 mg/kg de peso corporal de quitosana. O autor observou efeito quadrático das dietas experimentais sobre a digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta e fibra em detergente neutro e melhora eficiência de utilização de energia e nitrogênio, mencionando a melhora na digestibilidade aparente total da matéria seca e nutrientes, assim como também a eficiência de utilização de nitrogênio com a utilização da quitosana.

Del Valle (2014) em estudo com 24 vacas, também da raça holandesa, para estes receberem uma das quatro dietas experimentais, obtidas pela combinação dos fatores quitosana (aproximadamente 150 mg/kg de peso corporal) e óleo de soja (3,3% da MS da dieta) ao avaliar parâmetros similares aos do estudo de Mingoti (2013) conclui que a utilização de quitosana em dietas com baixos níveis de extrato etéreo é uma estratégia eficiente para aumentar a eficiência de produção de vacas leiteiras no terço médio de lactação, observando melhoria na digestibilidade das dietas e melhoria na eficiência de produção de leite.

Assim, nos estudos com a quitosana a fim de se modular a fermentação ruminal e propiciar uma melhora no desempenho produtivo, digestão e metabolismo de vacas em lactação, os resultados com este biopolímero natural derivado da deacetilação da quitina são promissores, e vem de encontro este ser uma possível alternativa natural em relação à monensina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL E ANIMAIS

O experimento foram conduzidos no Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), em Pirassununga, no período de 08 de janeiro de 2014 a 01 de abril de 2014.

O clima da região é tropical, com temperatura média durante o experimento de 25° C. As temperaturas médias máximas e médias mínimas médias foram de 33,04 e 18,07° C, respectivamente. A localização geográfica do LPBL é 21° 57' 28" de latitude sul, 47° 27' 21" de longitude oeste e altitude de 635 metros.

Neste experimento foram utilizadas 24 vacas da raça Holandesa, com média de produção de leite de $31,44 \pm 4,83$ kg, peso corporal médio de $586,07 \pm 79,63$ kg e com média de dias em lactação de $175,89 \pm 99,74$ dias de lactação no início do fornecimento das dietas experimentais. Destes animais, oito vacas passaram por ruminostomia, para avaliação da fermentação ruminal. Os animais foram alojados em estábulo tipo “free-stall” em baias individuais de 17,5m² de área com camas de areia e ventilação forçada, sendo ordenhados mecanicamente duas vezes ao dia, as 6h00 e as 15h30.

4.2 DELINEAMENTO E DIETAS EXPERIMENTAIS

Neste experimento os animais foram distribuídos em seis quadrados latinos (QL) 4x4, contemporâneos e balanceados, sendo dois QL compostos por vacas canuladas no rúmen (8 vacas) e 4 QL de vacas não canuladas (16 vacas). A produção de leite, dias em lactação e PV ao início do experimento foram utilizados para alocar os animais aos quadrados, buscando reduzir a variabilidade dentro de cada Quadrado Latino.

Para as variáveis ruminais foram utilizadas apenas as vacas canuladas no rúmen, as quais foram alocadas em um mesmo grupo. O experimento foi constituído por quatro períodos, com duração de 21 dias cada um, sendo os 14 primeiros de adaptação às dietas e os demais para avaliar as variáveis mensuradas. As dietas foram formuladas de forma

a atenderem as exigências nutricionais de vacas em lactação com aproximadamente 600 kg de peso corporal, com produção diária de leite de 32,0 kg e com 3,5% de gordura, conforme recomendações do NRC (2001).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente para receber as seguintes dietas experimentais: 1) Controle (CT), composta por dieta basal sem a inclusão de aditivos; 2) Crina (CRI) (Crina[®] Ruminants, DSM-TORTUGA Nutritional Products), produto composto por uma mistura de óleos essenciais, sendo utilizado 1 g/vaca/dia; 3) Quitosana (QUI), com inclusão de quitosana na dose de 150 mg/kg de peso vivo; 4) (MON) (Monensina DSM-TORTUGA), com inclusão de monensina na dose 24 mg/kg de matéria seca. As doses diárias de monensina, óleos essenciais e quitosana foram adicionados ao concentrado, diariamente, e fornecidos na alimentação da manhã e da tarde. Água e as dietas experimentais foram fornecidas “*ad libitum*” aos animais durante todo período experimental. O volumoso utilizado durante o experimento foi a silagem de milho e a proporção volumoso:concentrado utilizada foi de 50:50.

A quitosana utilizada em todo o experimento apresenta as seguintes especificações técnicas: densidade aparente 0,64 g/ml, cinzas totais 2,0% máximo, pH 7,0-9,0, viscosidade <200 cPs e grau de desacetilação 95%.

Os demais aditivos, tanto a monensina quanto a crina, foram utilizados produtos comerciais da empresa DSM-TORTUGA (Crina[®] Ruminants).

4.3 CONSUMO DE MATÉRIA SECA E NUTRIENTES

As dietas foram oferecidas aos animais duas vezes ao dia, as 7:00 e as 13:00 horas, de acordo com o consumo de matéria seca do dia anterior, de forma a ser mantido um percentual de sobras das dietas até 10% do fornecido, não havendo limitação de consumo. Os alimentos foram misturados no cocho e fornecidos na forma de dieta completa. Diariamente foram feitas pesagens das quantidades dos volumosos e concentrados fornecidos e das sobras de cada tratamento, para estimativa do consumo individual. No período da manhã, amostras das sobras de cada animal e ingredientes da dieta fornecida eram coletadas durante todo o período de avaliação de consumo, obtendo uma amostra composta dos diferentes dias, que após coletadas eram armazenadas a -20° C.

As análises químico-bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Bromatologia localizado nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite - FMVZ - USP. A proporção dos ingredientes na dieta, assim como a respectiva composição bromatológica do concentrado, das dietas e dos alimentos encontram-se nas tabelas 1, 2 e 3.

Amostras de alimentos e sobras foram analisadas quanto aos teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE), proteína bruta (PB), proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN), proteína insolúvel em detergente ácido (PIDA) e lignina de acordo com as metodologias descritas pela AOAC (1990).

O teor de proteína bruta (PB) foi obtido pela multiplicação do teor de nitrogênio total por 6,25. Os teores de carboidratos não-fibrosos (CNF) foram estimados segundo Hall (2000) onde: $CNF = 100 - [(\%PB + \%EE + \%MM + \%FDN)]$.

Os nutrientes digestíveis totais foram calculados conforme equações de Weiss et al. (1999), descritas no NRC (2001), em que: $NDT = CNF_d + PB_d + (AG_d * 2,25) + FDN_d - 7$, onde PB_d , CNF_d , FDN_d e AG_d representam o total destes nutrientes digestíveis. Os teores de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente neutro livre de cinza e proteína (FDN_{cp}), e fibra detergente ácido (FDA) foram obtidos conforme método descrito por Van Soest et al. (1991), utilizando-se α -amilase e sem adição de sulfito de sódio na determinação do FDN, em Sistema Ankon®. O teor de energia líquida foi estimado através da equação estabelecida pelo NRC(2001), em que $EL (Mcal/kg) = 0,0245 * NDT (\%) - 0,12$.

Tabela 01 - Composição químico-bromatológica dos alimentos utilizados

Nutrientes ¹	Ingredientes			
	Farelo de soja	Milho fubá	Grão de soja	Silagem de milho
Matéria seca (%MN)	90,65	88,08	90,65	26,63
Matéria orgânica (%MS)	93,11	98,06	94,10	95,44
Proteína bruta (%MS)	50,47	11,33	39,60	8,10
PIDN (%MS)	0,80	1,45	2,30	2,51
PIDA (%MS)	0,50	1,00	0,60	1,34
Extrato etéreo (%MS)	1,90	3,06	17,05	5,27
CNF (%MS)	25,21	69,21	19,42	28,14
FDN (%MS)	15,52	14,46	19,50	53,61
FDA (%MS)	9,57	4,04	13,10	34,13
Lignina (%MS)	1,57	1,78	1,20	5,90
FDAi (%MS)	4,94	1,08	5,18	11,18
Cinzas(%MS)	6,89	1,94	5,90	4,56
NDT ²	79,20	85,18	96,66	66,66
EL _L (Mcal/kg MS)	1,82	1,97	2,25	1,51

¹MN = matéria natural; MS= matéria seca; ² Nutrientes digestíveis totais, estimado pelas equações do NRC (2001).

Tabela 02 - Proporção dos ingredientes no concentrado e na dieta (%MS)

Ingredientes (%MS)	Concentrado	Dieta
Silagem de Milho	-	50,0
Farelo de soja	27,42	13,71
Milho moído	55,79	27,90
Grão de soja	11,88	5,94
Uréia	0,31	0,16
Calcáreo	0,39	0,20
Mistura Mineral ¹	3,83	1,92
Sal comum	0,28	0,14

¹ Composição por quilograma de produto: cálcio-160g, fósforo-31g, enxofre-16g, magnésio-38g, cobre-380mg, zinco-2160mg, manganês-1070mg, cobalto-11mg, iodo-44mg, selênio-14mg, ferro-750mg, vitamina A-300000UI, vitamina D3-30000UI, vitamina E-925UI.

Tabela 03 - Composição químico-bromatológica do concentrado e da dieta

Nutrientes ¹	Concentrado	Dieta
Matéria seca (%MN)	89,37	58,00
Matéria orgânica (%MS)	91,51	93,47
Proteína bruta (%MS)	26,43	17,26
PIDN (%MS)	1,30	1,90
PIDA (%MS)	0,76	1,05
Extrato etéreo (%MS)	4,26	4,77
CNF (%MS)	46,82	37,64
FDN (%MS)	14,62	34,12
FDA (%MS)	6,46	20,29
Lignina (%MS)	1,56	3,73
FDAi (%MS)	2,59	6,89
Cinzas(%MS)	8,49	6,53
NDT ²	80,72	73,69
EL _L (Mcal/kg MS)	1,86	1,69

¹ MN = matéria natural; MS= matéria seca; ² Nutrientes digestíveis totais, estimado pelas equações do NRC (2001).

4.4 DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL

Para estimativa da digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes, 8 amostras de fezes foram coletadas a cada 9 horas por 3 dias consecutivos de cada período experimental (sendo no 16º dia coletadas as 6:00, 15:00 e 24:00, 17º dia as 9:00 e as 18:00, e 18º dia 3:00, 12:00 e 21:00) o que representa coletas a cada 3 horas de um período de 24 horas (1 dia), para tentar corrigir possíveis variações de excreção. Cada amostra obtida nos oito tempos foi homogeneizada e pesada a fim de obter uma amostra composta por animal em cada período.

As amostras compostas de fezes foram pré-secas em estufa com ventilação forçada (60°C/72 horas) e processadas em moinho de facas com peneiras de porosidade 1 mm e 2 mm. Posteriormente estas amostras (1mm) foram analisadas quanto a MS, MO, PB, EE, MM, FDA, Lignina e FDN, de acordo com a metodologia anteriormente descrita para análise de alimentos.

A excreção total de fezes de cada animal foi estimada a partir da concentração do indicador interno fibra em detergente ácido indigestível (FDAi). Para obtenção do teor de FDA_i nas amostras (2mm), utilizou-se 4 repetições de cada amostra pré-seca, de alimentos, sobras e fezes, as quais foram acondicionadas em sacos de tecido não-tecido (TNT 100g/m²), com dimensões de 4 x 5 cm, segundo a relação de 20 mg de matéria seca por centímetro quadrado de superfície (Nocek, 1988).

As amostras foram incubadas por 288 horas no rúmen de duas vacas da raça Holandesas, previamente adaptadas com concentrado a base de farelo de soja e milho moído e volumoso a base de silagem de milho, de acordo com a metodologia adaptada de Casali et al. (2008). Após a retirada do rúmen os sacos foram lavados com água corrente. Posteriormente, os sacos foram submetidos ao tratamento com detergente ácido (MERTENS, 2002) por uma hora, em equipamento analisador de fibra Ankon[®]. Após este período foram lavados com água quente e acetona e secos em estufa não ventilada (105°C/45 minutos), sendo retirados, acondicionados em dessecador (20 sacos/dessecador), e pesados obtendo-se ao final deste processo, a concentração de FDAi.

4.5 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

Os animais foram ordenhados mecanicamente duas vezes ao dia, às 6h00 e às 16h00, sendo a produção de leite (PL) registrada diariamente durante todo o período experimental e a produção média considerada apenas dos últimos sete dias de cada período. A produção de leite foi corrigida para 3,5% de gordura (PLC) segundo fórmula de Sklan et al. (1994), onde $PLC = (0,432 + 0,163 * G\%) * PL$.

As amostras utilizadas para análise da composição do leite foram obtidas no 15º, 16º e 17º dias de cada período experimental, na qual cada amostra proveniente das duas

ordenhas diárias, com amostragens proporcionais a produção de cada período, determinando os teores de gordura, proteína e lactose.

Os teores de proteína bruta, gordura e lactose Foram analisadas por metodologia de infravermelho, em equipamento previamente calibrado para os parâmetros de interesse (LACTOSCAN®).

4.6 FERMENTAÇÃO RUMINAL

Com a finalidade da avaliação dos parâmetros de fermentação ruminal, amostras de líquido ruminal foram coletadas no 21º dia de cada período experimental das vacas canuladas no rúmen, nos tempos zero, duas, quatro, seis, oito, dez e doze horas após a alimentação da manhã. Logo após a coleta foi determinado o pH do líquido ruminal, com a utilização de pHmetro As amostras foram armazenadas a -20°C e posteriormente processadas para as demais análises. Para análise de AGCC, as amostras foram homogenizadas, colocadas em um tubo de ensaio, centrifugadas a 2.000 x g por 15 minutos, deste, 800 µL do sobrenadante foi colocado em tubo de microcentrífuga, e adicionando-se 200 µL de ácido fórmico P.A., identificado e armazenado a -20°C para determinação de AGCC no Laboratório de Fermentabilidade Ruminal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP)..

A metodologia utilizada para análise de AGCC foi a preconizada por Erwin et al. (1961), sendo utilizado cromatógrafo a gás (Modelo 9001 Gás Chromatograph, Marca Finnigan) equipado com coluna de vidro Capilar – Stabilwax de 30m de comprimento e 0.53mm de diâmetro interno. Os gases utilizados foram o Hélio como gás de arraste na vazão de 8,01 mL/minuto, ar sintético como gás comburente na vazão de 40 kPa, e hidrogênio como gás combustível na vazão de 60 kPa. A temperatura de operação utilizadas do injetor e do detector de ionização de chamas foram de 250°C e da coluna de separação de 145°C.

Soluções padrão a 0,1 Normal de ácido acético, propiônico e butírico foram preparadas e padronizadas com hidróxido de potássio (KOH) 0,1 Normal foram utilizadas a fim de produzir solução padrão de AGCC de concentração conhecida. As determinações foram realizadas injetando-se 1 µL de amostra em cromatógrafo

integrado a computador, que processava os cálculos de quantificação, utilizando-se do software GCsolution Shimadzu.

4.7 BALANÇO DE ENERGIA

Para se obter o consumo de energia bruta e realização do cálculo da eficiência do uso de energia consumida, as amostras de silagem, ingredientes foram analisadas quanto ao seu teor de energia bruta em bomba calorimétrica, de acordo com Havartine e Allen (2006). O consumo de energia digestível (CED) foi obtido por meio do produto dos coeficientes de digestibilidade da matéria seca observados e dos consumos de energia bruta, de acordo com a energia nos ingredientes da dieta (Havartine; Allen, 2006).

O consumo de energia líquida (CELI) foi calculado a partir dos teores de energia líquida nos alimentos e nas sobras, obtidos a partir da equação do NRC (2001). A energia líquida de lactação foi estimada a partir da seguinte equação do NRC (2001): $EL_L \text{ (Mcal/dia)} = \text{produção de leite (kg)} \times (0,0929 \times G\% + 0,0547 \times P\% + 0,0395 \times L\%)$, onde: G% é teor de gordura no leite; P% é o teor de proteína do leite e L% é o teor de lactose. A energia líquida de manutenção foi estimada, de acordo com o NRC (2001), como $EL_M = 0,08 \times PV^{0,75}$ e o balanço de energia (BE) obtido pela diferença entre o CELI e $EL_L + EL_M$.

A eficiência de utilização de energia foi calculada de através da relação da EL_L e o CED e através da razão entre a soma da EL_L e EL_M e o CED.

4.8 BALANÇO DE NITROGÊNIO

Para o cálculo de balanço de nitrogênio 8 amostras de urina foram coletadas, por meio de micção estimulada por massagem, a cada 9 horas por 3 dias consecutivos de cada período experimental (sendo no 16º dia coletadas as 6:00, 15:00 e 24:00, 17º dia as 9:00 e as 18:00, e 18º dia 3:00, 12:00 e 21:00) o que representa coletas a cada 3 horas de um período de 24 horas (1 dia). De forma a corrigir possíveis variações de excreção creatinina ao longo do dia.

Cada amostra, de cada tempo foi filtrada e separada um alíquota de 20 mL no qual foi diluída imediatamente em 80 mL de ácido sulfúrico a 0,036 N. Posteriormente esta amostra diluída em ácido foi homogeneizada e armazenada em um recipiente único a -20°C, posteriormente acrescentando cada amostra dos oito tempos de coleta, a fim de obter uma amostra composta no final de cada período experimental, sendo armazenada para determinação dos compostos nitrogenados totais, de ureia e creatinina.

As concentrações de creatinina foram determinadas por meio de kits comerciais (Bioclin[®]), utilizando reação enzimática colorimétrica cinética em aparelho SBA-200 CELM[®]. Para a realização dessa análise, 0,5 mL de amostra composta de urina foram diluídos em 4,5 mL de água deionizada.

O volume urinário total diário foi estimado pela multiplicação da excreção média de creatinina com o peso vivo do animal, dividindo esta multiplicação pela concentração de creatinina da amostra pontual de urina de cada animal, segundo Oliveira et al. (2001).

A excreção urinária diária de creatinina foi estimada a partir da excreção média diária de 24,05 mg/kg de peso vivo para vacas leiteiras (CHIZZOTTI, 2004). Dessa forma, com a excreção média diária de creatinina e a concentração de creatinina (mg/dL) na amostra única de urina, foi estimado o volume total diário de urina, em litros por vaca/dia, para o cálculo do balanço de nitrogênio.

O consumo de nitrogênio foi determinado pela subtração do valor de conversão de nitrogênio total das amostras para obtenção do valor de proteína bruta (6,25), obtendo-se a quantidade em gramas de nitrogênio consumida. O mesmo cálculo foi realizado com os valores de proteína bruta das fezes obtendo-se a excreção total de nitrogênio em g/kg MS.

O nitrogênio total das amostras de urina foram determinados de acordo com as metodologias descritas pela AOAC (1990). Para as amostras de leite, o teor de nitrogênio foi obtido através do teor de proteína bruta da amostra, determinado com o LACTOSCAN[®], aplicando o fator 6,38 (NRC, 2001).

O balanço de nitrogênio foi obtido pela diferença entre o nitrogênio total consumido e a excreção de nitrogênio nas fezes, na urina e no leite. Assim, obteve-se nitrogênio retido em gramas e em porcentagem de nitrogênio total consumido.

4.9 PARÂMETROS SANGUÍNEOS

As coletas de sangue foram realizadas no 17º dia de cada período experimental por punção da veia e/ou artéria coccígea, quatro horas posteriores ao fornecimento das dietas no período da manhã. As amostras foram coletadas em tubos com vácuo (vacutainer) de 10 mL para dosagem séricas de glicose, colesterol total, colesterol-HDL, proteínas totais, albumina, ureia, triglicerídeos, creatinina e as enzimas aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamil transferase (GGT).

Imediatamente após coleta as amostras foram refrigeradas e centrifugadas a 2000 x g durante 15 minutos, para a separação do soro ou plasma. O centrifugado obtido foi transferido para tubetes plásticos, identificados e armazenados a -20°C, até o procedimento das análises laboratoriais.

As concentrações de colesterol LDL e colesterol VLDL foram determinadas indiretamente por meio de fórmulas, onde: colesterol VLDL (mg/dl) = (concentração de triglicérides/5); e colesterol LDL (mg/dl) = colesterol total – (colesterol HDL + colesterol VLDL) (FRIEDEWALD et al., 1972).

As análises das concentrações dos parâmetros sanguíneos foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP, por meio de kits comerciais (Bioclin[®]) que utilizam método enzimático colorimétrico, sendo a leitura realizada em analisador automático de bioquímica sanguínea (Sistema de Bioquímica Automático SBA-200 CELM[®]).

4.10 AVALIAÇÃO DO PESO E ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL

No sétimo dia de adaptação e no final de cada período experimental, o escore de condição corporal (ECC) e o peso corporal foram avaliados, para avaliação da variação de peso e do ECC. O peso dos animais foi mensurado antes do fornecimento das alimentações e logo após a ordenha do período da manhã. Para o cálculo da variação de peso corporal, foram considerados os pesos do sétimo dia de adaptação e do final de cada período experimental. As mensurações do ECC foram realizadas segundo metodologia proposta por Edmonson et al. (1989) e Ferguson et al. (1994).

4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados que apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise de variância pelo PROC MIXED do (Statistical Analysis System for Windows 9.3 - SAS - SAS Institute Inc., Cary, EUA), de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_k + P_i + Q_j + A_l(Q_j) + e_{ijkl}$$

Em que: Y_{ijk} é o valor observado no animal l , pertencente ao quadrado j , no i -ésimo período, recebendo o k -ésimo tratamento; μ = média geral; T_k = efeito de tratamento (3GL); P_i = Efeito fixo de período (3GL); Q_j = efeito fixo de quadrado (5GL); $A_l(Q_j)$ = efeito aleatório de animal dentro do quadrado (18GL) e e_{ijkl} = erro experimental da parcela (66GL).

Os dados foram submetidos à análise de variância a 5% de significância, utilizando-se o PROC MIXED do SAS (Version 9.3, SAS Institute, Cary, NC 2010), e quando detectadas diferenças entre as médias, essas foram comparadas pelo teste de Tukey.

As variáveis avaliadas na fermentação ruminal (pH, Acétato, Propionato, Butírate AGCR e AGCC) foram analisadas como medidas repetidas no tempo, no PROC MIXED do SAS 9.0, de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_k + P_i + Q_j + A_l(Q_j) + e_{ijkl} + Te_m + Te_m^* T_k + e_{ijklm}$$

Em que: Y_{ijk} é o valor observado no animal l , pertencente ao quadrado j , no i -ésimo período, recebendo o k -ésimo tratamento; μ = média geral; T_k = efeito de tratamento (3GL); P_i = Efeito fixo de período (3GL); Q_j = efeito fixo de quadrado (1GL); $A_l(Q_j)$ = efeito aleatório de animal dentro do quadrado (6GL) e e_{ijkl} = erro experimental da parcela (18GL); Te_m = efeito de tempo (6GL); $Te_m^* T_k$ = interação entre tempo e tratamento (18GL); e_{ijklm} = erro experimental da subparcela (168GL).

A metodologia de Akaike foi utilizada para determinar a matriz de covariância a ser utilizada. A significância foi considerada ao nível de 0,05.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONSUMO E DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL

Os resultados de consumo da matéria seca e de nutrientes e digestibilidade aparente total da matéria seca e de nutrientes em função das dietas experimentais estão apresentados na tabela 04 e 05, respectivamente.

Não foram observadas diferenças ($P < 0,05$) para consumo de matéria seca e nutriente entre os tratamentos.

Mingoti (2013) trabalhando com doses de inclusão de quitosana na dieta de vacas em lactação similarmente não observou efeito ($P > 0,05$) para o consumo em kg/dia de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo, fibra detergente neutro, carboidratos não fibrosos e nutrientes digestíveis totais.

Goiri et al. (2010a) trabalharam com ovinos e a inclusão de quitosana na dieta também não alterou o consumo dos animais.

Tabela 04 - Consumo de matéria seca e de nutrientes em função das dietas experimentais

Variável	Dietas ¹				Média	EPM	P ²
	CT	CRI	QUI	MON			
Consumo (kg/dia)							
Matéria Seca	22,44	23,10	22,77	22,56	22,72	0,418	0,257
Matéria Orgânica	20,94	21,53	21,23	21,04	21,18	0,390	0,287
Proteína Bruta	4,14	4,25	4,18	4,15	4,18	0,077	0,246
FDN	6,97	7,12	7,07	7,00	7,04	0,146	0,655
Extrato Etéreo	1,09	1,12	1,10	1,09	1,10	0,021	0,256
CNF	8,78	9,08	8,92	8,83	8,91	0,166	0,132
NDT	16,92	17,41	17,12	16,99	17,11	0,312	0,237
Consumo relativo ao peso (kg/100kg)							
Matéria Seca	3,85	3,95	3,90	3,85	3,89	0,065	0,288
FDN	1,19	1,22	1,21	1,19	1,20	0,023	0,580

¹CT: Controle; CRI: Crina® Ruminants (DSM Nutritional Products Crina) QUI: Quitosana; MON: Monensina (Monensina DSM-TORTUGA); ²Probabilidade. Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferenciam em 5% no Teste de Tukey ajustado pelo PROC MIXED

Entretanto, Del Valle (2014) trabalhando com vacas da raça Holandesa observou que o uso da quitosana levou a redução do consumo de matéria seca e de nutrientes ($P < 0,05$). A redução média observada com a inclusão de foi de 6,0%, ou seja, 1,34 kg de matéria seca.

O consumo de matéria seca de animais suplementados com Crina[®] Ruminants, em trabalhos em literatura também são variados. Similar aos resultados obtidos neste experimento Benchaar et al. (2007b) observaram nenhuma alteração no consumo de matéria seca quando as vacas em lactação foram alimentadas com uma mistura de óleos essenciais (750 mg / d; Crina Ruminantes). Em uma dosagem maior (2 e 4 g / cabeça por dia) de uma mistura de compostos de óxido de etileno o mesmo autor em outro trabalho observou aumento na ingestão de matéria seca de bovinos de corte alimentados com silagem (BENCHAAR et al., 2006a).

Resultados variáveis também tem sido observados para o consumo de matéria seca e de nutrientes com a utilização de monensina. Segundo Sauer et al. (1989) adição de monensina diminuiu a ingestão de matéria seca, Symanowski et al. (1999) utilizaram monensina na concentração de 0, 8, 16 e 24 mg/kg de matéria seca e observaram redução de consumo nos dois últimos níveis avaliados. Estes resultados diferem do presente trabalho, pois a dose utilizada foi a de 24mg/kg de matéria seca e não foi observada redução no consumo. De forma similar McClary et al. (2005) avaliaram diferentes doses de monensina (0, 7, 15 e 22 mg/kg ms) para vacas leiteiras e observaram que nos dois últimos níveis de utilização, houve redução de consumo.

No entanto, diferindo desses autores e similar a esse experimento a adição de monensina não influenciaram a ingestão de matéria seca segundo Broderick (2004). Martineau et al. (2007), que avaliaram vacas no terço médio de lactação com dose de 24 mg/kg ms de monensina, similar a nosso estudo e não encontraram diferenças no consumo quando compararam estes animais com o grupo controle. Outros autores, como Ramanzin et al. (1997) e Petersson-Wolfe et al. (2007), utilizando doses de 22 e 15 mg/kg ms de monensina, respectivamente, obtiveram resultados semelhantes.

Tedeschi et al. (2003) menciona que a variabilidade entre os estudos é provavelmente devido a diferenças na fase de lactação. A redução de consumo de matéria seca observada em outros trabalhos com a utilização de monensina é uma consequência da exigência de energia na fase do animal. Ou seja, quando as vacas estão em saldo positivo de energia (final da lactação ou vacas secas), a suplementação da dieta com monensina pode aumentar o saldo de energia disponível por unidade de ração consumida (Mcal / d), resultando em menor consumo de matéria seca. Os animais deste experimento não estavam em final de lactação ou secos, o que pode justificar a não influencia da adição deste aditivo ou de outros aditivos no consumo destes animais.

Tabela 05 - Digestibilidade da matéria seca e de nutrientes em função das dietas experimentais

Variável	Dietas ¹				Média	EPM	P ²
	CT	CRI	QUI	MON			
Coeficientes de digestibilidade aparente total (%)							
Matéria seca	63,62 ^{ab}	62,68 ^b	66,86 ^a	64,14 ^{ab}	64,33	0,630	0,009
Matéria orgânica	65,76 ^{ab}	64,78 ^b	69,05 ^a	66,15 ^{ab}	66,44	0,662	0,014
FDN	42,58	38,80	44,23	41,40	41,75	1,175	0,152
Proteína Bruta	66,97 ^{ab}	64,79 ^b	69,91 ^a	68,46 ^a	67,65	0,687	0,001
Extrato etéreo	70,72	69,79	73,79	70,32	71,18	0,862	0,100

¹CT: Controle; CRI: Crina® Ruminants (DSM Nutritional Products Crina) QUI: Quitosana; MON: Monensina (Monensina DSM-TORTUGA); ²Probabilidade. Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferenciam em 5% no Teste de Tukey ajustado pelo PROC MIXED

Para digestibilidade de matéria seca, e matéria orgânica foram observadas diferenças (P<0,05), de forma que os animais suplementados com quitosana apresentaram digestibilidade maior quando comparados aos suplementados com Crina. Para digestibilidade de FDN e digestibilidade do extrato etéreo não foram observadas diferenças (P<0,05) para nenhum dos tratamentos. Quanto à digestibilidade da proteína bruta, os resultados da dieta CT, CRI, QUI e MON foram respectivamente: 66,97; 64,79; 69,91 e 68,46, sendo estatisticamente menor a dieta CRI em relação à inclusão dos demais aditivos.

É notada assim a influencia da adição de alguns aditivos na digestibilidade destes animais, com maior benefício quando ocorrida a inclusão de quitosana em comparação a crina. Este resultado é similar aos trabalhos observados na literatura, o

potencial efeito da quitosana em modular a fermentação ruminal e modificar a população microbiana no rúmen podem justificar os resultados obtidos.

Del Valle (2014) em quatro dietas experimentais, obtidas pela combinação dos fatores quitosana (aproximadamente 150 mg/kg de peso corporal) e óleo de soja (3,3% da MS da dieta). Independentemente da inclusão de óleo, a quitosana aumentou ($P<0,05$) a digestibilidade da MS, MO e PB. Resultados similares a este são observados por Araújo (2011) e Mingoti (2013).

Mingoti (2013) avaliando os efeitos de diferentes concentrações de quitosana nas dietas de vacas em lactação sobre o consumo e digestibilidade aparente total da matéria seca e nutrientes, relatou um efeito quadrático das doses crescentes de quitosana sobre os coeficientes de digestibilidade da MS, MO e FDN. As médias observadas foram de 672,2 e 692,5; 679,9 e 700,6; 564,4 e 588,4 g/kg para a inclusão de 0 e 150 mg de quitosana por quilograma de peso vivo, respectivamente.

Em novilhos nelore canulados no rúmen Araújo (2011) investigou diferentes concentrações de quitosana na dieta sobre a digestibilidade aparente total da matéria seca e nutrientes e observou resposta linear às crescentes doses de quitosana nos coeficientes de digestibilidade da MS, MO, PB e FDN.

Trabalhando com outras espécies Huang et al. (2005), relatam aumento da digestibilidade ileal de nutrientes em frangos de corte, e a associam a melhoria de desempenho.

O efeito positivo da quitosana sobre a digestibilidade aparente da matéria seca e nutrientes intensifica e justifica seu uso como aditivo na alimentação de ruminantes. O aumento da digestibilidade pela inclusão de quitosana nas dietas, sem alteração no consumo, a princípio indicam maior absorção de nutrientes, a qual não se refletiu em desempenho produtivo Segundo Del Valle (2014) em virtude de uma menor eficiência, provavelmente decorrente de alteração no metabolismo intermediário de nutrientes

Goiri et al. (2009c), comparando a digestibilidade *in vitro* da monensina com o uso da quitosana, verificou que a quitosana é semelhante à monensina em diminuir a digestibilidade da matéria orgânica. Em nosso estudo, a inclusão de monensina foi semelhante quanto a digestibilidade da matéria seca e de nutrientes quando comparada a dieta com quitosana, entretanto não diferindo da dieta controle, mas da dieta com inclusão de óleos essenciais (Crina).

Quanto a utilização de óleos essenciais Benchaar et al. (2006a), obtiveram resultados semelhantes a nosso trabalho em comparação a dieta controle e a

Digestibilidade aparente de MS, PB, FDN não foram influenciados em vacas suplementadas com 2 g / dia de Crina ruminants.

Em estudo similar Castillejos et al. (2005), trabalhando em um estudo *in vitro* não observaram mudanças na digestibilidade de MS, MO, FDN e digestibilidade da PB, quando uma mistura de Crina Ruminants foi adicionada na dose de 3,8 mg / L.

Os nossos e estes resultados citados sugerem que os efeitos da compostos de óleos essenciais na dose utilizada podem não atuar de forma positiva sobre a atividade microbiana ruminal, não alterando digestibilidade da matéria seca e de nutrientes, entretanto os resultados podem variar dependendo da dose e do tipo de composto essencial utilizado.

5.2 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

Os resultados referentes produção e composição do leite, de acordo com as dietas experimentais, são demonstradas na tabela 06.

Não foram observadas diferenças ($P < 0,05$) para produção de leite, produção de leite corrigida para 3,5% de gordura, gordura, proteína e lactose (kg/dia e porcentagem) entre os tratamentos.

São escassos os estudos comparando diferentes aditivos na alimentação de vacas de leite, a maioria dos trabalhos, comparam a utilização ou não dos aditivos, ou a sua utilização com diferentes dietas base, entretanto a comparação entre diferentes alternativas de aditivos ainda é bem escassa na literatura.

Quanto a utilização de monensina Duffield et al. (2008b), em estudo metanalítico, observaram que a inclusão de monensina na dieta de vacas leiteiras tem potencial para aumentar a produção de leite em 0,70 kg/dia, quando comparadas a dietas sem adição de monensina, aumentando também a eficiência de produção de leite em 2,5%.

Tabela 06 - Produção e composição do leite em função das dietas experimentais

Variável	Dietas ¹				Média	EPM	P ²
	CT	CRI	QUI	MON			
Produção de Leite	31,46	31,59	31,02	30,99	31,27	0,627	0,593
PLC (Kg/d) ³	33,07	32,81	32,43	32,07	32,59	0,621	0,329
Gordura (%)	3,86	3,76	3,85	3,75	3,80	0,075	0,331
Gordura (kg)	1,19	1,18	1,15	1,14	1,17	0,026	0,147
Proteína (%)	3,05	3,05	3,06	3,04	3,05	0,017	0,132
Proteína (kg)	0,96	0,96	0,94	0,94	0,95	0,018	0,538
Lactose (%)	4,57	4,57	4,58	4,54	4,56	0,024	0,132
Lactose (kg)	1,42	1,44	1,41	1,41	1,42	0,027	0,660

¹CT: Controle; CRI: Crina® Ruminants (DSM Nutritional Products Crina) QUI: Quitosana; MON: Monensina (Monensina DSM-TORTUGA); ²Probabilidade. Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferenciam em 5% no Teste de Tukey ajustado pelo PROC MIXED; ³Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura

Gallardo et al. (2006) também relataram efeito positivo da adição de monensina, aumentando a produção de leite em 4,0% em relação à ração controle (27,7 vs. 26,6 kg/dia, respectivamente), dados diferentes aos observados no presente trabalho.

Entretanto Ramanzin et al. (1997); Broderick (2004), Zahra et al. (2006) e Martineau et al. (2007) não observaram efeito da adição de monensina sódica nas rações sobre a produção de leite de vacas em lactação, semelhantemente aos resultados obtidos neste estudo.

Phipps et al. (2000) suplementou seus animais em uma primeira lactação com doses de 150, 300 e 450 mg/d, e 300 mg/d na segunda lactação, utilizando de duas lactações consecutivas. No ensaio 1 (primeira lactação), Phipps et al. (2000), obteve um aumento produção de leite em doses de 150 (ou seja, 8 mg/kg de MS) e 300 mg/d (16 mg/kg de MS), mas não obteve na dose de 450 mg/d (isto é, 24 mg/kg de MS). No segundo ensaio (segunda lactação) com 300 mg/d de monensina o autor também não observou diferença na produção de leite.

Os resultados obtidos por Phipps et al. (2000) são similares ao obtidos em nosso estudo, já que a dose de monensina utilizada de 24 mg/kg de MS, e na qual não observou-se efeito, é a mesma usada em nosso estudo.

Ramanzin et al. (1997) não observou efeito sobre as concentrações de proteína e gordura com a suplementação de monensina. Por outro lado outros autores, (PHIPPS et al, 2000; RUIZ et al., 2001; BRODERICK, 2004), observaram redução nas concentrações de proteína e gordura no leite destes animais. A grande maioria dos estudos em que a monensina alterou a composição do leite, reduzindo as concentrações de gordura e proteína do leite, paralelamente houve um aumento na produção de leite, sugerindo que um efeito de diluição (PHIPPS et al., 2000), entretanto este não foi o caso do nosso estudo.

Quanto a utilização de óleos essenciais Tassoul e Shaver (2009) relataram nenhum efeito na produção de leite, resultados semelhantes aos observados neste estudo. O mesmo produto utilizado neste estudo (Crina Ruminants) e no trabalho de Tassoul e Shaver (2009) resultou no aumento da produção de leite no estudo de Kung et al. (2008). Tassoul e Shaver (2009) trabalharam com animais no início de lactação, já Kung et al. (2008) com animais similares ao nosso estudo e no meio de lactação.

Benchaa et al. (2006b), também não encontrou mudança na produção e composição do leite de vacas alimentadas com 2 g/vaca/dia de Crina[®] Ruminants. Com exceção da concentração de lactose do leite, que foi maior para as vacas suplementadas com o aditivo, esta diferença não foi observada neste estudo, onde utilizamos uma suplementação menor com 1 g/vaca/dia do mesmo produto.

Benchaa et al. (2007b), também trabalhou novamente com o mesmo produto utilizado neste estudo, entretanto desta vez com a dose de 750mg/vaca/dia de Crina[®] Ruminants, e não observou diferenças quanto a produção e composição do leite quando comparadas a não utilização do produto.

Giannenas et al. (2011) trabalhando com 80 ovelhas em lactação suplementadas com óxido de etileno (componente presente no composto utilizado em nosso estudo) aos níveis de 50, 100, e 150 mg/kg e observaram significativamente ($P > 0.05$) o efeito do tratamento sobre a produção diária de leite, sendo altamente significativa a inclusão de óleos essenciais, em dose-dependente, de maneira que a produção média de leite foi 1,565 litros/dia para controle contra 1,681, 1,876 e 2,119 litros/dia para os níveis de 50, 100, e 150 mg / kg de óxido de etileno respectivamente.

Santos et al. (2010) observaram aumento de produção e do teor de gordura do leite com uma mistura de óxido de etileno contendo eugenol, acetato de geraniol, e óleo de coentro, o que demonstra mais uma vez a extrema variabilidade nas respostas dos animais.

Assim, fatores como o volumoso utilizado, o período de lactação, o nível de produção e a dose utilizada do aditivo interagem e geram resultados muitas vezes contraditórios nos estudos que envolvem a utilização destes para vacas em lactação.

Resultados avaliando a produção e composição de leite de animais suplementados com quitosana ainda são muito reduzidos na literatura, e ainda não são existentes sua comparação para este com outros aditivos como é o caso da monensina e óleos essenciais

Mingoti (2013) trabalhando com vacas com produção média de 30 kg e avaliando diferentes doses de quitosana, não observou qualquer efeito sobre o consumo e a produção de leite, apesar de ter observado aumento linear da digestibilidade aparente total da matéria seca, similarmente aos resultados obtidos em nosso estudo.

Del Valle (2014) trabalhando com quitosana, em dietas contendo óleo de soja, observou que a inclusão de quitosana, reduziram ($P<0,05$) a produção total e os teores de gordura no leite, reduzindo a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura, entretanto em dietas sem a inclusão do óleo de soja, e similar a nosso experimento, apenas a suplementação com o aditivo (quitosana), não ocasionou diferenças na produção e composição do leite, similar ao nosso estudo.

5.3 BALANÇO DE ENERGIA

São apresentados na tabela 07 os resultados de balanço de energia em função das dietas experimentais. O consumo de energia digestível e de energia metabolizável diferiu ($P<0,05$), foi maior para os animais consumindo dietas com quitosana quando comparado aos animais recebendo as dietas controle e com adição de monensina. O balanço de energia não diferiu quando foram comparados os tratamentos. A eficiência da utilização de energia (EL_L/CED) foi melhorada quando os animais receberam a dieta controle foram comparados aos animais recebendo a dieta com quitosana. Obtendo semelhante resposta também em relação a eficiência $EL_L + EL_M/CED$. Para as variáveis ganho de peso e escore de condição corporal também não foram observados efeitos estatísticos ($P>0,05$).

Tabela 07 - Balanço de energia em função das dietas experimentais

Variável	Dietas ¹				Média	EPM	P ²
	CT	CRI	QUI	MON			
Consumo (Mcal/dia)							
Energia Bruta	95,95	98,78	97,34	96,45	97,13	1,788	0,258
Energia Digestível	60,97 ^b	61,67 ^{ab}	64,84 ^a	60,68 ^b	62,06	1,132	0,004
Energia Metabolizável	50,60 ^b	51,18 ^{ab}	53,81 ^a	50,36 ^b	51,51	0,940	0,004
Energia Líquida	39,14	39,95	39,30	38,99	39,34	0,720	0,314
Balanço (Mcal/dia)							
Energia Líquida	7,07	8,39	7,98	7,91	7,84	0,529	0,067
Exigências de energia líquida (Mcal/dia)							
Lactação	22,00	21,86	21,34	21,36	21,61	0,412	0,143
Mantença	9,76	9,70	9,76	9,73	9,72	0,082	0,248
Eficiências (Mcal/Mcal)							
EL _L /CED ³	0,37 ^a	0,36 ^{ab}	0,34 ^b	0,35 ^{ab}	0,35	0,007	0,016
EL _L +EL _M /CED ⁴	0,53 ^a	0,52 ^{ab}	0,49 ^b	0,52 ^{ab}	0,51	0,008	0,012
kg							
Ganho de Peso	4,21	5,82	8,43	8,04	6,63	1,648	0,732
ECC Médio (1-5) ⁵	2,55	2,58	2,57	2,56	2,56	0,018	0,858

¹CT: Controle; CRI: Crina® Ruminants (DSM Nutritional Products Crina) QUI: Quitosana; MON: Monensina (Monensina DSM-TORTUGA); ² Probabilidade. Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferenciam em 5% no Teste de Tukey ajustado pelo PROC MIXED ³Exigência de energia líquida de lactação pelo consumo de energia digestível. ⁴Energia líquida de lactação e de manutenção pelo consumo de energia digestível. ⁵ Escore de condição corporal

Diferentemente Mingoti (2013) não observou diferenças para os consumos de EB, ED e EL em Mcal/dia com a inclusão das concentrações de quitosana na dieta dos animais em estudo (P>0,05). A produção de energia líquida de lactação (ELL) e energia líquida de ganho (ELG), também não sofreram diferença entre os tratamentos (P >0,05).

Araújo (2011) também não observou qualquer efeito da quitosana sobre as variáveis relacionadas ao balanço energético em bovinos de corte.

A literatura a respeito da utilização da quitosana na nutrição de ruminantes é escassa e, portanto, há pouco embasamento para comparar o balanço de energia dos animais suplementados.

A suplementação com aditivos pode alterar o balanço de energia através das mudanças no consumo de matéria seca, fermentação ruminal, e síntese de tecidos e leite.

Alguns aditivos como, por exemplo, a quitosana, incrementam o valor energético dos alimentos por mecanismos como o favorecimento da flora endógena e otimização dos processos fermentativos, levando a melhor digestibilidade da energia e proteína da dieta.

O maior consumo de energia digestível e de energia metabolizável para os animais contendo dietas com quitosana pode estar relacionado à maior digestibilidade da matéria seca e de nutrientes dos animais suplementados com quitosana, apresentadas na tabela 05.

A possível justificativa de um maior consumo de energia digestível e de energia metabolizável, sem a manutenção desta diferença e aumento no consumo de energia líquida dos animais suplementados com quitosana em comparação aos animais suplementados com os demais aditivos, ou ao controle, pode ser explicada por um aumento da energia perdida no processo da digestão. De maneira que os animais da dieta com quitosana apresentam um incremento calórico superior para digestão de nutrientes, não sendo refletido o aumento do consumo de energia digestível e de energia metabolizável em energia líquida e consequentemente não convertida a um ganho pelos animais, de produção e/ou crescimento (aumento de produção ou maior ganho de peso).

Gandra (2009) avaliaram diferentes teores de utilização de monensina sódica na dieta de vacas no terço médio de lactação e observou redução linear do consumo de energia. Apesar de não observar qualquer alteração de peso corporal, o autor observa ainda ganho de eficiência, medida pela relação entre a energia líquida de lactação e o consumo de energia digestível. Em nosso trabalho, quando foi avaliada a eficiência da utilização da energia para a produção de leite (EL_L/CED) se obteve efeito da adição de outro aditivo e não o da monensina, neste, foi observado efeito da adição de quitosana em relação à dieta controle, sendo reduzida a eficiência quando realizada a suplementação com quitosana. Estes resultados são justificados pelo maior CED apresentado pela dieta com quitosana, visto que não foi observado diferenças para a

produção de leite (kg/dia) (Tabela 06) e para a EL_L (Mcal/dia). De maneira semelhante pode ser justificada a eficiência da utilização de energia EL_{L+EL_M}/CED reduzida nos animais suplementados com quitosana quando comparado com os animais recebendo as dietas dos demais aditivos e a dieta controle.

5.4 PARÂMETROS SANGUÍNEOS

Na tabela 08 estão descritos os valores das variáveis sanguíneas em função das dietas experimentais. Não houve efeito ($p>0,05$) dos tratamentos para os parâmetros sanguíneos: glicose, ureia, colesterol HDL, colesterol VLDL, colesterol LDL, nitrogênio uréico no soro (NUS), triglicerídeos, proteínas totais, albumina, aspartato aminotransferase (AST) e γ -glutamilttransferase (GGT). Entretanto aumentou ($p<0,05$) o colesterol total com a adição de monensina sódica nas rações quando comparada a dieta controle.

Segundo Pogliani e Birgel Jr. (2007), os valores de referência para colesterol total de vacas holandesas lactantes é de 133,50 (mg/dl), bem próximos aos resultados encontrados neste trabalho e em literatura.

De acordo com Duffield et al. (1998), a suplementação de monensina tem efeitos positivos em indicadores de energia e concentração sanguínea de glicose mediada através de diferentes formas, tais como aumento de propionato concentração no rúmen e redução de metano produzido no rúmen ou taxa de oxidação da cetona.

A concentração de colesterol total no plasma realmente foi significativamente maior para os animais alimentados com monensina que para aqueles alimentados com as dietas controle, mas não diferiu para com os demais aditivos, entretanto para os demais indicadores de energia, como por exemplo a glicose esta diferença estatística não foi observada.

Tabela 08 - Variáveis sanguíneas em função das dietas experimentais

Variável	Dietas ¹				Média	EPM	P ²
	CT	CRI	QUI	MON			
	<i>mg/dL</i>						
Glicose	70,48	71,97	68,83	72,59	70,97	1,032	0,267
Ureia	32,34	31,35	31,99	32,13	32,06	0,529	0,568
Colesterol Total	141,34 ^b	148,76 ^{ab}	144,92 ^{ab}	156,26 ^a	147,30	3,704	0,027
Colesterol HDL ³	87,14	92,79	88,03	93,38	90,34	1,815	0,182
Colesterol VLDL	2,34	2,57	2,49	2,51	2,48	0,066	0,555
Colesterol LDL	51,77	53,28	54,52	57,32	54,22	2,853	0,776
NUS ⁴	15,11	14,65	14,95	15,01	14,98	0,247	0,569
Triglicerídeos	12,00	12,87	12,68	13,02	12,61	0,352	0,673
	<i>g/L</i>						
Proteínas Totais	5,73	5,63	5,67	5,70	5,69	0,045	0,657
Albumina	3,38	3,48	3,42	3,41	3,43	0,030	0,463
	<i>U/L</i>						
AST ⁵	66,62	64,94	64,19	65,12	65,39	1,042	0,363
GGT ⁶	27,65	26,63	27,10	27,68	27,26	0,802	0,174

1CT: Controle; CRI: Crina® Ruminants (DSM Nutritional Products Crina) QUI: Quitosana; MON: Monensina (Monensina DSM-TORTUGA); 2 Probabilidade. Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferenciam em 5% no Teste de Tukey ajustado pelo PROC MIXED; ³Colesterol - lipoproteína de alta densidade; ⁴Nitrogênio uréico no soro; ⁵Aspartato aminotransferase; ⁶Gama glutamil transferase.

A constatação de que as concentrações de glicose foram aumentados com a utilização de monensina não tem sido consistentemente relatado na literatura. Segundo Duffield et al. (2008a) em uma grande meta-análise do sobre o impacto da monensina, a falta de uma observação estatística do aumento deste parâmetro resposta mais provável, é em função da resposta ser pequena e geralmente necessitando uma amostra de maior tamanho para avaliar eficazmente a resposta de glicose. Pois segundo o próprio autor as concentrações mais elevadas de glicose tratadas com monensina são observada numericamente em diversos experimentos como por

exemplo os de Duffield et al. (1998) e Abe et al. (1994), havendo tendências numéricas para ambos estudos .

Mesmo não se observando efeito ($p>0,05$) para níveis de glicose plasmática, os mesmos se mostraram de acordo com os valores de referência relatados por Rebhun e Chuck (2000), que citam que os níveis séricos de glicose para vacas lactantes encontram-se entre 45,00 a 75,00 mg/dl.

A base de pesquisas publicadas em relação aos feitos dos óleos essenciais e quitosana é limitado, principalmente no que se diz respeito as variáveis sanguíneas. Em relação aos óleos essenciais em um dos poucos trabalhos avaliando parâmetros sanguíneos em vacas em lactação Giannenas et al. (2011) similar aos nossos resultados observou que suplementação com óxido de etileno (composto existente na mistura precisa de componentes de óleos essenciais utilizada) não afetou significativamente proteína total, albumina ou glicose no soro.

Diferentemente dos resultados observados em nosso estudo, Del Valle (2014) observou efeito tanto da inclusão de óleo de soja quanto de quitosana para a concentração de colesterol plasmático, sugerindo que ambos os fatores influenciam positivamente o teor de colesterol.

Similar a nosso estudo Araújo (2011), não observou qualquer efeito das dietas sobre a concentração de colesterol total circulante, entretanto diferentemente observou aumento linear na glicemia dos animais alimentados com doses crescentes de quitosana, sendo 54,37 e 67,25 mg/dL para as dietas com 0 e 150 mg de quitosana por quilograma de peso vivo, respectivamente.

Mingoti (2013) avaliando os efeitos de diferentes concentrações de quitosana nas dietas de vacas em lactação verificou efeito linear crescente ($P<0,05$) para as variáveis uréia e nitrogênio ureico no soro. Entretanto similar a nosso experimento para as variáveis glicose, colesterol, C-HDL, proteínas totais albumina, AST e GGT, não foi observado diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos.

Com relação as enzimas hepáticas, Lassen (2007) relatou que a AST tem sido utilizada para identificar lesão hepática em ruminantes, a atividade enzimática de AST responde tanto a lesão hepática quanto muscular, a avaliação de enzima específica faz-se necessária para tentar identificar a presença de lesão hepática.

Assim os resultados similares à dieta controle observados para AST e GGT em função da inclusão de aditivos, independentemente de qual deles foi utilizado validam que a atoxicidade dos aditivos em estudo e demonstram segurança para sua utilização.

5.5 FERMENTAÇÃO RUMINAL

Na tabela 09 estão descritos os resultados referentes a fermentação ruminal de acordo com as dietas experimentais.

Tabela 09 - Fermentação ruminal em função das dietas experimentais

Variável	Dietas ¹				Média	EPM	P ²		
	CT	CRI	QUI	MON			Dieta	Tempo	Dieta*tempo
pH	6,13	6,16	6,11	6,12	6,13	0,028	0,900	<0,001	0,977
<i>AGCC (mmol/100mmol)</i>									
Acético (C2)	62,94 ^{ab}	63,19 ^a	62,07 ^{ab}	60,66 ^b	62,21	0,203	0,028	<0,001	0,788
Propiônico (C3)	20,61 ^{ab}	20,15 ^b	21,99 ^{ab}	23,46 ^a	21,44	0,170	0,028	<0,001	0,350
Butírico (C4)	11,76	11,95	11,49	10,87	11,52	0,093	0,095	<0,001	0,317
AGCR	4,70	4,72	4,45	4,77	4,67	0,044	0,081	<0,001	0,755
<i>AGCC (mmol/L)</i>									
Acético (C2)	85,89 ^a	81,63 ^{ab}	80,63 ^b	77,44 ^b	81,37	0,848	<0,001	<0,001	0,907
Propiônico (C3)	28,40 ^{ab}	26,25 ^b	28,76 ^{ab}	30,67 ^a	28,44	0,459	0,008	<0,001	0,710
Butírico (C4)	16,36 ^a	15,52 ^{ab}	14,97 ^{ab}	14,01 ^b	15,22	0,218	0,005	<0,001	0,851
AGCR	6,51 ^a	6,08 ^b	5,72 ^c	6,09 ^b	6,09	0,073	<0,001	<0,001	0,671
Total	136,91 ^a	129,47 ^b	130,07 ^{ab}	128,47 ^b	131,21	1,421	0,010	<0,001	0,925
C2:C3	3,09 ^a	3,17 ^a	2,86 ^{ab}	2,64 ^b	2,94	0,031	0,006	<0,001	0,375

¹CT: Controle; CRI: Crina® Ruminants (DSM Nutritional Products Crina) QUI: Quitosana; MON: Monensina (Monensina DSM-TORTUGA); ² Probabilidade para efeito de dieta, tempo e interação dieta*tempo. Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferenciam em 5% no Teste de Tukey ajustado pelo PROC MIXED.

Não houve efeito de dieta ($P>0,05$) para os valores de pH ruminal (Figura 01). Sobre a concentração em mmol/L do ácido acético foi observado efeito da dieta ($P<0,05$). A inclusão de monensina e quitosana nas dietas reduziu a concentração de acetato quando comparada a dieta controle (Figura 02). Quando avaliado a proporção da

concentração total de AGCC (mmol/100mmol) a adição de monesina reduziu a proporção deste quando comparada a dieta com inclusão de óleos essenciais (Crina).

Figura 01 - pH ruminal em função das dietas experimentais

Figura 02 - Concentrações ruminiais de acetato em função das dietas experimentais

A inclusão de monensina nas dietas em comparação a dieta com óleos essenciais, aumentou ainda a concentração de propionato em mmol/L (Figura 3) e na proporção deste na concentração total de AGCC, sendo a dieta com inclusão de quitosana similar a dieta com monensina para esta variável.

Quando avaliada a proporção da concentração total de AGCC para o ácido propiônico (mmol/100mmol) a adição de monesina em relação à dieta controle mostra um aumento numérico desta, e assim uma tendência de aumento desta variável.

Não houve efeito ($P>0,05$) para butirato em relação a proporção da concentração total de AGCC. Entretanto quando avaliada a concentração de butirato em mmol/L a inclusão de monensina demonstrou efeito ($P<0,05$) de redução da concentração desta variável em relação à dieta controle (sem adição de aditivos), mas não deferindo, entretanto entre os aditivos (Figura 04).

Para os ácidos graxos de cadeia ramificada (iso-butírico, isso-valérico e valérico), não foi observado efeito ($P>0,05$) em relação a proporção da concentração total de AGCC.

Figura 03 - Concentrações ruminais de propionato em função das dietas experimentais

Figura 04 -Concentrações ruminiais de butirato em função das dietas experimentais

Já em relação à concentração AGCR em mmol/L, todos os aditivos demonstraram efeito ($P < 0,05$) de redução da concentração dos ácidos graxos de cadeia ramificada, em relação à dieta controle (sem adição de aditivos), a inclusão de quitosana diferiu ainda das dietas com inclusão de monensina e Crina, sendo observado uma maior redução destes ácidos graxos com a inclusão deste (Figura 05).

Figura 05 - Concentrações ruminiais de ácidos graxos de cadeia ramificada em função das dietas experimentais

Para a concentração total de ácidos graxos de cadeia curta (mmol/L), as dietas com inclusão de óleos essenciais e monensina mostraram um efeito significativo ($P>0,05$), de maneira que estes aditivos apresentaram menores concentrações totais de ácidos graxos de cadeia curta em relação à dieta controle. A inclusão de quitosana entretanto não foi significativamente diferente para nenhuma das dietas nesta variável (Figura 06).

Figura 06 - Concentrações ruminais de ácidos graxos de cadeia curta em função das dietas experimentais

Quanto a relação acético:propiónico (C2:C3) houve efeito ($P>0,05$), quando realizada a inclusão de monensina a dieta, de forma que os animais suplementados com este aditivo apresentaram uma menor relação acético:propiónico em comparação as dietas sem inclusão de aditivos (controle) e a dieta com inclusão de Crina (óleos essenciais). Em relação à dieta com inclusão de quitosana, esta foi similar à dieta com monensina, mas não diferindo dos demais tratamentos. Esta relação acético:propiónico é afetada pelas proporções molares de acético e propiónico apresentando-se respostas semelhantes a concentração destes já observada entre as rações experimentais. A quitosana não aumentou tanto quanto a monensina a concentração de ácido propiónico em relação as demais dietas, entretanto reduziu significativamente a concentração de ácido acético da mesma forma que este aditivo, e assim foi observado sua similaridade a monensina quando evidenciada a relação entre estes dois ácidos graxos de cadeia curta.

Diferentemente dos resultados encontrados em nosso estudo Chaves et al. (2008) em um estudo *in vivo* evidenciaram que os óleos essenciais também apresentaram efeitos sobre as concentrações de AGCC semelhantes à monensina, e promovem aumento numérico na concentração de propionato e leve queda na relação C2:C3.

Castillejos et al. (2005) observou-se um aumento na concentração de AGV totais mas nenhuma mudança em proporções molares individuais de AGCC quando Crina Ruminants foi adicionada a uma dose de 1,5 mg / L de cultura de líquido de rúmen.

Entretanto, a suplementação com óleos essenciais não teve efeito sobre a concentração total de AGV e em proporções molares, como descrito anteriormente por Benchaar et al. (2007b) e Newbold et al. (2004).

Calsamiglia et al. (2007), em uma grande revisão de literatura sobre óleos essenciais, compilando trabalhos *in vitro* e *in situ*, concluiu sobre os efeitos ruminais dos óleos essenciais que os mesmos inibem a desaminação e metanogênese resultando em menor acetato e propicia concentrações mais elevadas de propionato e butirato, entretanto as respostas são variáveis dos óleos essenciais, a combinação dos mesmos e sua suplementação, além disto o autor conclui que os efeitos de alguns destes óleos essenciais são dependentes do pH e dependentes da dieta.

Analisando os resultados da suplementação com os óleos essenciais (Crina Ruminants), a concentração em mmol/L e a proporção da concentração total de AGCC não diferiu da dieta controle, exceto para os ácidos graxos de cadeia ramificada.

Numericamente é possível observar uma redução da concentração de todos ácidos de cadeia curta da dieta CRI em relação à dieta controle, e dessa maneira o total de AGCC diferiu significativamente e demonstrou uma redução direta em relação a dieta sem adição de aditivos (controle), o que nos faz acreditar que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais nesse experimento funcionaram em relação a dieta controle quanto a manipulação da microbiota ruminal, todavia, a atividade antimicrobiana pode neste estudo e para a dieta utilizada ter sido intensa e não ter sido seletiva para os microrganismos e efeitos desejados apenas.

Mingoti (2013) trabalhando com vacas bem parecidas a este experimento, com produção média de 30 kg e avaliando diferentes doses de quitosana, não observou efeito ($P>0,05$) das rações experimentais sobre os valores de pH no tempo de coleta avaliado. Igualmente, o autor não encontrou-se efeito ($P>0,05$) sobre a concentração em mmol/L e em porcentagem das variáveis ácido acético, propiônico e butírico. A relação acético:propiônico também não foi afetada pelas proporções molares de acético e

propiónico apresentando-se semelhantes entre as rações experimentais. Entretanto vale lembrar que no estudo de Mingoti (2013) para avaliação dos parâmetros de fermentação ruminal, as amostras de líquido ruminal foram coletadas com a utilização de sonda esofágica e apenas três horas após a alimentação da manhã.

Araújo (2011) investigando diferentes concentrações de quitosana na dieta de novilhos nelore canulados no rúmen encontrou resultados significativos, observando alterações das proporções molares de AGCC individualmente e crescente incremento nas concentrações e porcentagens molares de propionato (mmol/L) à medida que se elevou as concentrações de quitosana na dieta, houve ainda diminuição da relação acetato: propionato, no tratamento similar ao trabalhado em nosso experimento, 150 mg de quitosana/kg de PV.

McGuffey et al. (2001) menciona que com a utilização de quitosana há incremento da participação de bactérias gram-negativas alterando os produtos finais de fermentação, podendo ser similar a utilização de monensina.

Com a utilização de ionóforos na alimentação de ruminantes, há uma redução da população de bactérias gram positivas que produzem o ácido acético e butírico; isto favorece o crescimento de bactérias gram negativas resistentes a monensina que produzem o ácido propiónico (DUFFIELD; BAGG, 2000).

Segundo Russel & Strobel (1989), e Ipharraguere & Clark (2003), a utilização da suplementação com monensina sódica na ração de vacas leiteiras resulta em aumento da produção do ácido propiónico, e redução da relação de acetato:propionato.

Santos (2011), observou que a suplementação com monensina sódica nas dietas resultou em alteração da proporção molar de propionato no líquido ruminal ($P < 0,05$), além de diminuir a relação acetato:propionato ($P < 0,05$). As rações contendo monensina sódica apresentaram maior proporção molar de propionato e menor de acetato em relação à ração controle, e, de forma semelhante, apresentaram menor relação acetato: propionato.

Rogers et al. (1997) observaram que a relação acetato:propionato diminuiu em média 65 a 72% quando monensina foi adicionada a dieta. Após a retirada da monensina, a relação retornou aos valores pré-adição. Em geral, a produção total de ácidos graxos voláteis é pouco afetada, mas se observa significativa alteração nas proporções relativas dos ácidos graxos voláteis. Enquanto as concentrações de ácido acético e butírico diminuem ou se mantêm, a de ácido propiónico aumenta em resposta ao aditivo.

Assim podemos verificar com o perfil de fermentação que o mecanismo de ação da quitosana pode ser semelhante aos ionóforos comerciais conhecidos (como é o caso da monensina) com aumento da proporção molar de ácido propiônico no rúmen e notada redução na proporção de ácidos acético e butírico (RICHARDSON et al., 1976; NAGARAJA et al., 1981).

5.6 BALANÇO DE NITROGÊNIO

Na tabela 10 estão descritos os valores para o balanço de nitrogênio em função das dietas experimentais.

Não foi observado efeito ($P>0,05$) para consumo de nitrogênio, excreção de nitrogênio na urina ou no leite (g/dia ou % nitrogênio total consumido). Entretanto, foi observado efeito ($P<0,05$) para a variável excreção de nitrogênio fecal (g/dia) com aumento da excreção quando comparada a excreção dos animais suplementados com Crina (óleos essenciais) em relação suplementação com os demais aditivos. Para a variável excreção de nitrogênio fecal (% Nitrogênio Total) houve efeito da dieta com a adição de óleos essenciais a dieta com a adição de quitosana apenas. Com relação ao balanço de energia em (g/dia) foi observado efeito ($P<0,05$) para a dieta contendo quitosana em relação à dieta com monensina. Segundo Tedeschi et al. (2003) a redução da excreção de nitrogênio tem sido explicada por uma maior digestibilidade de nitrogênio (proteína bruta).

Assim, maiores resultados observados sobre as variável excreção de N-Fecal das rações suplementadas com óleos essenciais (Crina) quando comparadas aos demais aditivos (avaliado a excreção de N-Fecal em g/dia de Nitrogênio total consumido) ou apenas a dieta contendo quitosana (avaliado a excreção de N-Fecal em % de Nitrogênio total consumido) é possivelmente devido a menor digestibilidade da proteína bruta e desta forma a menor utilização do nitrogênio por estes animais suplementados com este aditivo e como consequência seu aumento na excreção deste. Esta afirmação solidifica-se ao observar a tabela 05, na qual ($P<0,05$), os animais suplementados com Crina apresentaram menores valores de digestibilidade deste nutriente quando comparado aos demais aditivos.

Tabela 10 - Balanço de nitrogênio em função das dietas experimentais

Variável	Dietas ¹				Média	EPM	P ²
	CT	CRI	QUI	MON			
<i>Consumo (g/dia)</i>							
Nitrogênio total	667,5	685,73	669,37	663,85	669,87	12,590	0,070
<i>Excreção de N (g/dia)</i>							
Urinário	150,98	150,94	151,72	157,48	153,37	4,170	0,767
Fecal	220,38 ^{ab}	242,63 ^a	203,85 ^b	205,22 ^b	215,79	6,909	<0,001
Leite	150,25	150,42	147,89	147,37	148,98	2,858	0,534
<i>Balanço (g/dia)</i>							
Nitrogênio	139,38 ^{ab}	145,42 ^{ab}	166,33 ^a	130,24 ^b	143,79	6,811	0,032
<i>Excreção (% Nitrogênio total consumido)</i>							
Urinário	23,14	22,14	22,92	24,06	23,11	0,574	0,370
Fecal	33,03 ^{ab}	34,58 ^a	30,11 ^b	31,54 ^{ab}	32,32	0,681	0,009
Leite	22,82	22,38	22,23	22,41	22,46	0,350	0,338
<i>Balanço (% Nitrogênio total consumido)</i>							
Nitrogênio	20,80	21,30	24,80	20,61	21,73	0,955	0,103

¹CT: Controle; CRI: Crina® Ruminants (DSM Nutritional Products Crina) QUI: Quitosana; MON: Monensina (Monensina DSM-TORTUGA); ² Probabilidade. Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferenciam em 5% no Teste de Tukey ajustado pelo PROC MIXED.

Conforme observado neste estudo e segundo Mingoti (2013) a suplementação com quitosana aumenta a digestibilidade total e a digestibilidade da proteína bruta e disponibiliza aminoácidos para absorção no intestino delgado, assim ocorre incremento de aminoácidos para a gliconeogênese ocasionando em melhoria da eficiência de uso de nitrogênio e por consequência uma redução da excreção de nitrogênio.

A relação da melhoria da eficiência de uso de nitrogênio e a redução da excreção de nitrogênio, aliada a manutenção do consumo deste, resulta em melhora no balanço de

nitrogênio em g/dia da quitosana, numericamente comparada as demais dietas e estatisticamente comparada a inclusão de monensina.

O mesmo Mingoti (2013) observou efeito linear decrescente ($P < 0,05$) para a variável excreção de N-Fecal (g/dia) e para a variável excreção de N-Fecal (% Nitrogênio Total), sendo os melhores resultados observados sobre a variável excreção de N-Fecal (g/dia e % de Nitrogênio Total) das rações suplementadas com quitosana foram obtidos com a suplementação de 150mg/kg de peso corporal de quitosana, similar a dose utilizada em nosso experimento.

Del Valle (2014) observou que tanto o óleo de soja quanto a quitosana reduziram ($P < 0,05$) a excreção de nitrogênio nas fezes. O autor justifica que estes efeitos estão relacionados à redução do consumo na dieta contendo óleo e a melhoria da digestibilidade das dietas contendo quitosana, da mesma forma que nosso estudo.

Quanto aos trabalhos com suplementação de monensina na literatura, alguns resultados variam, por exemplo, a inclusão de monensina diminuiu a excreção de nitrogênio em vacas pós parto, mas não em vacas no pré parto (PLAIZIER et al., 2000), e similar a nosso estudo Benchaar et al. (2006b) e Gehman et al. (2008) não encontraram em seus estudos efeitos sobre o balanço de nitrogênio quando suplementaram vacas no início da lactação com 16 mg/kg ms de monensina.

Quanto a utilização de óleos essenciais segundo Benchaar et al. (2007b) as excreções de nitrogênio não são afetadas em vacas leiteiras suplementadas com diferentes dosagens de uma mistura de compostos de óxido de etileno.

Benchaar et al. (2006b) apesar de observar maior digestibilidade da proteína bruta na dieta suplementada com monensina avaliou ser semelhante a excreção de N entre os tratamentos. Nosso presente estudo difere desta resposta e quando comparada a excreção de N em g/dia, as dietas suplementadas com óleos essenciais (Crina Ruminants) apresentaram maior excreção de nitrogênio, comprovando mais uma vez as discussões apresentadas e aos dados de digestibilidade descritos na tabela 05, na qual o aditivo Crina apresentou menor digestibilidade da proteína bruta quando comparado a dieta com a suplementação de monensina.

6 CONCLUSÕES

É possível concluir que a utilização de quitosana na alimentação de vacas leiteiras apresentam resultados semelhantes à utilização de monensina sódica ou superiores a dieta controle dependendo das variáveis a serem avaliadas, e pode ser uma grande alternativa na nutrição destes animais.

Quanto aos óleos essenciais (Crina Ruminants), as respostas não foram positivas para as variáveis avaliadas, possivelmente ocasionadas pela intensa atividade antimicrobiana, não seletiva apenas aos microrganismos desejados, e levando assim a efeitos desfavoráveis. Assim são necessários mais estudos para estabelecer com precisão as possíveis melhoras dos produtos testados e maximizar e avaliar maiores resultados obtidos por parte da adição da quitosana e da monensina.

REFERÊNCIAS

ABE, N.; LEAN, I. J.; RABIEE, A.; PORTER, J.; GRAHAM, C. Effects of sodium monensin on reproductive performance of dairy cattle. II. Effects on metabolites in plasma, resumption of ovarian cyclicity and oestrus in lactating cows. **Australian Veterinary Journal**, v.71, p. 277–282, 1994.

ALLAN, C. R.; HADWIGER, L. A. The fungicidal effects of chitosan on fungi and varying in cell wall composition. **Experimental Mycology**, v. 3, p. 285–287, 1979.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 15. ed. Arlington: AOAC, 1990. 1298 p

ARAÚJO, A. P. C. **Efeito de diferentes concentrações de quitosana na dieta de novilhos Nelore**. 2011. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. Filmes de quitosana processados em diversas concentrações: polímeros. **Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 223–228, 2003.

BAGG, R. Mode of action of ionophores in lactating dairy cattle. Usefulness of ionophores in lactating dairy cattle. In: SYMPOSIUM HELD, 1997, Ontario. **Proceedings...** Ontario: Ontario Veterinary College, 2000.

BENCHAAAR, C.; CHAVES, A. V.; FRASER, G. R.; WANG, Y.; BEAUCHEMIN, K. A.; MCALLISTER, T. A. Effects of essential oils and their components on in vitro rumen microbial fermentation. **Canadian Journal Animal Science**, v.87, p. 413–419, 2007a.

BENCHAAAR, C.; HRISTOV, A. N.; GREATHEAD, H. Essential oils as feed additives in ruminant nutrition. In: STEINER, T. (Ed.). **Phytogenics in animal nutrition. Natural concepts to optimize gut health and performance**. Nottingham, UK : Nottingham University Press, 2009. p. 111–146.

BENCHAAAR, C.; PETIT, H. V.; BERTHIAUME, R.; OUELLET, D. R.; CHIQUETTE, J.; CHOUINARD, P. Y. 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 Animal Science**, v. 90, p. 886–897, 2007b.

BENCHAAAR, C.; DUYNISVELD, J. L.; CHARMLEY, E. Effects of monensin and increasing dose levels of a mixture of essential oil compounds on intake, digestion and growth performance of beef cattle. **Canadian Journal Animal Science**, v. 86, p. 91–96, 2006a.

BENCHAAAR, C.; PETIT, H. V.; BERTHIAUME, R.; WHYTE, T. D.; CHOUINARD, P. Y. 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, 2006b.

BERGEN, W. G., BATES, D. B. Ionophores: their effect on production, efficiency and mode of action. **Journal of Animal Science**, v. 58, p. 1453-1465, 1984.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Coordenação de Produtos de Alimentação Animal. **Tabela de aditivos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas com uso autorizado na alimentação animal**. 2008.

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

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; CARDOZO, P. W.; KAMEL, C. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 7, p. 2508-2516, 2005b.

BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. Screening for effects of plant extracts and active compounds on dairy cattle rumen microbial fermentation in a continuous culture system. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123/124, n. 2, p. 597-613, 2005a.

CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P. W.; CASTILLEJOS, L.; FERRET, A. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 6, p. 2580-2595, 2007.

CAMPOS NETO, O.; RAMOS, A. A.; ESCOBAR, M. J.; DALANESI, J. A.; BEM, C. H. W. de. Avaliação da monensina sódica em vacas leiteiras. **Science Agricultural**, v. 52, p. 268-273, 1995.

CASALI, A. O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos *in situ*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 335–342, 2008.

CASTILLEJOS, L.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. Effect of essential oil active Compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 7, p. 2649-2658, 2006.

CASTILLEJOS, L.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; LOSA, R. Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. **Animal Feed Science Technology**, v. 119, p. 29–41, 2005

CHAVES, A.V.; HE, M. L.; YANG, W. Z.; HRISTOV, A. N.; MCALLISTER, T. A.; BENCHAAAR, C. Effects of essential oils on the proteolytic, deaminative and Methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 88, n. 1, p. 117-122, 2008.

CHIZZOTTI, M. L. **Avaliação da casca de algodão para novilhos de origem leiteira e determinação da excreção de creatinina e produção de proteína microbiana em novilhas e vacas leiteiras**. 2004. 132p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

CHOI, B. K.; KIM, K. Y.; YOO, Y. J.; OH, S. J.; CHOI, J. H.; KIM, C. Y. *In vitro* antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 18, p. 553–557, 2001.

COMA, V.; MARTIAL-GROS, A.; GARREAU, S.; COPINET, A.; SALIN, F.; DESCHAMPS, A. EDIBLE Antimicrobial Films Based on Chitosan Matrix. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 1162–1169, 2002.

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

DA SILVA, D. C.; SANTOS, G. T. ; BRANCO, A. F.; DAMASCENO, J. C.; KAZAMA, R.; MATSUSHITA, M.; HORST, J. A.; DOS SANTOS, W. B. R.; PETIT, H. V. Production performance and milk composition of dairy cows fed whole or ground flaxseed with or without monensin. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2928–2936, 2007.

DEL VALLE, T. A. **Quitosana associada a fonte de lipídeos na alimentação de vacas em lactação**. 2014. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

DEMETZOS, C.; KATERINOPOULOS, H.; KOUVARAKIS, A.; STRATIGAKIS, N.; LOUKIS, A.; EKONOMAKIS, C.; SPILIOTIS, V.; TSAKNIS, J. Composition, antimicrobial activity of essential oil of *cistus creticus* subsp. *Erioccephalus*. **Planta Medica**, v. 63, p. 477–479, 1997.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 308–316, 2000.

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.; RABIEE, A. R.; LEAN, I. J. A meta-analysis of the Impact of monensin in lactating dairy cattle. Part1. Metabolic effects. **Journal of Dairy Science**. v.91, p.1334–1336. 2008a.

DUFFIELD, T. F.; RABIEE, A. R.; LEAN, I. J. A meta-analysis of the Impact of monensin in lactating dairy cattle. Part2. Production effects. **Journal of Dairy Science**. v.91, p.1347–1360. 2008b.

DUFFIELD, T. F.; SANDALS, D.; LESLIE, K. E.; LISSEMORE, K.; MCBRIDE, B. W.; LUMSDEN, J. H.; DICK, P.; BAGG, R. 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.

DUTSON, T. R. **Growth regulation in farm animals**: advances in meat research. London. Elsevier, 1991. p. 321–342.

EDMONSON, A. J.; LEAN, I. J.; WEAVER, L. D.; FARVER, T.; WEBSTER, G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 1, p. 68-78, 1989.

EIFERT, E. C.; LANA, R. P.; LANNA, D. P. D. Efeito do fornecimento de dietas com monensina e óleo de soja no desempenho de vacas leiteiras na fase inicial de lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2123-2132, 2005.

ERWIN, E. S.; MARCO, G. J.; EMERY, E. M. Volatile fatty acid analyzes of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 44, n. 9, p. 1768-1771, 1961.

FANG, S. W.; LI, C. F.; SHIH, D. Y. C. Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar Candied kumquat. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 136-140, 1994.

FERGUSON, J. D.; GALLIGAN, D. T.; THOMSEN, N. Principal descriptors of body condition in Holstein dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.77, p. 2695-2703, 1994.

FERNANDEZ, M.; SERRANO, E.; FRUTOS, P., GIRALDEZ, F. J., MANTECON, A. R., LLACH, J. R. Efecto del aditivo crina hc sobre la actividad degradativa ruminal en la especie ovina [effect of crina hc supplement upon the rumen degradative activity in sheep]. **ITEA**, v. 18, p.160–162, 1997.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. L.; FREDRICKSON, D. L. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, p. 499-502, 1972.

GALLARDO, M. R.; CASTILLO, A. R.; BARGO, F. Monensin for lactating dairy cows grazing mixed-alfalfa pasture and supplemented with partial mixed ration. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 644–652. 2005.

GANDRA, J. R. **Avaliação do uso de monensina sódica em rações de vacas leiteiras**: desempenho produtivo e resíduos no leite. 2009. 93 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GANDRA, J. R.; RENNÓ, F. P.; SILVA, L. F. P.; FREITAS JÚNIOR, J. E.; MATURANA FILHO, M.; GANDRA, E. R. S.; D'ANGELO, L. S.; ARAÚJO, A. P. C. Parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras submetidas à diferentes níveis de monensina sódica nas rações. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 1, p. 115-128, 2009.

GANDRA, J. R.; RENNO, F. P.; FREITAS JÚNIOR, J. E.; SANTOS, M. V. PRADA E SILVA, L. F.; ARAÚJO, A. P. C. Productive performance and milk protein fraction composition of dairy cows supplemented with sodium monensin. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 8, p. 1810-1817, 2010.

GEHMAN, A. M.; KONONOFF, P. J.; MULLINS, C. R. ; JANICEK, B. N. Evaluation of nitrogen utilization and the effects of monensin in dairy cows fed brown midrib corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 288-300, 2008.

GHAOUTH, A. E. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Phytopathology**, v. 82, p. 398, 1992.

GIANNENAS, I.; SKOUFOS, J.; GIANNAKOPOULOS, C.; WIEMANN, M.; GORTZI, O.; LALAS, S.; KYRIAZAKIS, I. 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.

GOIRI, I.; GARCIA-RODRIGUEZ, A.; OREGUI, L. M. Effects of chitosans on in vitro rumen digestion and fermentation of maize silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 148, p. 276-287, 2009a.

GOIRI, I.; OREGUI, L. M.; GARCIA-RODRIGUEZ, A. Dose-response effects of chitosans on in vitro rumen digestion and fermentation of mixtures differing in forage-to-concentrate ratios. **Animal Feed Science and Technology**, v. 151, p. 215-227, 2009b.

GOIRI, I.; GARCIA-RODRIGUEZ, A.; OREGUI, L. M. Effect of chitosan on mixed ruminal microorganism fermentation using the rumen simulation technique (Rusitec). **Animal Feed Science and Technology**, v. 152, p. 92-102, 2009c.

GOIRI, I.; OREGUI, L. M.; GARCIA-RODRIGUEZ, A. Use of chitosans to modulate ruminal fermentation of a 50:50 forage-to-concentrate diet in sheep. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 2, p. 749-755, 2010a.

HALL, M. B. **Calculation of non-estructural carbohydrate content of feeds that contain non-protein nitrogen**. University of Florida, 2000. p. A-25 (Bulletin 339, April-2000).

HANEY JR., M. E.; HOEHN, M. M. Monensin, a new biologically active compound. I. discovery and isolation. **Antimicrobial Agents Chemother**, p. 349, 1967.

HARVATINE, K. J.; ALLEN, M. S. Effects of fatty acid supplements on milk yield and energy balance of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1081–1091, 2006.

HAYES, D. P.; PFEIFFER, D. U.; WILLIAMSON, N. B. Effect of intraruminal monensin capsules on reproductive performance and milk production of dairy cows fed pasture. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.1000-1008, 1996.

HUANG, R. L.; YIN, Y. L.; WU, G. Y.; ZHANG, T. J.; LI, L. L.; LI, M. X.; TANG, Z. R.; ZHANG, J.; WANG, B.; HE, J. H.; NIE, X. Z. Effect of dietary oligochitosan supplementation on ileal nutrient digestibility and performance in broilers. **Poultry Science**, v. 84, p. 1383-1388, 2005.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION - IDF. **Whole milk. Determination of milk fat, protein and lactose content guide for the operation of mid-infra-red instruments**. Bruxelas: 1996. 12p. (IDF Standard 141 B).

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

JANSSEN, A. M.; CHIN, N. L.; SCHEFFER, J. J. M.; BAERHEIM-SVENDSEN, A. Screening for antimicrobial activity of some essential oils by the agar overlay technique. **Pharm Weekblad Scientific**, v. 8, p. 289-292, 1986.

NAGARAJA, T. G.; NEWBOLD, C. J.; VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. London: Blackie Academic and Professional, 1997. p. 523-632.

JEON, Y. L.; KAMIL, J. Y. V. A.; SHAHIDI, F. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 20, p. 5167-5178, 2002.

KUMAR, A. B. V.; VARADARAJ, M. C.; GOWDA, L. R.; THARANATHAN, R. N. Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosanolytic with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. **The Biochemical Journal**, v. 391, p. 167-175, 2005.

KUNG JR., L.; WILLIAMS, P.; SCHMIDT, R. J.; HU, W. 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.

LASSEN, E. D. Avaliação laboratorial do fígado. In: THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. cap. 23, p. 335-354.

LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S. G. Bioactivity of selected plant essential oils against *listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 82, p. 759-762, 1997.

MARTINEAU, R.; BENCHAAAR, C.; PETIT, H. V. Effects of lasalocid or monensin supplementation on digestion, ruminal fermentation, blood metabolites, and milk production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 5714-5725, 2007.

MCCLARY, D. G.; GREEN, E. E.; THOMAS, J. I. D.; WILKINSON, J. I. D.; MCGUFFEY, R. K.; AGUILAR, A. A.; MECHOR, G. D.; CUI, Z. Effect of rumensin on performance and health in lactating dairy cows. In: FOUR STATE NUTRITION AND MANAGEMENT CONFERENCE, 2005, Dubuque. **Proceeding...** Dubuque: Iowa State University, 2005. p. 255-264.

MCGUFFEY, R. K.; RICHARDSON, L. F.; WILKINSON, J. I. D. Ionophores for dairy cattle: current status and future outlook. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 194-203, 2001.

MCINTOSH, F. M.; WILLIAMS, P.; LOSA R.; WALLACE, R. J.; BEEVER, D. A.; NEWBOLD, C. J. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5011–5014, 2003.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 85, p. 1217-1240, 2002.

MINGOTI, R. D. **Desempenho produtivo, digestão e metabolismo em vacas leiteiras alimentadas com diferentes concentrações de quitosana nas dietas**. 2013. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

MORRIS, F. E.; BRANINE, M. E.; GALYEAN, M. L.; HUBBERT, M. E.; FREEMAN, A. S.; LOFGREEN, G. P. Effect of rotating monensin plus tylosin and lasalocid on performance, ruminal fermentation, and site and extent of digestion in feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 3069–3078, 1990.

MUZZARELLI, R.; TARSI, R.; FILIPPINI, O.; GIOVANETTI, E.; BIAGINI, G.; VARALDO, P. E. Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, p. 2019-2023, 1990.

NAGARAJA, T. G.; NEWBOLD, C. J.; VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. London: Blackie Academic and Professional, 1997. p. 523-632.

NAGY, J. G.; TENGEDY, R. P. Antibacterial action of essential oils of artemisia as an ecological factor ii ntibacterial action of the volatile oils of artemisia tridentata (big sagebrush) on bacteria from the rumen of mule deer. **Journal of Applied Microbiology**, v. 16, p. 41–444, 1968.

NEWBOLD, C. J.; MCINTOSH, F. M.; WILLIAMS, P.; LOSS R.; WALLACE, R. J. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 114, p. 105–112, 2004

NOCEK, J. E. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility. A review. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 2051-2069, 1988.

NO, H. K.; PARK, N. Y.; LEE, S. H.; MEYERS, S. P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 65–72, 2002.

NRC. National Research Council. Nutrient requirements of dairy cattle. 7. ed. Washinton, D.C.: National Academic Press, 2001. 381 p.

OELKER, E. R.; REVENEAU, C.; FIRKINS, J. L. Interaction of molasses and monensin in alfalfa hay or corn silage-based diets on rumen fermentation, total tract digestibility, and milk production by holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 270-285, 2009.

OH, H. K.; JONES, M. B.; LONGHURST, W. M. Comparison of rumen microbial inhibition resulting from various essential oils isolated from relatively unpalatable plant species. **Journal of Applied Microbiology**, v. 16, p. 39-44, 1968.

OH, H. K.; SAKAI, T.; JONES, M. B.; LONGHURST, W. M. Effect of various essential oils isolated from douglas fir needles upon sheep, deer rumen microbial activity **Journal of Applied Microbiology**, v. 15, p. 777-784, 1967.

OLIVEIRA, A. S.; VALADARES, R. F. D.; VALADARES FILHO, S. C.; CECON, P. R.; RENNO, L. N.; QUEIROZ, A. C.; CHIZZOTTI, M. L. Produção de proteína microbiana e estimativa das excreções de derivados de purinas e de uréia em vacas lactantes alimentadas com rações isoproteicas contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-proteicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 5, p. 1621-1629, 2001.

OLIVEIRA, N. J. F.; MELO, M. M.; LAGO, L. A.; NASCIMENTO, E. F. Hemograma, bioquímica sérica e histologia da biópsia hepática de bovinos após administração de polpa cítrica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 418-422, 2005.

OSBORNE, J. K.; MUTSVANGWA, T.; ALZAHAL, O.; DUFFIELD, T. F.; BAGG, R.; DICK, P.; VESSIE, G.; MCBRIDE, B. W. Effects of monensin on ruminal forage degradability and total tract diet digestibility in lactating dairy cows during grain-induced subacute ruminal acidosis. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1840-1847, 2004.

OWENS, F. N.; ZORRILLA-RIOS, J.; DUBESKI, P. Effects of ionophores on metabolism, growth, body composition and meat quality. In: PEARSON, A. M.; DUTSON, T. R. **Growth regulation in farm animals: advances in meat research**. London. Elsevier, 1991. p. 321-342.

PETERSSON-WOLFE, C. S.; LESLIE, K. E.; OSBORNE, T.; MCBRIDE, B. W.; BAGG, R.; VESSIE, G. Effect of monensin delivery method on dry matter intake, body condition score, and metabolic parameters in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 1870-1879, 2007.

PHIPPS, R. H.; WILKINSON, J. I.; JONKER, L. J. Effect of monensin on milk production of Holstein-Friesian dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 2789-2794, 2000.

PLAZIER, J. C.; MARTIN, A.; DUFFIELD, T. Effect of a prepartum administration of monensin in a controlled capsule on apparent digestibilities and nitrogen utilization in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 2906-2918, 2000.

- POGLIANI, F. C.; BIRGEL JUNIOR, E. H. Valores de referência do lipidograma de bovinos da raça Holandesa, criados no Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 44, p. 373-383, 2007.
- POTARA, M.; JAKAB, E.; DAMERT, A.; POPESCU, O.; CANPEAN, V.; ASTILEAN, S. Synergistic antibacterial activity of chitosan-silver nanocomposites on *Staphylococcus aureus*. **Nanotechnology**, v. 22, n. 13, p. 135-144, 2011.
- PRESSMAN, B. C. Ionophorus antibiotics as models for biological transport. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 27, p. 1283-1288, 1968.
- RAAFAT, D.; SAHL, H. G. Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey. **Microbial Biotechnology**, v. 2, p. 186–201, 2009.
- RAMANZIN, M.; BAILONI, L.; SCHIAVON, S. Effect of monensin on milk production and efficiency of dairy cows fed two diets differing in forage to concentrate ratios. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1136–1142, 1997.
- REBHUN, W.C.; GUARD, C. **Doenças em vacas de leite**. São Paulo: Rocca, 2000. 642 p.
- RICHARDSON, L. F.; RAUN, A. P.; POTTER, E. L.; COOLEY C. O.; RATHMACHER, R. P. Effect of monensin on rumen fermentation *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Animal Science**, v. 43, p. 657-664, 1976.
- ROGERS, M.; JOUANY, J. P.; THIVEND, P.; FONTENOT, J. P. The effects of short-term and long-term monensin supplementation, and its subsequent withdrawal on digestion in sheep. **Animal Feed Science Technology**, v. 65, p. 113-127, 1997.
- ROSSI, J. **Composition pour améliorer la digestibilité des aliments destinés aux animaux ruminants**. EP 0,630,577, A1, 1994.
- RUIZ, R.; ALBRECHT, G. L.; TEDESCHI, L. O.; JARVIS, G.; RUSSELL, J. B.; FOX, D. G. Effect of monensin on the performance and nitrogen utilization of lactating dairy cows consuming fresh forage. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1717-1727, 2001.
- RUSSELL, J. B. A proposed model of monensin action in inhibiting rumen bacterial growth: effects on ion flux and proton motive force. **Journal of Animal Science**, v. 64, p. 1507-1519, 1987.
- RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J. Mini Review. Effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1-6, 1989.
- SANTOS, M. B.; ROBINSON, P. H.; WILLIAMS, P.; LOSA, R. 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. C. B. **Desempenho produtivo e resíduos no leite de vacas suplementadas com monensina sódica nas rações**. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

SAUER, F. D.; KRAMER, J. K. G.; CANTWELL, W. J. Antiketogenic effects of monensin in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 423-436, 1989.

SCHELLING, G. Monensin mode of action in the rumen. **Journal of Animal Science**, v. 58, p. 1518-1527, 1984.

SEGABINAZZI, L. R. **Aditivo a base de extratos vegetais como alternativa à monensina sódica na dieta de vacas de corte terminadas em confinamento**. 2008. 84 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

SENEL, S.; MCCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Review**, v. 56, p. 1467-1480, 2004.

SHAHIDI, F. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science Technology**, v. 10, n. 2, p. 37-51, 1999.

SKLAN, D.; KAIM, M.; MOALLEM, U.; FOLMAN, Y. Effect of dietary calcium soaps on milk yield, body weight, reproductive hormones, and fertility in first parity and older cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 1652-1660, 1994.

SPEARS, J. W. Ionophores and nutrient digestion and absorption in ruminants. **Journal of Nutrition**, v. 120, p. 620-632, 1990.

SUDARSHAN, N. R.; HOOPER, D. G.; KNOOR, D. Antibacterial action of chitosan. **Food Biotechnology**, v. 6, p. 257-272, 1992.

SYMANOWSKI, J. T.; GREEN, H. B.; WAGNER, J. R.; WILKINSON, J. I. D.; DAVIS, J. S.; HIMSTEDT, M. R.; ALLEN, M. S.; BLOCK, E.; BRENNAN, J. J.; HEAD, H. H.; KENNELLY, J. J.; NIELSEN, J. N.; NOCEK, J. E.; VAN DER LIST, J. J.; WHITLOW, L. W. Milk production and efficiency of cows fed monensin. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 75, 1999. Supl.

TANG, H.; ZHANG, P.; KIEFT, T. L.; RYAN, S. J.; BAKER, S. M.; WIESMANN, W. P.; ROGELJ, S. Antibacterial action of a novel functionalized chitosan-arginine against gram-negative bacteria. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 2562-2571, 2010.

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. 1734-1740, 2009.

TAO, Y.; QIAN, L. H.; XIE, J. Effect of chitosan on membrane permeability and cell morphology of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 969-974, 2011.

TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G.; TYLUTKI, T. P. Potencial environmental benefits of ionophores in ruminants diets. **Journal of Environmental Quality**, v. 32, p. 1591-1602, 2003.

VANDEHAAR, M. J.; ST-PIERRE, N. Major Advances in nutrition: relevance to the sustainability of the dairy industry. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 4, p. 1280-1292, 2006.

VAN SOEST, P. J.; MASON, V. C. The influence of maillard reaction upon the nutritive value of fibrous feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 32, n. 1, p. 45-53, 1991.

VARGA, G. A.; KOLVER, E. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. **Journal of Nutrition**, v. 127, p. 819s-823s, 1997.

WANG, G. H. Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. **Journal of Food Protection**, v. 55, p. 916-919, 1992.

WEISS, W. P. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 61, 1999.

Proceedings... Ithaca: Cornell University, 1999. p.176-185.

WILKINSON, J. I. D.; KENNINGTON, A. S.; EHRENFRIED, K. M.; MORAN, J. W.; BUCK, J. M. Human food safety with the use of monensin in lactating dairy cows. In: SYMPOSIUM ON USEFULNESS OF IONOPHORES IN LACTATING DAIRY CATTLE, 1997, Canada. **Proceedings...** Canada: Ontario Veterinary College, 1997. p. 86-93.

ZAHRA, L. C.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E. OVERTON, T. R.; PUTNAM, D.; LEBLANC, S. J. Effects of rumen-protected choline and monensin on milk production and metabolism of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 4808-4818, 2006.