FILIPE ZANFERARI

Quitosana associada a grão de soja integral na alimentação de vacas leiteiras: I. Digestão, metabolismo e desempenho produtivo; II. Avaliação de metodologias para estimativas da digestibilidade aparente total e produção microbiana ruminal

Pirassununga

2017

FILIPE ZANFERARI

Quitosana associada a grão de soja integral na alimentação de vacas leiteiras: I. Digestão, metabolismo e desempenho produtivo; II. Avaliação de metodologias para estimativas da digestibilidade aparente total e produção microbiana ruminal

Tese 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 Doutor em Ciências.

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Francisco Palma Rennó

Coorientador:

Prof. Dr. Gilberto Vilmar Kozloski

De acordo:_____

Orientador

Pirassununga
2017

VERSÃO CORRIGIDA

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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.3485
FMVZ

Zanferari, Filipe
Quitosana associada a grão de soja integral na alimentação de vacas leiteiras: I. Digestão, metabolismo e desempenho produtivo; II. Avaliação de metodologias para estimativas da digestibilidade aparente total e produção microbiana ruminal / Filipe Zanferari. -- 2017.
160 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Palma Rennó.
Coorientador: Prof. Dr. Gilberto Vilmar Kozloski

1. Aditivo antimicrobiano. 2. Ácidos graxos. 3. Biohidrogenação ruminal. 4. Excreção fecal. 5. Derivados de purinas. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Quitosana associada a grão de soja cru e integral na alimentação de vacas em lactação", protocolado sob o nº 3059/2013, utilizando 24 (vinte e quatro) bovinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, foi aprovado em reunião de 14/8/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Chitosan associated with whole raw soybeans in dairy cows diets", protocol number 3059/2013, utilizing 24 (twenty four) bovine, under the responsibility Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, was approved in the meeting of day 8/14/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 14 de agosto de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ZANFERARI, Filipe

Título: **Quitosana associada a grão de soja integral na alimentação de vacas leiteiras**: I. Digestão, metabolismo e desempenho produtivo; II. Avaliação de metodologias para estimativas da digestibilidade aparente total e produção microbiana ruminal

Tese 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 Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico a realização desta obra às pessoas mais importantes da minha vida,
à minha amada Família...
Minha mãe Ives, meu pai Dari, meus irmãos Fabiana e Fernando,
meus cunhados Alisson e Ana Cristina, e à Maria Clara, que ainda nem chegou,
mas o tio/dindo já possui um benquerer imenso.

...

"Eu tenho tanto pra lhes falar
Mas com palavras não sei dizer
Como é grande o meu amor por vocês

E não há nada pra comparar
Para poder lhes explicar
Como é grande o meu amor por vocês

Nem mesmo o céu nem as estrelas
Nem mesmo o mar e o infinito
Nada é maior que o meu amor
Nem mais bonito

Me desespero a procurar
Alguma forma de lhes falar
Como é grande o meu amor por vocês"

...

Quero dedicar também a todas as pessoas que lutam pelos seus sonhos,
Que correm atrás dos seus objetivos,
Mas que nunca se esquecem de suas raízes,
Dos seus valores e dos seus princípios.
A vocês, dedico.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus, que está sempre presente, não me abandona um sequer dia, principalmente nos mais difíceis, dando forças pra seguir e nunca deixar de acreditar.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) que possibilitaram a realização do curso de Doutorado e de "brinde" disponibilizaram o Campus de Pirassununga, que representa um verdadeiro privilégio de ambiente de trabalho cotidiano em meio à natureza ímpar.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa de estudo (Processo nº 2014/15302-5).

Ao Professor Francisco Palma Rennó pela orientação, pelas oportunidades concedidas, pelas nossas conversas, pela irrestrita confiança e pelo enorme incentivo, sempre. Em cada fase ao seu convívio me proporcionou importantes aprendizados, tanto profissionais como pessoais, aos quais serei sempre grato. Em especial, admiro seu respeito e amor pelas vacas de leite, nos ensinando que estas não são apenas nossos "instrumentos" de trabalho, mas o principal propósito dele e a fonte de inspiração.

Ao Professor Gilberto Kozloski, pela primeira orientação na iniciação científica (IC), pela coorientação no doutorado e pelo exemplo de profissional que muito me espelho.

Ao Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite, o LPBL, que foi a minha principal morada por cinco anos. Foi impossível nesses últimos dias que antecederam a finalização deste trabalho não sentir, ao estar ali, uma enorme nostalgia e carinho por tudo que vivi.

A todas as pessoas que convivi no LPBL ao longo desta caminhada (foram muitas). Além de colegas de trabalho, fiz muitos amigos, e, sobretudo, com todos aprendi. Aos pós-graduandos: José Esler (Zé), Jefferson (Jeffinho), Vitor, Rafael (Bisão), Tiago Del Valle, Gustavo (Boi), Cybele, Elmeson (Mineiro), Pablo, Taíssa, Rodolfo (Badá). Aos alunos de IC: Natasha, Vitor (Matraca), Artur, Marjorie (Cala), Carla (Pink). E aos tantos estagiários.

Em especial, quero agradecer muito a equipe de trabalho que me ajudou virando dias e noites em um experimento que só foi possível devido à força do coletivo e à enorme competência dessas pessoas. Nunca será o bastante o meu agradecimento a vocês. Aos guerreiros e heróis do início ao fim: Thiago Vendramini (Catimbó), Thiago Silva (Pira), Mariana (Mel), Rodrigo (Komixão), Gustavo (Sacudo), Lenita, Fernanda (Barrosã) e Carlos Eduardo (Dado). Aos especiais agregados: Marisa (Bolonha), Bruna e Gabriela (Gabi). Aos que contribuíram em algum momento de forma importante, seja no experimento ou nas posteriores análises: Elissandra, Caio (Bumba), Guilherme (Urubu), Guilherme Gomes,

Paulo, Jéssica, Izabele (Iza), Jennifer, Mariana (Gororoba), Paula (Cannabis), Leonardo (Desfiado), Júlia (Minotauro), Pâmela, Adriano, Tânia, Ana Cano, Giseli, Íris, Leandra, Carol, Bianca (perdão se no momento esqueço de alguém). Aos funcionários do LPBL: Nathália, Diogo, Schimidt, Lucas, Dênis, Leandro, Paulo e demais terceirizados, além da querida Dona Dalva. Muito obrigado a todos, esse trabalho também é de vocês!!!

Às demais pessoas que contribuíram para realização desta pesquisa. Ao trio da UFV, Profa. Dra. Luciana Rennó, Profa. Dra. Maria Ignez Leão e ao Joélcio, pela canulação das vacas e à Prof. Luciana, em especial, também pela ajuda sobre o procedimento de sondagem urinária e incentivo à realização desse. Ao Benedito Rennó pela ajuda na compra das vacas para o experimento. Ao Prof. Dr. Eduardo Birgel Jr. e à Daniela pelo fundamental treinamento e auxílio no cateterismo das vacas. À Profa. Dra. Rosemary de Carvalho da FZEA-USP pelas reuniões e conhecimentos trocados sobre a quitosana. Ao Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva do VNP pelas análises de qPCR, empréstimo do equipamento analisador de fibras e conversas. Ao Prof. Dr. Paulo H. Mazza Rodrigues do VNP pelo importante auxílio nas análises estatísticas e pela cordial e atenciosa forma que sempre me recebeu. À Dra. Lígia, técnica do Lab. de Genômica Funcional pelas análises realizadas e por todos os momentos de apoio e descontração. À Dra. Renata, técnica do Lab. de Bromatologia do VNP pelo auxílio nas análises de cromo. À amiga Mariana Mezzomo e ao LABRUMEN pelo auxílio nas análises de purinas.

Também agradeço a todos os Professores do VNP e de outros Departamentos da USP, responsáveis pelas disciplinas que cursei e que compartilharam dos seus conhecimentos para minha formação profissional. Aos demais Professores e aos funcionários do VNP, em especial João Paulo, Alessandra, Fábia, Lucinéia, Ari e Paula. E a todos os colegas pós-graduandos.

Aos meus amigos que cultivo em Concórdia – SC, Chapecó – SC e Santa Maria – RS (me perdoem não citar todos os nomes) que são muito importantes na minha vida. Faço uma ressalva especial para os do LABRUMEN e da 47ª turma de Zootecnia da UFSM.

Aos amigos que ganhei em Pirassununga – SP. Em especial, Cristian, pelo companheirismo desde o início. Ainda, quase por último, não menos importante, a este trio: Mel, Bruna e Catimbó... perdoem a limitação de caracteres para escrever uma página sobre cada um, mas vocês sabem que eu os amo e que vou leva-los comigo para vida inteira... obrigado, obrigado e obrigado por serem quem são!!!

Aos demais familiares, em especial à vó Amábile, à madrinha Salete (*in memoriam*), aos padrinhos Neri e Silvana, e aos meus primos Arthur e Luana que são meus irmãos.

Por fim, à Guria, minha cãopanheira, e às vacas, por tudo que representam para mim.

“Se você está andando no caminho certo
e está disposto a continuar caminhando,
eventualmente,
você vai progredir.”

Barack Obama

“O caminho não é em linha reta, é em espiral.
Voltamos continuamente às coisas que pensávamos que tínhamos compreendido,
para vermos verdade mais profundas.”

Barry H. Gillespie

RESUMO

ZANFERARI, Filipe. **Quitosana associada a grão de soja integral na alimentação de vacas leiteiras**: I. Digestão, metabolismo e desempenho produtivo; II. Avaliação de metodologias para estimativas da digestibilidade aparente total e produção microbiana ruminal. [Chitosan associated with whole raw soybeans in the dairy cows diets: I. Digestion, metabolism and productive performance; II. Evaluation of techniques for estimates the total-tract apparent digestibility and microbial protein synthesis]. 2017. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

A presente tese foi elaborada em três capítulos, correspondente às seções 2, 3 e 4. No primeiro objetivou-se avaliar a associação de quitosana com grão de soja integral nas dietas sobre o consumo, fermentação ruminal, digestibilidade e metabolismo de nutrientes e seus efeitos sobre a produção de leite, perfil de ácidos graxos do leite e a eficiência produtiva de vacas em lactação. Para tal, 24 vacas multíparas da raça Holandesa, oito dessas com cânula ruminal, foram distribuídas em quadrados latinos 4×4 replicados. Os tratamentos foram obtidos por esquema fatorial 2×2 pela combinação de quitosana e grão de soja integral nas dietas. De modo geral, a associação de quitosana com grão de soja aumentou a eficiência de fermentação ruminal, reduziu as populações bacterianas ligadas à biohidrogenação e aumentou o teor de ácidos graxos insaturados na gordura do leite, mas houve significativa redução do consumo e digestibilidade dos nutrientes, da síntese de proteína microbiana e da produção de leite. No entanto, a adição de quitosana em dietas sem suplementação lipídica pode ser uma boa estratégia nutricional para aumentar a retenção de N e a eficiência alimentar de vacas em lactação, e adicionalmente, aumentar o teor de ácidos graxos insaturados e de *cis*-9, *trans*-11 CLA no leite. No segundo capítulo, o objetivo geral foi avaliar os indicadores externos Cr_2O_3 e TiO_2 e os internos MSi, FDNi e FDAi, estes analisados em diferentes sacos de incubação *in situ*, a partir da acurácia, precisão e robustez das estimativas de excreção fecal em ensaio de digestão com vacas leiteiras consumindo diferentes dietas. Foram utilizadas oito vacas canuladas no rúmen para a realização de coletas totais de fezes com 24, 48 e 72 h de duração. De modo geral, o Cr_2O_3 gerou estimativas acuradas e precisas, no entanto a recuperação fecal e a robustez foram afetadas pelo consumo de extrato etéreo das vacas. O indicador TiO_2 apresentou incompleta recuperação fecal, baixa acurácia, precisão e robustez. Dentre as combinações avaliadas para os indicadores internos, a FDNi em sacos de poliéster teve completa recuperação fecal e gerou as estimativas mais acuradas, precisas e robustas. A falta de acurácia e precisão dos indicadores têm grande impacto final sobre as estimativas de

digestibilidade. No terceiro capítulo, o objetivo foi avaliar o uso da creatinina como indicador do volume urinário para estimativas de excreção total de derivados de purinas como técnica de avaliação da produção microbiana ruminal em vacas leiteiras alimentadas com diferentes dietas. Também foram utilizadas as oito vacas canuladas no rúmen para a realização de coletas totais de urina com 24, 48 e 72 h de duração. De modo geral, a creatinina foi afetada pelas condições experimentais do estudo, incluindo efeito de dieta e variações conforme o período experimental e animais. Apesar da relação entre excreção observada e estimada de derivados de purinas, essa deve ser vista com cautela, em razão de que o volume urinário foi subestimado e que as estimativas não identificaram corretas diferenças entre as dietas, comprometendo as avaliações sobre a produção microbiana ruminal.

Palavras-chave: Aditivo antimicrobiano. Ácidos graxos. Biohidrogenação ruminal. Excreção fecal. Derivados de purinas.

ABSTRACT

ZANFERARI, Filipe. **Chitosan associated with whole raw soybeans in the dairy cows diets:** I. Digestion, metabolism and productive performance; II. Evaluation of techniques for estimates the total-tract apparent digestibility and microbial protein synthesis [Quitosana associada a grão de soja integral na alimentação de vacas leiteiras: I. Digestão, metabolismo e desempenho produtivo; II. Avaliação de metodologias para estimativas da digestibilidade aparente total e produção microbiana ruminal]. 2017. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

The present thesis was elaborated in three chapters, corresponding to sections 2, 3 and 4. In the first one, the aim was to evaluate the association of chitosan (C) and whole raw soybean (WRS) in diets, evaluating the intake, ruminal fermentation, digestibility and nutrient metabolism and its effects on milk production, milk fatty acids profile and the productive efficiency of lactating cows. Twenty four multiparous Holstein cows, eight of them fitted with ruminal cannula, were distributed in a replicated 4 × 4 Latin squares. The treatments were a combination of C and WRS diets arranged in a 2 × 2 factorial design. This association increased the efficiency of ruminal fermentation, reducing the bacterial population responsible for the biohydrogenation and increased the unsaturated fatty acids in milk. The C and WRS diets caused a significant reduction in DMI and nutrient digestibility, in microbial protein synthesis and milk yield. However, the addition of C in diets without a lipid supplementation may be a good nutritional strategy to increase the N retention and increase the food efficiency of lactating cows, and, indeed, to increase the unsaturated fatty acids content, mainly *cis*-9, *trans*-11 CLA. In the second chapter, the objective was to evaluate the external indicators Cr_2O_3 and TiO_2 and the indigestible internal DM, NDF and ADF that were determined in *in situ* different incubation bags from the accuracy, precision and robustness of the fecal excretion estimates in a digestion assay with different dairy cow diets. Eight cows fitted with ruminal cannula were used to perform total fecal collection over 24, 48 and 72 hours. The Cr_2O_3 generated accurate estimates, however, the fecal recovery and robustness were affected by the ether extract intake. The TiO_2 indicator showed incomplete fecal recovery, low accuracy, precision and robustness. Among the combinations for the internal indicators, the iNDF in polyester bags had a complete recovery and generated the most accurate and robust estimates. The lack of accuracy and precision of the indicators have a big impact on the digestibility estimates. In the third chapter, the aim was to evaluate the use of creatinine as an indicator of urinary volume. It would be possible to estimate the total excretion of purine

derivatives to evaluate the ruminal microbial protein synthesis in different cow diets. Also, eight multiparous cows fitted with ruminal cannula were used to make total urine collection over 24, 48 and 72 hours. The creatinine was affected by the study experimental conditions, including dietary effect and variations according to period and animals. The relationship between observed and estimated excretion of purine derivatives should be viewed with caution, because the urinary volume was underestimated and the estimates did not identify the correct differences between diets, that could compromise the evaluations of ruminal microbial production.

Keywords: Antimicrobial additive. Fatty acids. Ruminal biohydrogenation. Faecal excretion. Purine derivatives.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Comportamento do pH (A), concentração de N amoniacal (B) e concentrações de AGCCR (C) e AGCC total (D) ruminais de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral..... 46

Figura 2.2 – Comportamento das concentrações de acetato (A), propionato (B), butirato (C) e valerato (D) ruminais de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral. 47

Figura 2.3 – Comportamento da relação entre concentração de acetato e propionato (A) e das proporções molares de acetato (B), propionato (C) e butirato (D) ruminais de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral. 48

Figura 3.1 – Efeito da adição de quitosana e grão de soja integral nas dietas de vacas em lactação sobre a excreção fecal (A) e digestibilidade aparente total da MS (B), MO (C), PB (D), EE (E) e FDN (F) ao longo de 24, 48 e 72 h de coletas totais de fezes. 93

Figura 3.2 – Valores absolutos de erro padrão da média (A) e como proporção da respectiva média (B) para excreção fecal e digestibilidade aparente total dos nutrientes ao longo de 24, 48 e 72 h de coletas totais de fezes de vacas em lactação. 95

Figura 3.3 – Avaliação da interação entre indicador e saco de incubação sobre a recuperação fecal da MSi, FDNi e FDAi em amostras de 72 h de coletas totais de fezes de vacas em lactação. 97

Figura 3.4 – Avaliação dos vieses das estimativas de excreção fecal (A) e digestibilidade aparente total da FDN (B) de diferentes indicadores classificados com base na acurácia e precisão em estudo com vacas em lactação. 109

Figura 4.1 – Volumes urinários observados (A) e estimados (B) em 24, 48 e 72 h de coleta total de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral. 134

Figura 4.2 – Efeito do tipo de protocolo de coleta de urina sobre os valores observados e estimados de volume urinário de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral. 135

Figura 4.3 – Relação entre volume urinário (VU) observado em 72 h de coleta total e VU estimado com uso da creatinina em amostras de 72 de coleta total (A), amostras pontuais compostas (B) e pontuais *spot* (C) de vacas em lactação. 137

Figura 4.4 – Erro padrão da média como proporção da respectiva média para excreção de creatinina, volume urinário (VU) observado e estimado ao longo de 24, 48 e 72 h de coletas totais de urina de vacas em lactação. 138

Figura 4.5 – Excreção de alantoína (A), ácido úrico (B) e derivados de purinas (C) em 24, 48 e 72 h de coletas totais de urina de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral. 139

Figura 4.6 – Efeito do tipo de protocolo de coleta de urina sobre a excreção de alantoína (A), ácido úrico (B) e derivados de purinas (C) de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral. 140

Figura 4.7 – Relação entre excreção urinária de derivados de purinas (DP) observados em 72 h de coleta total e estimados com uso da creatinina como indicador do volume urinário em amostras de coletas pontuais, composta (A) e *spot* (B), de vacas em lactação. 143

Figura 4.8 – Erro padrão da média como proporção da respectiva média para excreção de alantoína, ácido úrico e derivados de purinas ao longo de 24, 48 e 72 h de coletas totais de urina de vacas em lactação. 144

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Proporção de ingredientes, composição química e perfil de ácidos graxos das dietas basais utilizadas no experimento (% da MS, exceto quando indicado) 33

Tabela 2.2 – Composição química e perfil de ácidos graxos dos ingredientes das dietas basais utilizadas no experimento (% da MS, exceto quando indicado)..... 34

Tabela 2.3 – Consumo e digestibilidade aparente total dos nutrientes de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral (LSM; consumo, n = 96; digestibilidade, n = 32[1]) 44

Tabela 2.4 – Fermentação ruminal de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral (LSM; n = 224[1]) 49

Tabela 2.5 – População relativa de bactérias ruminais de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral (LSM; n = 32[1]) 50

Tabela 2.6 – Síntese de N microbiano de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral (LSM; n = 32[1]) 51

Tabela 2.7 – Utilização de N de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral (LSM; n = 32[1]) 52

Tabela 2.8 – Balanço de energia de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral (LSM; n = 96[1]) 53

Tabela 2.9 – Perfil metabólico sanguíneo de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral (LSM; n = 96[1]) 54

Tabela 2.10 – Produção e composição do leite e eficiência produtiva de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral (LSM; eficiência de N, n = 32; demais variáveis, n = 96[1]) 55

Tabela 2.11 – Perfil de ácidos graxos da gordura do leite de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral (LSM; n = 96[1]) 57

Tabela 3.1 – Componentes indigestíveis *in situ* dos ingredientes e das dietas basais utilizadas no ensaio de digestibilidade em função dos diferentes sacos de incubação (% da MS)..... 87

Tabela 3.2 – Efeito da duração do período de coleta total em ensaio de digestão de curto prazo sobre a excreção fecal e digestibilidade aparente total dos nutrientes de vacas em lactação (LSM; n = 96[1]) 94

Tabela 3.3 – Recuperação fecal (RF) dos indicadores internos MSi, FDNi e FDAi avaliada em amostras de 72 h de coleta total de fezes em função do tipo de saco de incubação *in situ* e da adição de quitosana nas dietas de vacas em lactação (LSM; n = 384[1]) 96

Tabela 3.4 – Recuperação fecal dos indicadores externos Cr_2O_3 e TiO_2 em função da adição de quitosana e grão de soja integral nas dietas e da duração do período de coleta total de fezes em vacas em lactação (LSM; n = 96[1]) 98

Tabela 3.5 – Acurácia e precisão das estimativas de excreção fecal dos indicadores internos MSi, FDNi e FDAi analisados *in situ* em diferentes sacos de incubação, com valores apresentados de acordo com a presença ou não de quitosana nas dietas de vacas em lactação (n = 384[1]) 100

Tabela 3.6 – Acurácia e precisão das estimativas de excreção fecal dos indicadores externos Cr_2O_3 e TiO_2 a partir de procedimentos de coletas totais e pontuais de fezes de vacas em lactação (n = 96[1]) 101

Tabela 3.7 – Relação entre excreção fecal (EF) observada vs. estimada e viés linear das estimativas dos indicadores internos MSi, FDNi e FDAi analisados *in situ* a partir de diferentes sacos de incubação, com valores apresentados de acordo com a presença ou não de quitosana nas dietas de vacas em lactação (n = 384[1]) 103

Tabela 3.8 – Relação entre excreção fecal (EF) observada vs. estimada e viés linear das estimativas dos indicadores externos Cr_2O_3 e TiO_2 a partir de procedimentos de coletas totais e pontuais de fezes de vacas em lactação (n = 96[1]) 104

Tabela 3.9 – Robustez das estimativas de excreção fecal dos indicadores internos MSi, FDNi e FDAi analisados *in situ* a partir de diferentes sacos de incubação, com valores apresentados de acordo com a presença ou não de quitosana nas dietas de vacas em lactação (n = 384[1]) 106

Tabela 3.10 – Robustez das estimativas dos indicadores externos Cr_2O_3 e TiO_2 a partir de procedimentos de coletas totais e pontuais de fezes de vacas em lactação (n = 96[1]) 107

Tabela 3.11 – Impacto das avaliações de acurácia e precisão sobre as estimativas de digestibilidade aparente total dos nutrientes utilizando diferentes indicadores internos (MSi, FDNi e FDAi) e externos (Cr_2O_3 e TiO_2) de excreção fecal, classificados como acurados e/ou precisos (↑) e não acurados e/ou não precisos (↓), em estudo com vacas em lactação (indicadores internos, n = 128; indicadores externos, n = 96[1]) 108

Tabela 4.1 – Efeito dos fatores experimentais sobre a excreção urinária de creatinina em 24, 48 e 72 h de coletas totais, concentração sanguínea e taxa de depuração da creatinina de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral (LSM; excreção de creatinina, n = 96; demais variáveis, n = 32[1]) 134

Tabela 4.2 – Efeitos da duração do período de coleta total de urina sobre a excreção de creatinina e volume urinário (VU) observado e estimado, e do tipo de protocolo de coleta sobre os valores observados e as estimativas de VU de vacas em lactação (LSM; n = 96[1]) 136

Tabela 4.3 – Efeitos da duração do período de coleta total e do tipo de protocolo de coleta de urina sobre a excreção de alantoína, ácido úrico e derivados de purinas totais de vacas em lactação (LSM; n = 96[1]) 142

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Ácido(s) graxo(s)
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AGCCR	Ácidos graxos de cadeia curta e ramificada
AGCI	Ácidos graxos de cadeia ímpar
AGMI	Ácidos graxos monoinsaturados
AGPI	Ácidos graxos poliinsaturados
AGS	Ácidos graxos saturados
AST	Aspartato aminotransferase
BE	Balanço de energia
CI	Consumo do indicador
CLA	Ácido linoleico conjugado
CNF	Carboidratos não fibrosos
DEL	Dias em lactação
DHA	Ácido docosaexaenoico
DP	Derivados de purinas
ED	Energia digestível
ED_{1x}	Energia digestível em nível de mantença
EE	Extrato etéreo
EF	Excreção fecal
EFI	Excreção fecal do indicador
ELl	Energia líquida de lactação
EM	Energia metabolizável
EPM	Erro padrão da média
ESN	Eficiência de síntese de nitrogênio microbiano
EUN	Eficiência de uso de nitrogênio
FDA	Fibra em detergente ácido
FDAi	Fibra em detergente ácido indigestível
FDN	Fibra em detergente neutro
FDNi	Fibra em detergente neutro indigestível
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
GGT	Gama glutamil transferase
LCE	Produção de leite corrigida para o teor de energia

LCG	Produção de leite corrigida para o teor de gordura
LDA	Lignina
LPBL	Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite
LSM	*Least squares means*
MO	Matéria orgânica
MOADR	Matéria orgânica aparentemente degradada no rúmen
MS	Matéria seca
MSi	Matéria seca indigestível
NDT	Nutrientes digestíveis totais
NDT_{1X}	Nutrientes digestíveis totais em nível de mantença
NDTf	Nutrientes digestíveis totais "fermentáveis"
NDTp	Nutrientes digestíveis totais em nível produtivo
NIDA	Nitrogênio insolúvel em detergente ácido
NIDN	Nitrogênio insolúvel em detergente neutro
Nmic	Nitrogênio microbiano
$N\text{-}NH_3$	Nitrogênio amoniacal
NNP	Nitrogênio não proteico
Pabs	Purinas microbianas absorvidas
PB	Proteína bruta
PDR	Proteína degradável no rúmen
PV	Peso vivo
RF	Recuperação fecal
RQMEP	Raiz quadrada média do erro de predição
$RQMEP_{adj}$	RQMEP corrigida para falta de acurácia
SCD1	Estearoil-CoA dessaturase
TNT	Tecido não-tecido
USP	Universidade de São Paulo
VNP	Departamento de Nutrição e Produção Animal
VU	Volume urinário

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO GERAL** 23

2 **RESPOSTAS DIGESTIVAS E METABÓLICAS, DESEMPENHO PRODUTIVO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE À ADIÇÃO DE QUITOSANA NA DIETA DE VACAS LEITEIRAS CONTENDO GRÃO DE SOJA INTEGRAL** 27

2.1 RESUMO 27

2.2 ABSTRACT 28

2.3 INTRODUÇÃO 29

2.4 MATERIAL E MÉTODOS 30

2.4.1 **Local, instalações e animais** 31

2.4.2 **Tratamentos e delineamento experimental** 31

2.4.3 **Consumo de nutrientes** 32

2.4.4 **Análises de alimentos** 32

2.4.5 **Digestibilidade aparente total dos nutrientes** 35

2.4.6 **Fermentação ruminal** 36

2.4.7 **População relativa de bactérias ruminais** 36

2.4.8 **Síntese de N microbiano e utilização de N** 38

2.4.9 **Balanço de energia e eficiência energética** 40

2.4.10 **Perfil metabólico sanguíneo** 41

2.4.11 **Produção e composição do leite** 41

2.4.12 **Perfil de ácidos graxos da gordura do leite** 42

2.4.13 **Análises estatísticas** 42

2.5 RESULTADOS 44

2.5.1 **Consumo e digestibilidade** 44

2.5.2 **Fermentação ruminal** 45

2.5.3 **População relativa de bactérias ruminais** 49

2.5.4 **Síntese de N microbiano** 50

2.5.5 **Utilização de N** 51

2.5.6 **Balanço de energia** 52

2.5.7 **Perfil metabólico sanguíneo** 53

2.5.8 **Produção e composição do leite e eficiência produtiva** 54

2.5.9 **Perfil de ácidos graxos do leite** 56
2.6 DISCUSSÃO 58
2.7 CONCLUSÕES 70
2.8 LITERATURA CITADA 70

3 **INDICADORES DE EXCREÇÃO FECAL PARA ESTIMATIVAS DE DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL EM VACAS LEITEIRAS: ASPECTOS METODOLÓGICOS E ESTUDO DE ACURÁCIA, PRECISÃO E ROBUSTEZ** 78
3.1 RESUMO 78
3.2 ABSTRACT 79
3.3 INTRODUÇÃO 80
3.4 MATERIAL E MÉTODOS 82
3.4.1 **Local, instalações e animais** 82
3.4.2 **Delineamento experimental e dietas** 83
3.4.3 **Consumo de nutrientes e análises de alimentos** 83
3.4.4 **Coletas de excreção fecal** 84
3.4.5 **Fornecimento e dosagem fecal de indicadores externos** 85
3.4.6 **Incubação *in situ* e análises dos indicadores internos** 85
3.4.7 **Cálculos** 87
3.4.8 **Acurácia, precisão e robustez das estimativas** 88
3.4.9 **Análises estatísticas** 89
3.5 RESULTADOS 92
3.5.1 **Duração do período de coleta total** 92
3.5.2 **Recuperação fecal dos indicadores** 96
3.5.3 **Acurácia, precisão e robustez dos indicadores** 99
3.6 DISCUSSÃO 110
3.7 CONCLUSÕES 120
3.8 LITERATURA CITADA 120

4 **USO DA CREATININA COMO INDICADOR DO VOLUME URINÁRIO PARA ESTIMATIVAS DA EXCREÇÃO TOTAL DE DERIVADOS DE PURINAS COMO TÉCNICA DE AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO MICROBIANA RUMINAL EM VACAS LEITEIRAS** 124

4.1 RESUMO 124
4.2 ABSTRACT 125
4.3 INTRODUÇÃO 126
4.4 MATERIAL E MÉTODOS 127
4.4.1 **Local, instalações e animais** 128
4.4.2 **Delineamento experimental e dietas** 128
4.4.3 **Coletas totais e pontuais de urina** 129
4.4.4 **Análises químicas** 130
4.4.5 **Cálculos** 130
4.4.6 **Análises estatísticas** 131
4.5 RESULTADOS 133
4.5.1 **Excreção de creatinina e estimativas de volume urinário** 133
4.5.2 **Estimativas de derivados de purinas** 138
4.6 DISCUSSÃO 144
4.7 CONCLUSÕES 151
4.8 LITERATURA CITADA 152

CONSIDERAÇÕES FINAIS 156
REFERÊNCIAS GERAIS 157
APÊNDICE 160

1 INTRODUÇÃO GERAL

As rápidas transformações que têm ocorrido no cenário da produção de leite mundial torna o atual notadamente distinto daquele característico até poucas décadas atrás. Nos últimos 50 anos, por exemplo, a produção de leite mundial duplicou e, de forma consistente, o leite de vaca fresco e integral passou a assumir papel de destaque no *ranking* mundial de commodities agrícolas por valor de produção, oscilando entre o posto de primeiro ou segundo colocado durante a última década (FAO, 2013).

No entanto, as mudanças não se caracterizam apenas em termos de volume de produção, mas consideravelmente em produtividade. Com as atuais práticas de manejo e sistemas de produção, aliado às "modernas" vacas leiteiras, em países como os Estados Unidos, por exemplo, para se obter atualmente um bilhão de kg de leite seriam necessários apenas 21% das vacas e 23% dos alimentos totais que eram utilizados em meados da década de 50 para se produzir a mesma quantidade (CAPPER et al., 2009). Essa referida vaca leiteira moderna produz hoje quatro vezes mais do que produzia há 100 anos e com isso particiona três vezes mais energia para produção de leite do que para mantença ao longo da sua vida produtiva (VANDEHAAR e St-PIERRE, 2006).

As melhorias na produtividade das vacas leiteiras são explicadas em grande parte pelo aumento do potencial genético dos animais, que gradativamente tem permitido aumentar a proporção da ingestão total do alimento que está sendo usado para produção de leite ao invés da mantença (VANDEHAAR et al., 2016). Contudo, o aumento do potencial genético foi acompanhado do aumento da necessidade energética das vacas, e consequentemente, manejo e nutrição tornaram-se ferramentas fundamentais para manutenção da produtividade.

Em muitas situações, a elevada necessidade energética das vacas leiteiras de alta produção tem excedido a capacidade de consumo de energia dietética, sendo este frequentemente atribuído como fator limitante para produção de leite (WEISS e PINOS-RODRÍGUEZ, 2009), ficando aquém do máximo potencial genético dos animais. Como alternativa, comumente são adotadas estratégias nutricionais que visam aumentar a densidade energética das dietas e/ou a eficiência de utilização da energia consumida. Adicionalmente, como os custos de alimentação contribuem com até 60% dos custos totais de produção de leite, melhorar a eficiência da conversão de alimentos em leite pode ter um impacto significativo sobre a rentabilidade da produção leiteira (CONNOR, 2015).

Dentre as estratégias nutricionais, destaca-se o emprego de substâncias aditivas com potencial de modular a fermentação ruminal através de alterações na sua população

microbiana, tendo como consequência a otimização do processo digestivo. Dentre os aditivos com atividade antimicrobiana, destacam-se os ionóforos como os mais utilizados e amplamente estudados. O uso deste aditivo, dentre outros efeitos, melhora e eficiência alimentar, diminui a produção de metano e minimiza os riscos de ocorrência de distúrbios metabólicos (RUSSEL e STROBEL, 1989; IPHARRAGUERRE e CLARK, 2003).

No entanto, por serem classificados como antibióticos, o uso de ionóforos foi banido a partir de 2006 pela União Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2003), em virtude de que o uso rotineiro de antibióticos na alimentação animal poderia resultar em resíduos nos produtos derivados e desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes. Desde então, mesmo em outros países, ionóforos têm enfrentado reduzida aceitação social. Por essa razão, pesquisas com aditivos antimicrobianos alternativos têm sido estimuladas no intuito de encontrar compostos com propriedades antimicrobianas similares ou superiores aos ionóforos e que podem ser utilizados sem possíveis riscos à saúde humana. Dentre esses, foi proposta a utilização de quitosana como aditivo modulador da fermentação ruminal e do processo digestivo a partir de resultados promissores *in vitro* (GOIRI et al., 2009).

A quitosana (polímero de N-acetil-D-glicosamina) é um biopolímero natural derivado da desacetilação da quitina, e esta, por sua vez, é o biopolímero mais abundante da natureza após a celulose, sendo um 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). A atividade antimicrobiana da quitosana é bem reconhecida contra diversas bactérias e fungos, sendo influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos da molécula de quitosana envolvem a densidade de cargas positivas ou grau de desacetilação, peso molecular ou grau de polimerização, pKa, solubilidade, características hidrofóbicas e hidrofílicas, e capacidade quelante (SENEL et al., 2004; KONG et al., 2010). Os fatores extrínsecos estão relacionados aos microrganismos, incluindo espécies e fases de crescimento, e ao meio, sendo variável conforme o pH, força iônica, temperatura e tempo de reação (KONG et al., 2010).

Apesar de alguns estudos *in vivo* (GOIRI et al., 2010a; ARAÚJO et al., 2015; PAIVA et al., 2016) já terem demonstrado o potencial da quitosana na melhoria da eficiência do processo de fermentação ruminal, o conhecimento ainda é escasso. O seu efeito em dietas de vacas leiteiras e com suplementação lipídica, por exemplo, ainda é muito pouco conhecido.

Conforme mencionado anteriormente, outra estratégia nutricional para melhor atender as necessidades energéticas de vacas leiteiras de alta produção é aumentar a densidade de energia das dietas, cuja suplementação lipídica é comumente utilizada (RABIEE et al., 2012).

Assim como ionóforos, quitosana, entre outros aditivos, os ácidos graxos exercem efeitos sobre o metabolismo ruminal, pois têm a capacidade de selecionar populações microbianas (MAIA et al., 2007, 2010). Para diminuir a toxicidade dos ácidos graxos insaturados sobre os mesmos, microorganismos do rúmen realizam extensivas transformações pelos processos de lipólise e biohidrogenação, fazendo com que o perfil de ácidos graxos que flui para o duodeno seja composto em sua maioria pelas formas saturadas (KLIEM e SHINGFIELD, 2016).

Entretanto, aditivos antimicrobianos podem reduzir a lipólise e biohidrogenação ruminal devido sua capacidade de seleção sobre os microorganismos que atuam nesses processos, conforme já observado em vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo suplementação lipídica e adição de ionóforos (SILVA et al., 2007; HE et al., 2012) e indícios correlatos para quitosana em testes *in vitro* (GOIRI et al., 2010b). Sendo assim, há possibilidade de que a quitosana quando associada à suplementação lipídica em dietas de vacas leiteiras também apresente potencial de diminuir a completa biohidrogenação de ácidos graxos insaturados, como um efeito adicional à provável melhoria da eficiência fermentativa.

Adicionalmente, para recomendação de novas tecnologias que aumentem a eficiência produtiva de vacas leiteiras, são necessários estudos prévios que possuam métodos de avaliação precisos, capazes de corretamente quantificar as modificações que essas potenciais estratégias causam nos processos fermentativos, digestivos e metabólicos. Isso implica na escolha de adequadas metodologias experimentais. Apesar de ser um assunto bastante antigo e que frequentemente é reportado na literatura, existem controvérsias quanto às metodologias utilizadas para colheita de amostras da excreção fecal e urinária em experimentos de nutrição de ruminantes, especialmente para animais de grande porte, em pastejo e vacas em lactação, nos quais essas avaliações são mais difíceis de realização e os métodos alternativos são mais comumente empregados.

A determinação da digestibilidade aparente total, por exemplo, importante parâmetro para avaliação do aproveitamento de dietas pelos animais e, consequentemente, da eficiência de uso de nutrientes, pode ser realizada de forma direta ou indireta. De forma direta, a avaliação consiste em quantificar o total de nutrientes ingeridos e subtrair pelo total excretado pelos animais, mediante coleta total de fezes. Alternativamente, estima-se a digestibilidade de forma indireta utilizando de indicadores, a partir de amostragens pontuais de fezes, não necessitando o manuseio de grandes quantidades de material.

Outra importante variável nutricional nos estudos com ruminantes, mas que também possui entraves metodológicos, é a estimativa da síntese de proteína microbiana ruminal. O fluxo de proteína microbiana para o duodeno pode ser considerado o indicador mais

importante e sensível da otimização do metabolismo ruminal em vacas leiteiras de alta produção (TAS e SUSENBETH, 2007). Porém, a estimativa da oferta de proteína microbiana para o duodeno é uma avaliação de grande incerteza em todos os sistemas nutricionais (NRC, 2001), e dentre os métodos disponíveis de estimação, todos possuem alguma limitação. A excreção total de derivados de purinas (DP) na urina e no leite é considerada um método alternativo aos convencionais, ditos invasivos, já que não necessita da utilização de animais canulados pós-ruminalmente (CHEN e GOMES, 1992). Apesar de mais simples e menos oneroso, esse método requer a quantificação do volume urinário (VU) para estimativa da excreção total dos DP. Além de trabalhosa, a coleta total de urina possui agravantes no caso específico de fêmeas, pois é necessário o uso de cateteres urinários e aparatos de coleta, podendo representar dificuldades, além de desconforto aos animais, principalmente para vacas em lactação (KURIEN et al., 2004). Em virtude dessas dificuldades, a técnica de coletas pontuais de urina tem sido muito aplicada, a qual utiliza a creatinina como indicador interno para estimativa do VU.

Apesar do volume de informações já existentes sobre indicadores de excreção fecal e urinária, a variabilidade de resultados compromete a escolha e segurança de aplicação dessa técnica. Diversidade de informações para indicadores externos de excreção fecal são mais comumente associadas à variação no perfil nictemeral de excreção (OWENS e HANSON, 1992; TITGEMEYER 1997, et al., 2001; KOZLOSKI et al., 2006), enquanto que para os internos a falta de padronização nos procedimentos metodológicos é atribuída como a grande e principal causa de variação de resultados (BERCHIELLI et al., 2005; ÅKERLIND et al., 2011; KRIZSAN et al., 2015). Dúvidas sobre a coleta pontual de urina referem-se à divergência para constância de excreção da molécula de creatinina dependendo das condições experimentais do estudo e das características fisiológicas dos animais (SHINGFIEL e OFFER, 1998; VALADARES et al., 1999; WHITTET et al., 2004; LIU e McMENIMAN, 2006; SILVA et al., 2012).

Portanto, a possibilidade de simplificar as metodologias experimentais com a utilização de coletas pontuais e com o emprego de indicadores, deve ser bem avaliada a partir da análise da acurácia e precisão das estimativas geradas. Complementarmente, avaliar o modo e a extensão em que os erros são influenciados pela variação de fatores relacionados às condições experimentais permite uma análise mais completa da viabilidade de aplicação dessas técnicas alternativas.

2 RESPOSTAS DIGESTIVAS E METABÓLICAS, DESEMPENHO PRODUTIVO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE À ADIÇÃO DE QUITOSANA NA DIETA DE VACAS LEITEIRAS CONTENDO GRÃO DE SOJA INTEGRAL

2.1 RESUMO

Foi avaliada a associação de quitosana com grão de soja integral nas dietas sobre o consumo, fermentação ruminal, digestibilidade e metabolismo de nutrientes e seus efeitos sobre a produção de leite, perfil de ácidos graxos do leite e a eficiência produtiva de vacas em lactação. Para tal, 24 vacas multíparas da raça Holandesa (141 ± 37,1 dias em lactação (DEL), 38,8 ± 6,4 kg de leite/dia e 615 ± 81,1 kg de PV), oito dessas com cânula ruminal, foram blocadas de acordo com a produção de leite, PV, DEL e presença de cânula para serem distribuídas em quadrados latinos 4×4 replicados. Os tratamentos foram obtidos por esquema fatorial 2×2 pela combinação de quitosana (0 e 4 g/kg de MS da dieta) e grão de soja integral (0 e 140 g/kg de MS da dieta). De modo geral, houve interação para consumo e digestibilidade dos nutrientes, com redução pela adição de quitosana à dieta com grão de soja. Tanto a quitosana como o grão de soja alteraram a fermentação e a população ruminal, com destaque para maior propionato e menor acetato para ambos. Houve efeito e tendência de diminuição de *Butyrivibrio* e *B. proteoclasticus*, respectivamente, para quitosana, enquanto o grão de soja aumentou *S. bovis* e diminuiu *Butyrivibrio* e *F. succinogenes*. Interação foi observada para síntese de Nmic e secreção de N no leite, com redução pela combinação de quitosana e grão de soja. A quitosana ainda diminuiu o total de N secretado e excretado. O grão de soja aumentou o balanço de ELl, no entanto reduziu a glicemia sanguínea. As produções de leite e de sólidos, e a eficiência energética diminuíram com a combinação de quitosana e grão de soja. A eficiência de N diminuiu com grão de soja e a eficiência alimentar aumentou com a adição de quitosana na dieta controle, mas não diferiu das dietas com grão de soja. Tanto a quitosana como o grão de soja aumentaram o teor de ácidos graxos insaturados no leite, sendo que a quitosana aumentou o *cis*-9, *trans*-11 CLA. Apesar de melhorarem a eficiência da fermentação e reduzirem bactérias ligadas à biohidrogenação ruminal, elevando os ácidos graxos insaturados presentes no leite, a associação de quitosana com grão de soja afeta negativamente a digestão, metabolismo e a produção de vacas leiteiras.

Palavras-chave: Aditivo antimicrobiano. Ácidos graxos. Fermentação ruminal. Digestibilidade. Produção de leite.

DIGESTIVE AND METABOLIC RESPONSES, PRODUCTIVE PERFORMANCE AND MILK FATTY ACIDS PROFILE TO THE ADDITION OF CHITOSAN IN THE DAIRY COWS DIETS CONTAINING WHOLE RAW SOYBEANS

2.2 ABSTRACT

Several measures like intake, digestibility, ruminal fermentation and nutrient metabolism and their effects on milk production, milk fatty acid profile and productive efficiency were used to evaluate the effect of the combination of chitosan (C) and whole raw soybeans (WRS) in dairy cows diets. Multiparous Holstein cows (n = 24; 141 ± 37.1 DIM, 38.8 ± 6.4 kg of milk / day and 615 ± 81.1 kg BW) and these, eight ruminally cannulated, were blocked according to milk production, BW, DIM and presence or absence of the cannula and assigned to replicated 4 × 4 Latin squares. Treatments were a combination of C (0 and 4 g / kg DM basis) and WRS (0 and 140 g/kg DM basis) in a 2 × 2 factorial arrangement. There was significant interaction between nutrient intake and digestibility, with reduction of both when the C was added to the WRS diet. Indeed, they altered the fermentation and the ruminal population, resulting in an increase of propionate and a decrease of acetate for both treatments inclusions. There was an effect of reduction of *Butyrivibrio* and a trend of reduction of *B. proteoclasticus* when the C was included, while the WRS increased *S. bovis* and decreased *Butyrivibrio and F. succinogenes*. The combination of C and WRS caused a reduction in microbial N synthesis and N secretion in milk. Further, the C decreased the total N secreted and excreted. WRS increased the NEL balance, however, it reduced the blood glucose. The combination of both treatments also decreased the solids and milk production and the energy efficiency. The efficiency of N decreased with the WRS addition and the food efficiency increased with the C when compared to the control diet, but did not differ from WRS diets. Both C and WRS inclusions increased the unsaturated fatty acids in milk, in which the C increased the *cis*-9, *trans*-11 CLA. Although the treatments have increased the fermentation efficiency, reduced the bacteria associated with ruminal biohydrogenation and increased fatty acids in milk, the combination of chitosan and whole soybean negatively affects the digestion, metabolism and milk yield of dairy cows.

Keywords: Antimicrobial additive. Fatty acids. Rumen fermentation. Digestibility. Milk yield.

2.3 INTRODUÇÃO

Vacas leiteiras de alta produção possuem elevada necessidade energética, que muitas vezes pode exceder sua capacidade de consumo de energia dietética, sendo este frequentemente atribuído como fator limitante para produção de leite (WEISS e PINOS-RODRÍGUEZ, 2009), ficando aquém do máximo potencial genético de produção. Como alternativa, comumente são adotadas estratégias nutricionais que visam aumentar a eficiência de utilização da energia consumida e/ou a densidade energética das dietas.

O processo de fermentação ruminal apresenta ineficiências energéticas, como a produção de metano, cujas perdas podem ser diminuídas por meio da manipulação da população microbiana do rúmen e modulação das vias metabólicas fermentativas (CALSAMIGLIA et al., 2007). Os ionóforos antibióticos têm sido muito bem sucedidos na melhoria da eficiência fermentativa ruminal, aumentando a produção de propionato e a disponibilidade de energia (IPHARRAGUERRE e CLARK, 2003). No entanto, o uso de antibióticos como promotores de crescimento na alimentação animal tem enfrentado reduzida aceitação social, devido aos possíveis resíduos nos produtos derivados e ao desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes, estando inclusive banidos na União Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2003). Por essa razão, pesquisas com aditivos antimicrobianos alternativos têm sido estimuladas. Dentre esses, a quitosana tem demonstrado potencial promissor devido suas propriedades antimicrobianas de amplo espectro, contra diversas bactérias, fungos e leveduras (KONG et al., 2010).

A quitosana (polímero de N-acetil-D-glicosamina) é um polímero natural, de característica policatiônica, derivado da desacetilação da quitina, o polissacarídeo mais abundante da natureza após a celulose e o componente principal do exoesqueleto de crustáceos e insetos (SENEL et al., 2004). O uso da quitosana como aditivo na nutrição de ruminantes foi inicialmente proposto por Goiri et al. (2009), que observaram mudanças no padrão de fermentação ruminal *in vitro*. Posteriormente, estudos *in vivo* (GOIRI et al., 2010a; ARAÚJO et al., 2015; PAIVA et al., 2016) reforçaram o potencial da quitosana em modular a digestão ruminal. No entanto, os estudos com quitosana para ruminantes ainda são escassos. O seu efeito em dietas de vacas leiteiras e com suplementação lipídica, por exemplo, ainda é muito pouco conhecido.

A suplementação lipídica é uma estratégia comumente utilizada para aumentar a densidade energética das dietas de vacas em lactação. No entanto, similar à quitosana, os ácidos graxos (AG) exercem efeitos sobre o metabolismo ruminal, em especial AG

insaturados, os quais têm maior toxicidade a determinadas populações microbianas (MAIA et al., 2007, 2010). Por este motivo, microorganismos do rúmen são responsáveis por uma extensiva transformação dos AG insaturados a partir dos processos de lipólise e biohidrogenação. A magnitude do efeito sobre a fermentação ruminal vai depender, dentre outras características, da taxa de liberação de AG insaturados dos alimentos e sua exposição aos microorganismos ruminais (NRC, 2001). O fornecimento de AG na forma de sementes inteiras de oleaginosas tem menores efeitos sobre a fermentação ruminal se comparados às sementes moídas (WELD e ARMENTANO, 2017) ou na forma de óleos vegetais (CHILLIARD et al., 2009). Portanto, esse tipo de suplementação lipídica é um possível mecanismo de diminuição dos efeitos negativos de AG insaturados sobre a digestão ruminal e aumento do fluxo duodenal e deposição dos mesmos no leite. O aumento de AG insaturados no leite tem uma importante implicação para a saúde humana, visto que o consumo de AG saturados mais facilmente predispõe a incidência de doenças cardiovasculares e metabólicas (FAO, 2010).

Adicionalmente, aditivos antimicrobianos podem ter influência sobre os processos de lipólise e biohidrogenação devido sua capacidade de modificar a população ruminal. Apesar de informações incipientes, Goiri et al. (2010b) observaram que a quitosana diminuiu a biohidrogenação *in vitro* e aumentou a concentração de AG insaturados. No entanto, até o presente momento, não há informações de estudos que avaliaram a combinação de fontes de AG de menor disponibilidade ruminal e quitosana como potencial aditivo para manipulação de bactérias biohidrogenantes nas dietas de vacas leiteiras. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a associação de quitosana com grão de soja integral nas dietas sobre o consumo, fermentação ruminal, digestibilidade e metabolismo de nutrientes e seus efeitos sobre a produção de leite, perfil de ácidos graxos da gordura do leite e a eficiência produtiva de vacas em lactação.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais aplicados neste estudo seguiram os "Princípios Éticos na Experimentação Animal", recomendados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), de acordo com o protocolo de nº 3059/2013.

2.4.1 Local, instalações e animais

O experimento foi conduzido nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da FMVZ-USP, em Pirassununga - SP, no período de 14 de setembro a 14 de dezembro de 2013. A localização geográfica do LPBL é 21º 57' 28" de latitude sul, 47º 27' 21" de longitude oeste e altitude de 635 metros, com clima da região classificado como tropical.

Foram utilizadas 24 vacas da raça Holandesa, multíparas, com 141 ± 37,1 dias em lactação, 38,8 ± 6,4 kg de leite/dia e 615 ± 81,1 kg de peso vivo (PV) ao início do experimento. Destas vacas, oito foram implantadas cirurgicamente com cânula ruminal, 60 dias antes do início do experimento. As vacas foram alojadas em estábulo tipo *free-stall* com ventilação forçada, porém adaptado com baias individuais de 17,5m^2 de área e providas de camas de areia, sendo ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia, as 6 h e as 16 h.

2.4.2 Tratamentos e delineamento experimental

Foi utilizado delineamento em quadrado latino 4×4 replicado, balanceados para efeitos de *carryover* com períodos de 23 dias, sendo 15 dias de adaptação e 8 dias para coletas de amostras e mensuração de variáveis. As vacas foram blocadas e distribuídas aos quadrados com base na produção de leite, dias em lactação e peso vivo ao início do experimento. Foi realizada ainda uma casualização restrita para as vacas canuladas no rúmen, de modo que fossem alocadas em apenas dois quadrados.

Para composição dos tratamentos, foram formuladas duas dietas basais, isonitrogenadas, com diferentes teores de extrato etéreo a partir da adição de grão de soja integral, de forma a atenderem as exigências nutricionais de vacas em lactação com média de 610 kg de PV, 35,0 kg de leite e 3,5% de gordura no leite (NRC, 2001; Tabela 2.1). As duas dietas basais foram acrescidas ou não de quitosana. Deste modo, os tratamentos foram obtidos por um esquema fatorial 2×2, a partir da combinação de dois níveis de quitosana (0 e 4 g/kg de matéria seca (MS) da dieta) em dietas contendo dois níveis de inclusão de grão de soja integral (0 e 140 g/kg de MS da dieta), como segue: CO-Q) Controle, composta por uma dieta sem suplementação lipídica e sem adição de quitosana; CO+Q) Quitosana, composta por dieta sem suplementação lipídica e com adição de quitosana; GS-Q) Grão de soja, composta por dieta contendo suplementação lipídica e sem adição de quitosana; e GS+Q) Grão de soja e Quitosana, composta por dieta contendo suplementação lipídica e com adição de quitosana.

A proporção volumoso:concentrado das dietas foi 50:50, cuja fonte de volumoso era silagem de milho. A dose utilizada de 4 g de quitosana/kg de MS da dieta representa, aproximadamente, 150 mg/kg de PV, de acordo com Araújo et al. (2015). A quantidade diária de quitosana por vaca foi ajustada com base no consumo de MS no dia anterior, dividida em duas porções, fornecidas na alimentação da manhã e da tarde, e adicionadas sobre a dieta total (*top-dressed*). A quitosana foi obtida da empresa Polymar® (Polymar Ciência e Nutrição, Fortaleza, CE, Brasil) e apresentava as seguintes especificações técnicas: densidade aparente 0,32 g/mL, pH 7,9, viscosidade de 50 cPs à 20ºC e grau de desacetilação de 86,3%.

2.4.3 Consumo de nutrientes

Diariamente foram feitas pesagens das quantidades de volumoso e concentrado fornecidos para cada vaca, bem como das sobras para estimativa do consumo individual. As vacas foram arraçoadas duas vezes ao dia, às 8 h e às 13 h, de acordo com o consumo de MS do dia anterior, de forma a ser mantido um percentual de sobras das dietas entre 5 e 10 % do fornecido, para não haver limitação de consumo. Os alimentos eram misturados no cocho e fornecidos na forma de dieta completa. Do 16º ao 23º dia de cada período experimental, amostras de ingredientes fornecidos e de sobras foram coletadas diariamente, perfazendo uma amostra composta por período, as quais eram armazenadas a -20ºC para posteriores análises.

2.4.4 Análises de alimentos

As amostras de alimentos e sobras foram pré-secas a 60ºC em estufa com ventilação forçada de ar por 72 horas e moídas a 1 mm em moinho do tipo Wiley (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA, EUA). Foram analisados os teores de MS (método nº 930.15), proteína bruta (PB, onde N × 6.25; método de Dumas nº 990.03), extrato etéreo (EE; método nº 920.39), fibra em detergente ácido e lignina (FDA e LDA, respectivamente; método nº 973.18), e cinzas (método nº 942.05), de acordo com AOAC (2000). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) foram determinados conforme método descrito por Mertens (2002), com adição de alfa-amilase termoestável e sem a adição de sulfito de sódio ao detergente. Os teores de nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) e nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) foram analisados de acordo com Licitra et al. (1996). A matéria orgânica (MO) foi determinada pela diferença entre os conteúdos de MS e cinzas (Tabelas 2.1 e 2.2).

Tabela 2.1 – Proporção de ingredientes, composição química e perfil de ácidos graxos das dietas basais utilizadas no experimento (% da MS, exceto quando indicado)

	Dietas basais	
Item	Controle	Grão de soja
Ingredientes		
Silagem de milho	50,0	50,0
Milho moído	29,2	23,9
Farelo de soja	18,0	9,50
Grão de soja	-	14,0
Ureia	0,44	0,22
Calcário	0,15	0,15
Premix vitamínico e mineral[1]	2,00	2,00
Sal comum	0,20	0,20
Composição química		
MS, % da dieta	58,5	58,7
MO	93,3	93,5
PB	17,3	17,4
PIDN	1,50	1,45
PIDA	1,00	0,98
EE	2,44	4,76
CNF	44,2	41,2
FDN	30,7	30,8
FDA	16,6	16,8
LDA	2,68	2,70
Cinzas	6,65	6,47
NDT_{1X}	72,5	75,5
ED_{1X}, Mcal/kg de MS	3,25	3,39
ELl, Mcal/kg de MS	1,52	1,58
Ácidos graxos, % do total		
14:0	0,40	0,39
16:0	15,8	15,3
18:0	3,14	3,22
cis-9 18:1	25,8	25,6
cis-9,*cis*-12 18:2	43,4	43,7
cis-9,*cis*-12,*cis*-15 18:3	4,22	4,71
Σ AGMI[2]	26,1	25,9
Σ AGPI[3]	47,7	48,5
Relação saturado/insaturado total	0,28	0,28

[1] Contém em 1 kg do produto: 100 g de Ca, 42 g de P, 18 g de S, 45 g de Mg, 20 g de K, 123 g de Na, 28 mg de I, 500 g de Cu, 14 g de Co, 1050 mg de Fe, 1400 mg de Mn, 18 mg de Se, 2800 mg de Zn, 420 mg de F, 80 mg de Biotina, 200000 UI de Vit A, 40000 UI de Vit D3 e 1200 UI de Vit E.
[2] Ácidos graxos monoinsaturados.
[3] Ácidos graxos poliinsaturados.

Tabela 2.2 – Composição química e perfil de ácidos graxos dos ingredientes das dietas basais utilizadas no experimento (% da MS, exceto quando indicado)

Item	Ingredientes			
	Silagem de milho	Milho moído	Farelo de soja	Grão de soja
Composição química				
MS, % da dieta	27,9	87,8	90,0	91,0
MO	95,9	97,8	93,4	94,9
PB	7,20	10,2	52,7	41,3
PIDN	1,34	1,64	1,98	1,46
PIDA	0,84	1,09	1,43	1,12
EE	2,14	3,42	2,06	19,1
CNF	38,2	72,7	21,4	19,0
FDN	48,4	11,5	17,2	15,6
FDA	28,4	3,52	7,62	7,21
LDA	4,32	1,12	1,07	1,19
Cinzas	4,08	2,17	6,61	5,06
NDT_{1X}	66,1	86,1	79,3	102
ED_{1X}, Mcal/kg de MS	2,86	3,74	4,05	4,86
ELl, Mcal/kg de MS	1,37	1,67	1,93	2,25
Ácidos graxos, % do total				
14:0	0,65	0,14	0,18	0,14
16:0	18,5	12,4	16,1	11,1
18:0	3,30	2,73	3,85	3,91
cis-9 18:1	26,1	33,1	17,0	21,6
cis-9,*cis*-12 18:2	38,7	48,6	54,7	53,7
cis-9,*cis*-12,*cis*-15 18:3	5,72	0,97	5,98	7,47
Σ AGMI[1]	26,5	33,4	17,0	21,7
Σ AGPI[2]	44,6	49,5	60,7	61,1
Relação saturado/insaturado total	0,35	0,20	0,27	0,19

[1] Ácidos graxos monoinsaturados.
[2] Ácidos graxos poliinsaturados.

As concentrações de carboidratos não fibrosos (CNF) foram estimadas, onde 100 – (% FDN + % PB + % EE + % cinzas) (NRC, 2001). Os teores de nutrientes digestíveis totais (NDT) e de energia digestível (ED), ambos em nível de mantença (NDT_{1X} e ED_{1X}, respectivamente), foram estimados conforme equações descritas no NRC (2001). As concentrações de energia líquida de lactação (ELl) foram calculadas a partir das análises de composição química dos alimentos, consumo real de MS e PV das vacas durante cada período, de acordo com NRC (2001).

Para análise do perfil de AG das dietas, amostras dos ingredientes foram liofilizadas, moídas a 1 mm e submetidas aos procedimentos de extração (FOLCH et al., 1957) e

metilação (KRAMER et al., 1997) de AG. Os ésteres metílicos de ácidos graxos formados foram quantificados utilizando um cromatógrafo a gás (modelo GC-2010, Shimatzu, Kyoto, Japão), equipado com um detector de ionização de chama, injetor automático (modelo AOC-20i, Shimatzu) com injeção do tipo *split*, e coluna capilar de sílica fundida de 100 m × 0,25 mm de diâmetro, revestida com película 0,2 µm de biscianopropil polissiloxano (Rt-2560, Restek, Bellefonte, PA, EUA). Foi utilizado um programa de gradiente de temperatura (temperatura inicial de 70ºC por 4 min, seguido de aumento de 13ºC/min até atingir 175ºC, que foi mantido por 27 min, seguido de novo aumento de 4°C/min até 215°C, mantidos por 31 min) e hidrogênio como gás de arraste com fluxo constante (40 cm/s). Os picos cromatográficos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção de autênticos padrões de AG (Supelco 37 Component FAME Mix, Bellefonte; vaccenic acid, cód. V038-1G, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA; *trans*-10, *cis*-12 CLA, cód. UC-61M, NU-Chek-Prep, Elysian, MN, EUA; e *cis*-9,*trans*-11 CLA, cód. UC-60M, NU-Chek-Prep). O ácido nonadecanoico (19:0, cód. 72332-5G-F, Sigma Aldrich) foi utilizado como padrão interno nas amostras para corrigir as perdas durante o processo de metilação. Os AG identificados foram expressos como proporção do total de AG (g/100 g de ácidos graxos; Tabelas 2.1 e 2.2).

2.4.5 Digestibilidade aparente total dos nutrientes

O ensaio de digestibilidade foi conduzido utilizando oito vacas, pertencentes aos dois quadrados latinos de vacas canuladas. Coletas totais de fezes foram realizadas nos últimos três dias de cada período experimental, durante 72 h, iniciando às 20 h do 20º dia e encerrando às 20 h do 23º dia. As fezes foram coletadas diretamente do piso das baias, imediatamente após os animais defecarem, e o conteúdo foi armazenado em sacos plásticos com capacidade de 50 kg, devidamente identificados. Durante os dois intervalos diários de ordenha, cada vaca foi conduzida acompanhada de uma pessoa equipada com balde para colheita da excreção fecal que eventualmente ocorria neste período. A cada 24 h, a produção fecal diária era pesada e homogeneizada, retirando-se uma amostra representativa (aprox. 10% do total), sendo armazenada a -20ºC para posteriores análises. As amostras foram pré-secas à 60ºC por 72 h, moídas a 1 mm e analisados os teores de MS, cinzas, PB, EE e FDN, conforme procedimentos já descritos anteriormente. A excreção fecal de MS e nutrientes foram obtidas por cálculos de reconstituição, com base na composição química e na produção fecal relativa de cada um dos três dias de coleta em relação ao total excretado em 72 h, em kg de matéria natural. Os

coeficientes de digestibilidade aparente total da MS, MO, PB, EE e FDN foram calculados como {[consumo (kg/d) – excreção fecal (kg/d)]/consumo (kg/d)} × 100.

2.4.6 Fermentação ruminal

No 19º dia de cada período, amostras de conteúdo ruminal foram coletadas de diferentes porções do rúmen das vacas canuladas (sacos dorsal anterior, ventral anterior, ventral médio, dorsal posterior e ventral posterior), em intervalos de 2 h, iniciando imediatamente antes da alimentação da manhã e se estendendo até doze horas após. O conteúdo ruminal foi pressionado através de duas camadas de pano dessorador para extração do líquido ruminal, no qual foi imediatamente mensurado o pH, usando um pHmetro digital (MB-10, Marte, Santa Rita do Sapucaí, MG, Brasil). Após a leitura, 50 mL de amostras de líquido ruminal foram centrifugados (7000 × *g* a 4ºC por 15 min), sendo retirados 1,6 mL de sobrenadante e preservados com 0,4 mL de ácido fórmico (H_2CO_2 p.a., 98-100%) para análise de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), e outros 0,8 mL de sobrenadante foram preservados com 0,4 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 0,5 M) para análise de N amoniacal (N-NH_3); ambas as amostras foram armazenadas a -20°C até as análises.

Para determinação de N-NH_3, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e analisadas pelo método colorimétrico de fenol-hipoclorito (BRODERICK e KANG-MEZNARICH, 1980). Para determinação dos AGCC, as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa (GC-2104, Shimadzu), utilizando injetor do tipo *splitless*, coluna capilar a 145ºC (Stabilwax, Restek) e detector de ionização de dupla chama a 250ºC, conforme método descrito por Erwin et al. (1961) e adaptado por Getachew et al. (2002). As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, centrifugadas (14500 × *g* a 4°C por 10 min) e transferido 1 mL de sobrenadante para *vial* contendo 0,1 mL de padrão interno (ácido 2-etilbutírico 100 mM; Chem Service, West Chester, PA, EUA). Foram preparados padrões externos (ácido acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico; Chem Service) para auxiliar no processo de separação e integração dos picos cromatográficos e cálculos da concentração dos AGCC, utilizando o software GCSolution (Shimadzu).

2.4.7 População relativa de bactérias ruminais

Também no 19º dia de cada período, amostras de conteúdo ruminal, representativas das frações sólida e líquida da digesta, foram coletadas das mesmas porções do rúmen

descritas anteriormente, 6 h após a alimentação da manhã, para quantificação de bactérias ruminais. Depois de homogeneizado, 25 g de sólido e 25 mL de líquido foram processados conforme descrito por Stevenson e Weimer (2007), cujo pellet bacteriano resultante foi dissolvido em 700 μL de solução tampão (Tris 100 mM, EDTA 10 mM e NaCl 0,15M; pH 8,0) e mantido a -80°C até a extração de DNA.

Foram utilizados 200 μL de amostra para extração do DNA com uso de *kit* comercial (Qiagen DNA stool, Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo o protocolo de extração descrito pelo fabricante. Resumidamente, as amostras ruminais foram homogeneizadas com tampão ASL (Qiagen) e aquecidas a 95^{0}C por 5 min para lise celular bacteriana. Após a remoção de potenciais inibidores por incubação com um comprimido InhibitEx (Qiagen), os lisados foram tratados com proteinase K (Qiagen) e tampão AL (Qiagen) a 70°C por 10 min para remoção de proteínas e polissacarídeos. Na sequência, o DNA foi precipitado em etanol, aplicado a uma coluna fornecida no *kit*, seguido de lavagens com tampões AW1 e AW2 (Qiagen) e dissolvido em tampão AE (Qiagen) e, por último, precipitação com etanol, como descrito por Sambrook e Russell (2001).

A quantificação relativa de bactérias foi estimada mediante a técnica de PCR em tempo real, utilizando o sistema de detecção ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Lennik, Bélgica) e tecnologia SYBR (Invitrogen, CA, EUA), usando placas de 96 poços. As amostras foram analisadas em duplicata e com controle negativo para cada bactéria de estudo. Em cada reação foram adicionados 10 μL de 2x SYBR Green Master Mix (Life Technologies, Foster City, CA, EUA), 0,30 μM de concentração de oligonucleotídeos iniciadores específicos (*primers*) para cada espécie de bactéria, 6,6 μL de água livre de nucleases e 1 μL de molde de DNA extraído, totalizando um volume final de 20 μL por reação. Foram quantificadas cinco populações bacterianas de interesse, sendo *Butyrivibrio* group bactéria, *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Anaerovibrio lipolytica*, *Streptococcus bovis* e *Fibrobacter succinogenes*, cujos *primers* foram construídos utilizando os números de acesso disponíveis no GenBank (EU714406.1, AM039827.1, NR_114696.1, M58835.1 e EU606019.1, respectivamente). As sequências *forward* (F) e *reverse* (R) dos *primers* das bactérias analisadas foram F: GYGAAGAAGTATTTCGGTAT e R: CCAACACCTAGTATTCATC para *Butyrivibrio* group (BOECKAERT et al. 2008; produto de 418 pb); F: TCCGGTGGTATGAGATGGGC e R: GTCGCTGCATCAGAGTTTCCT para *Butyrivibrio proteoclasticus* (PAILLARD et al. 2007, produto de 185pb); F: TGGGTGTTAGAAATGGATTCTAGTG e R: GCACGTCATTCGGTATTAGCAT para *Anaerovibrio lipolytica* (KHAFIPOUR et al. 2009, produto de 109 pb); F: TTCCTAGAGATAGGAAGTTTCTTCGG e R:

ATGATGGCAACTAACAATAGGGGT para *Streptococcus bovis*; (STEVENSON e WEIMER 2007, produto de 127 pb); e F: GGTATGGGATGAGCTTGC e R: GCCTGCCCCTGAACTATC para *Fibrobacter succinogenes*; (TAJIMA et al. 2001, produto de 445 pb). Utilizou-se um oligonucleotídeo universal (*Eubacteria universal*; F: GTGSTGCAYGGYTGTCGTCA e R: ACGTCRTCCMCACCTTCCTC; MAEDA et al. 2003, produto de 147 pb) para a quantificação de bactérias totais, a fim de padronizar a quantidade de DNA adicionada às reações. O protocolo de amplificação por PCR em tempo real incluiu desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguida de 44 ciclos de aquecimento a 95°C por 15 s e resfriamento a 55°C por 30 s, e extensão final a 72°C por 30 s. As curvas de dissociação foram analisadas no final das reações para verificar a especificidade de cada amplificação. Foi realizada uma curva padrão para cada espécie de bactéria e como estas apresentaram eficiências semelhantes à *Eubacteria universal*, a quantificação relativa foi avaliada adotando o método $2^{-\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

2.4.8 Síntese de N microbiano e utilização de N

Para estimativa da síntese de N microbiano (Nmic), foi utilizada a excreção de derivados de purina (DP) como marcador metabólico da síntese, excretados na urina e no leite, conforme descrito por Chen e Gomes (1992).

Coletas totais de urina foram realizadas nos últimos três dias de cada período, durante 72 h (AHVENJÄRVI et al., 2002; GONZÁLEZ-RONQUILLO et al., 2003), utilizando oito vacas canuladas, concomitantemente às coletas totais de fezes. A urina foi coletada utilizando sondas de Foley (28 French, 75 mL; Rüch Amber, Malásia, África), implantadas com auxílio de espéculo vaginal e guia de sonda, via uretra até a bexiga urinária, 12 h antes do início da coleta. Ao início da coleta, a extremidade livre da sonda foi ligada a um tubo conector de PVC atóxico e transparente (1,2 cm de diâmetro), conectado a uma bolsa coletora de urina (Free-Bac, 2 L, sistema fechado; Changshu Senlin Medical Appliance Ltda., Changshu, China). A bolsa coletora foi presa a uma cinta elástica (80 mm de largura) costurada com velcro, envolta na região anterior dos animais, da cernelha à região ventral das costelas anteriores. Com o uso deste aparato de coleta urinária de metodologia própria, as vacas tinham livre movimentação nas baias, não necessitando estarem presas a coleiras, como comumente ocorre nos procedimentos de coleta total de urina.

Após cada micção espontânea, as bolsas coletoras eram esvaziadas e a urina transferida para galões plásticos contendo 500 mL de H_2SO_4 40%, adicionados para manter o

pH da urina abaixo de 3, prevenindo a degradação microbiana dos derivados de purina (CHEN e GOMES, 1992) e a perda da amônia por volatilização (PLAIZIER et al., 2000). Ao final de cada período de 24 h, a produção urinária foi pesada, homogeneizada e coletada uma amostra para processamento. Uma alíquota de 20 mL de urina foi diluída em 80 mL de água destilada para evitar a precipitação e formação de cristais de ácido úrico na amostra. Depois de diluídas, as amostras foram armazenadas a -20°C para posteriores análises.

As amostras de urina foram descongeladas em temperatura ambiente, filtradas em papel filtro Whatman nº 1 e analisados os DP (alantoína e ácido úrico). As concentrações de alantoína foram determinadas segundo Fujihara et al. (1987), descrito por Chen e Gomes (1992), utilizando um leitor de ELISA (Expert Plus, Asys Hitech GMBH, Eugenorf, Áustria), e as concentrações de ácido úrico por meio de *kit* comercial (cód. K139, Bioclin, Belo Horizonte, Brasil), utilizando um espectrofotômetro semiautomático (SBA 200, CELM, São Caetano do Sul, Brasil). A secreção de alantoína no leite também foi considerada para quantificação da excreção total de DP. No 17º e 18º dias de cada período, foram coletadas amostras de leite, proporcionais à produção nas ordenhas da manhã e da tarde, que foram desproteinizadas com ácido tricloroacético a 25%, filtradas em papel filtro Whatman nº 1 e analisadas as concentrações de alantoína, conforme metodologia descrita anteriormente.

A excreção total diária de DP foi calculada pela soma das quantidades de alantoína e ácido úrico excretados da urina com a quantidade de alantoína secretada no leite, expressos em mmol/dia. A partir da excreção de DP (mmol/dia) foram calculadas as purinas microbianas absorvidas (Pabs; mmol/dia), onde Pabs = [DP – 0,236 × $PV^{0,75}$]/0,84, em que 0,236 mmol/kg de $PV^{0,75}$ é a contribuição endógena de DP e 0,84 é o coeficiente de recuperação de purinas absorvidas como DP (ORELLANA BOERO et al., 2001). A síntese de Nmic (g/dia) foi estimada em função das Pabs (mmol/dia), conforme adaptação da equação de Chen e Gomes (1992), onde Nmic = [Pabs × 70]/[0,83 × 0,116 × 1000], em que 70 representa o conteúdo de N nas purinas (mg N/mmol), 0,83 o coeficiente de digestibilidade intestinal das purinas microbianas e 0,116 a relação N nas purinas do total de N nas bactérias ruminais. A relação de 0,116 g de N nas purinas/g de N total bacteriano foi substituída na equação pelo valor médio encontrado no presente estudo, sendo de 0,103. O valor de N purina:N total das bactérias foi obtido após a extração bacteriana das amostras de conteúdo ruminal, segundo metodologia de Stevenson e Weimer (2007) e procedimentos já descritos anteriormente, cujo pellet bacteriano resultante foi liofilizado, macerado e analisado os teores de MS e N total (métodos nº 930.15 e 990.03, respectivamente; AOAC, 2000) e purinas totais (MAKKAR e BECKER, 1999).

A eficiência de uso de N para síntese de Nmic foi calculada como [síntese de Nmic (g/dia)/consumo de N (g/dia)] × 100. Também foram estimadas as eficiências de síntese de Nmic (g/dia) para cada unidade de consumo de energia (kg/dia), expressa de diferentes formas, sendo: NDT corrigido para o nível de consumo acima da mantença ou NDT em nível produtivo (NDTp), conforme NRC (2001); NDTp ajustado para o teor de extrato etéreo da dieta ou NDT fermentável (NDTf), onde NDTf = NDTp – [(EE – 1) × 1,25], segundo NRC (2001); e matéria orgânica aparentemente degradada no rúmen (MOADR), estimada como {[consumo de MO (kg/d)/digestibilidade aparente total da MO (%)] × 100} × 0,65, de acordo com ARC (1984).

A eficiência de utilização de N consumido para produção de leite foi calculada como [N no leite (g/dia)/0.93]/consumo de N (g/dia), conforme Dschaaka et al. (2010), onde a secreção de N no leite (g/dia) foi obtida pela [produção de leite (g/d) × teor de proteína do leite (%)]/6,38. A excreção de N urinário (g/dia) foi obtida a partir da análise dos teores de N, conforme método já descrito anteriormente, nas amostras de urina provenientes de 72 h de coletas totais.

2.4.9 Balanço de energia e eficiência energética

O balanço de energia (BE) foi estimado entre o 16º e 23º dias de cada período, expresso em unidades de energia líquida de lactação (ELl), como sendo BE (Mcal/dia) = consumo de ELl (Mcal/dia) – [exigência de ELl para mantença (Mcal/dia) + exigência de ELl para produção de leite (Mcal/dia)]. O consumo de ELl foi obtido a partir dos consumos estimados de energia metabolizável (EM) e energia digestível (ED), respectivamente, ajustados para o nível real de consumo das vacas, todos de acordo com NRC (2001).

O consumo de ED em nível de mantença (ED_{1X}) foi calculado como [CMS (kg/dia) × ED_{1X} da dieta (Mcal/kg)] – [sobras (kg de MS/dia) × ED_{1X} das sobras (Mcal/kg)]. Os teores de ED_{1X} das dietas e sobras foram convertidos a ED em nível de produção, sendo aplicado um desconto com base no nível de consumo real (acima da mantença) das vacas em cada período, conforme ajuste proposto pelo NRC (2001). A partir do consumo real de ED, foi estimado o consumo de EM, utilizando as equações EM (Mcal/kg) = [1.01 × ED (Mcal/kg) − 0.45] e EM (Mcal/kg) = [1.01 × ED (Mcal/kg) − 0.45] + {0.0046 × [EE (%) – 3]}, para dietas sem e com inclusão de grão de soja, respectivamente. Por fim, o consumo de ELl foi estimado a partir do consumo de EM, utilizando as equações ELl (Mcal/kg) = [0.703 × EM (Mcal/kg) − 0.19] e

ELl (Mcal/kg) = [0.703 × EM (Mcal/kg) − 0.19] + ({[0.097 × EM (Mcal/kg) + 0.19]/97} × [EE (%) − 3]}), para dietas sem e com inclusão de grão de soja, respectivamente.

As exigências de energia foram calculadas de acordo com NRC (2001). A exigência de ELl para mantença foi calculada como [0,08 Mcal × $PV^{0,75}$]. O PV foi mensurado com uma escala digital no 7º e 23º dias de cada período, cuja média obtida foi utilizada para os cálculos. A exigência de ELl para produção de leite foi calculada como {produção de leite (kg/dia) × [0,0929 × gordura (%) + 0,0547 × proteína bruta (%) + 0,0395 × lactose (%)]}. Não foram consideradas as exigências de gestação e crescimento, pois não havia vacas com mais de 190 dias de gestação e com idade inferior a 42 meses. A eficiência aparente de utilização de energia para produção de leite foi calculada como [ELl no leite (Mcal/dia)/ELl consumida (Mcal/dia)].

2.4.10 Perfil metabólico sanguíneo

No 18º dia de cada período, foram coletadas amostras de sangue por punção da artéria ou veia coccígea nos tempos 0 e 4 h após a alimentação da manhã, utilizando tubos vacuolizados, sem anticoagulante. Os tubos foram mantidos refrigerados a 4ºC até a centrifugação (3000 × *g* por 15 min a 20ºC), onde o soro obtido foi coletado e armazenado a -20ºC para posteriores análises. Foram utilizados *kits* comerciais (Bioclin) paras as análises de glicose (cód. K082), ureia (cód. K056), proteínas totais (cód. K031), albumina (cód. K040), colesterol total (cód. K083), colesterol HDL (cód. K071), triglicerídeos (cód. K117) e das enzimas hepáticas gama glutamil transferase (GGT; cód. K080) e aspartato aminotransferase (AST; cód. K048), utilizando um espectrofotômetro semiautomático (SBA 200, CELM). As concentrações de colesterol VLDL e colesterol LDL foram estimadas, onde: colesterol VLDL = triglicerídeos/5; colesterol LDL = colesterol total – [colesterol HDL + colesterol VLDL), ambas equações segundo Friedewald, Levy e Fredrickson (1972).

2.4.11 Produção e composição do leite

As vacas foram mecanicamente ordenhadas duas vezes ao dia, as 6 h e as 16 h, e a produção de leite foi registrada diariamente durante cada período. Entre o 16º e 19º dias, foram coletadas amostras individuais de leite, proporcionais à produção nas ordenhas da manhã e da tarde, para análise da composição dos teores de gordura, proteína bruta e lactose, utilizando um analisador ultrassônico de leite (Lactoscan MCC, Milkotronic Company, Nova

Zagora, 8900, Bulgária). Adicionalmente, amostras de leite obtidas no 17º e 18º dias foram desproteinizadas (ácido tricloroacético 25%), filtradas (papel filtro Whatman nº 1) e analisadas as concentrações de ureia por *kit* comercial (cód. K056; Bioclin), em espectrofotômetro (SBA 200, CELM). O N ureico no leite foi obtido considerando o teor N na ureia de 46,7%.

A produção de leite foi corrigida para o teor de gordura (LCG) de acordo com Sklan et al. (1992), onde LCG (kg/d) = [0,432 + 0,1625 × gordura do leite (%)] × produção de leite (kg/d). Foi também calculada a produção de leite corrigida para energia (LCE), conforme Dairy Records Management System (2014), onde LCE (kg/dia) = produção de leite (kg/d) × 0.327 + gordura do leite (kg/d) × 12.86 + proteína do leite (kg/d) × 7.65.

2.4.12 Perfil de ácidos graxos da gordura do leite

No 17º e 18º dias de cada período, amostras adicionais de leite foram coletadas e armazenadas a -20º C para posterior análise do perfil de ácidos graxos da gordura do leite. As amostras foram descongeladas em banho-maria a 40ºC, homogeneizadas e misturadas para obtenção de uma amostra composta de cada vaca por período. Alíquotas de 40 mL de leite foram centrifugadas a 17.800 × *g* por 30 min a 4°C e em seguida a 19.300 × *g* por 20 min a 4°C, para obtenção de uma camada superior de gordura, de acordo com metodologia descrita por Feng et al. (2004). Os lipídios extraídos foram metilados de acordo com Kramer *et al.* (1997). Os ésteres metílicos de ácidos graxos formados foram quantificados por cromatografia gasosa, conforme já descrito anteriormente. Os ácidos graxos identificados foram expressos como proporção do total de ácidos graxos (g/100 g de ácidos graxos).

2.4.13 Análises estatísticas

Os dados foram inicialmente submetidos aos testes de normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (teste de Hartley), segundo Ott (1983), usando os procedimentos UNIVARIATE e GLM, respectivamente, do SAS (version 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA).

Para análise de variância, os dados de consumo, digestibilidade, populações bacterianas ruminais, síntese de N microbiano, utilização de N, balanço de energia, perfil metabólico sanguíneo, produção e composição do leite, eficiências produtivas e perfil de

ácidos graxos do leite foram analisados como quadrado latino replicado usando o procedimento MIXED do SAS (version 9.2), de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijklm} = \mu + Q_i + GS_j + Q_i \times GS_j + P_k + S_l + V_m(S_l) + e_{ijklm} \quad (1)$$

em que: Y_{ijklm} = variável dependente; μ = média geral; Q_i = efeito fixo de quitosana; GS_j = efeito fixo de grão de soja; $Q_i \times GS_j$ = efeito fixo da interação entre quitosana e grão de soja; P_k = efeito fixo de período; S_l = efeito fixo de quadrado; $V_m(S_l)$ = efeito aleatório de vaca dentro do quadrado; e e_{ijklm} = erro residual.

Os dados de fermentação ruminal foram analisados como duplo quadrado latino com medidas repetidas no tempo usando o procedimento MIXED do SAS (version 9.2), de acordo com o modelo a seguir:

$$Y_{ijklmn} = \mu + Q_i + GS_j + Q_i \times GS_j + P_k + S_l + V_m(S_l) + T_n + T_n \times Q_i + T_n \times GS_j + T_n \times Q_i \times GS_j + e_{ijklmn} \quad (2)$$

em que: Y_{ijklm} = variável dependente; μ = média geral; Q_i = efeito fixo de quitosana; GS_j = efeito fixo de grão de soja; $Q_i \times GS_j$ = efeito fixo da interação entre quitosana e grão de soja; P_k = efeito fixo de período; S_l = efeito fixo de quadrado; $V_m(S_l)$ = efeito aleatório de vaca dentro do quadrado; T_n = efeito fixo de tempo; $T_n \times Q_i$ = efeito fixo da interação entre tempo e quitosana; $T_n \times GS_j$ = efeito fixo da interação entre tempo e grão de soja; $T_n \times Q_i \times GS_j$ = efeito fixo da interação entre tempo, quitosana e grão de soja; e e_{ijklmn} = erro residual. A interação entre período × vaca dentro de quadrado foi o erro termo. Foram comparadas 10 estruturas de covariância para os resíduos (CS, CSH, UN, UN(1), AR(1), ARH(1), HF, TOEP, TOEPH e VC), cuja melhor estrutura para cada variável resposta foi definida pelo menor valor de AICC como critério de escolha, conforme metodologia de Akaike.

As médias foram ajustadas pela opção LSMEANS e quando foi observado efeito de interação entre Q×GS o comando PDIFF foi utilizado para comparação das médias dos tratamentos. Para os dados de fermentação ruminal, foi usado o teste F para efeito de tratamento em cada tempo usando a opção SLICE do LSMEANS. A significância foi declarada a $P \leq 0{,}05$. Diferenças entre tratamentos de $0{,}05 < P \leq 0{,}10$ foram consideradas tendências de significância.

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Consumo e digestibilidade

Foi observado efeito de interação entre quitosana e grão de soja sobre os nutrientes consumidos, exceto para consumo de EE (P<0,05; Tabela 2.3). A adição de quitosana na dieta sem suplementação lipídica, referida como dieta controle, não afetou o consumo de nutrientes das vacas, no entanto quando adicionada na dieta contendo grão de soja diminuiu os consumos de MS, MO, PB, FDN e CNF (P<0,05). Adicionalmente, os consumos de FDN e CNF foram menores para as dietas contendo grão de soja, no entanto a adição de quitosana nessa dieta diminuiu ainda mais o consumo (P<0,05). Não foi observado efeito de quitosana sobre o consumo de EE (P>0,05), enquanto que as vacas alimentadas com dietas contendo grão de soja aumentaram o consumo de lipídeos (P<0,05).

Tabela 2.3 – Consumo e digestibilidade aparente total dos nutrientes de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral (LSM; consumo, n = 96; digestibilidade, n = 32[1])

	Controle[2]		Grão de soja[2]			*P*-valor[3]		
Item	- Q	+ Q	- Q	+ Q	EPM	Q	GS	Q×GS
Consumo, kg/d								
MS	23,7[ab]	23,8[a]	23,2[b]	22,6[c]	0,476	0,18	<0,01	0,03
MO	22,1[ab]	22,2[a]	21,7[b]	21,1[c]	0,444	0,18	<0,01	0,03
PB	4,31[a]	4,33[a]	4,29[a]	4,16[b]	0,090	0,12	0,01	0,03
FDN	6,81[a]	6,88[a]	6,66[b]	6,51[c]	0,136	0,40	<0,01	0,02
EE	0,599	0,603	1,19	1,17	0,023	0,55	<0,01	0,37
CNF	10,7[a]	10,8[a]	9,71[b]	9,45[c]	0,200	0,34	<0,01	0,03
Consumo, % do PV								
MS	3,81[a]	3,84[a]	3,79[a]	3,68[b]	0,080	0,11	<0,01	0,01
FDN	1,09[ab]	1,11[a]	1,09[b]	1,06[c]	0,023	0,29	<0,01	<0,01
Digestibilidade, %								
MS	69,6[a]	69,2[a]	67,0[b]	64,4[c]	0,683	0,01	<0,01	0,05
MO	71,8[a]	71,4[a]	69,3[b]	66,7[c]	0,700	0,01	<0,01	0,04
PB	73,8	75,5	67,2	66,6	1,57	0,57	<0,01	0,27
FDN	46,7[a]	45,2[a]	42,7[b]	38,0[c]	1,29	<0,01	<0,01	0,01
EE	83,4[a]	81,7[a]	82,6[a]	76,8[b]	1,06	<0,01	<0,01	0,03

[a-c] Valores na mesma linha com diferentes sobrescritos diferem (P<0,05).
[1] Médias expressas como *least squares means* (LSM), onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística.
[2] Dietas controle e grão de soja, sem (-Q) ou com (+Q) adição de quitosana.
[3] Q = efeito de quitosana; GS = efeito de grão de soja; Q×GS = efeito de interação.

Os consumos de MS e FDN, quando expressos em porcentagem do PV das vacas, também apresentaram efeito de interação (P<0,05), onde a adição de quitosana à dieta controle não alterou o consumo, enquanto que houve diminuição quando adicionada à dieta com grão de soja.

Similar ao consumo, quando a quitosana foi adicionada à dieta controle, não foi observado alteração sobre a digestibilidade dos nutrientes, no entanto houve queda na digestibilidade da MS, MO, FDN e EE com a adição de quitosana à dieta contendo grão de soja (interação, P≤0,05). Ainda, as digestibilidades da MS, MO e FDN foram menores para as vacas que consumiram dietas com suplementação lipídica, comparadas às dietas controle, porém a diminuição foi maior quando a dieta com grão de soja foi acrescida de quitosana (P<0,05). O grão de soja diminuiu a digestibilidade da PB (P<0,05), sem efeito de quitosana sobre a digestibilidade da proteína da dieta (P>0,05).

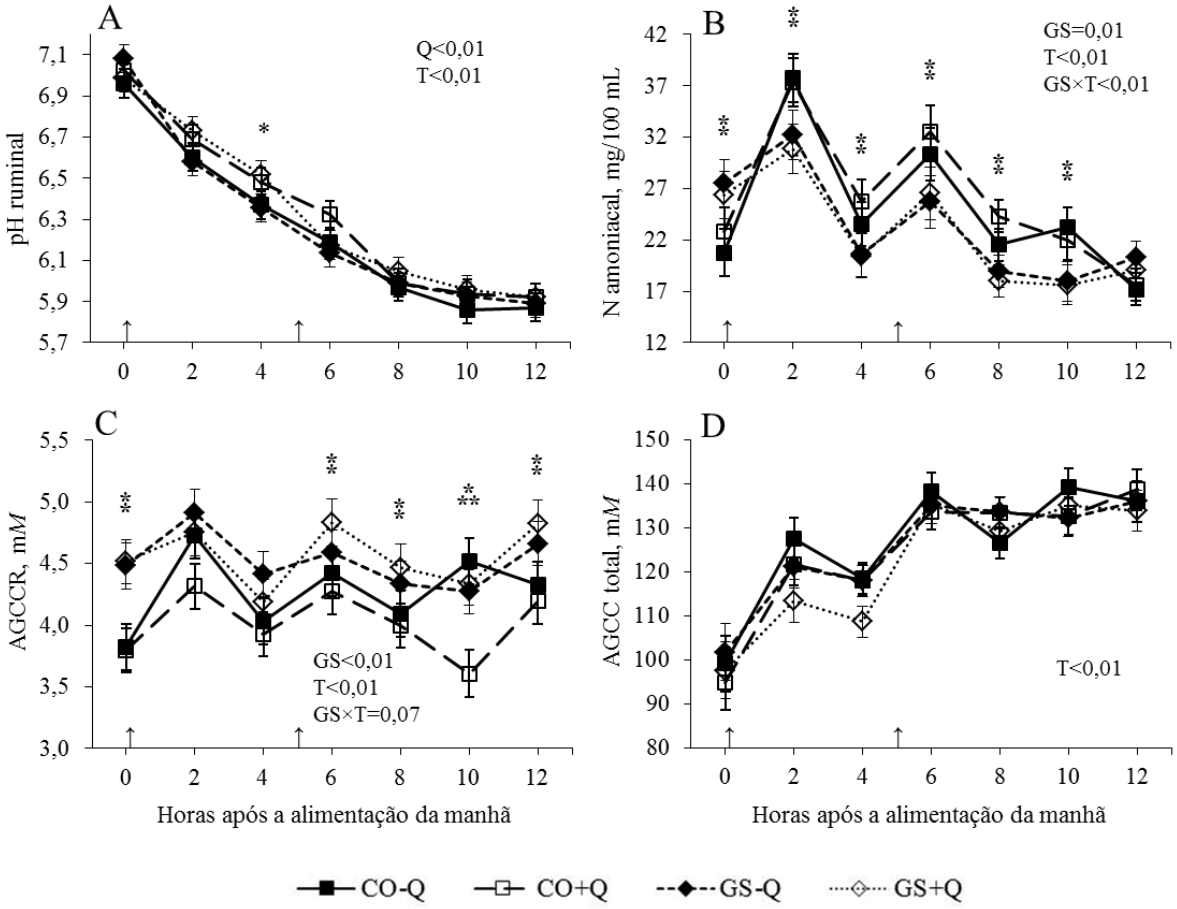
2.5.2 Fermentação ruminal

Para as variáveis fermentativas N amoniacal, produção total de valerato e proporção molar de acetato foi observado efeito de interação entre grão de soja e tempo (P<0,05). Dietas contendo grão de soja apresentaram maior concentração de N amoniacal no rúmen antes da alimentação da manhã (tempo 0), no entanto, imediatamente após a alimentação a concentração de N amoniacal ruminal das vacas recebendo dietas controle foi aumentada, mantendo-se mais elevadas até 10 h após a primeira alimentação (Figura 2.1). Embora não foi observado efeito de grão de soja sobre a concentração média de valerato no rúmen, 2 h após a primeira alimentação foi observada redução nas vacas consumindo dietas com grão de soja (Figura 2.2). A proporção molar média de acetato foi menor para vacas consumindo dietas com grão de soja comparadas às vacas da dieta controle, entretanto a redução foi significativa somente 12 h após a alimentação da manhã (Figura 2.3).

Todas as variáveis de fermentação ruminal avaliadas sofreram variações ao longo dos intervalos de coleta durante o dia, evidenciado pelo efeito significativo de tempo (P<0,05; Figuras 2.1, 2.2 e 2.3, e Tabela 2.4). A adição de quitosana, independentemente da dieta, aumentou o pH ruminal (P<0,05) e a proporção molar de propionato (P<0,05); e diminuiu a concentração total e proporção molar de acetato (P<0,05), as concentrações de valerato (P<0,05) e de ácidos graxos de cadeia curta e ramificada (AGCCR; P<0,05), além de diminuir a relação acetato:proprionato (A:P; P<0,05).

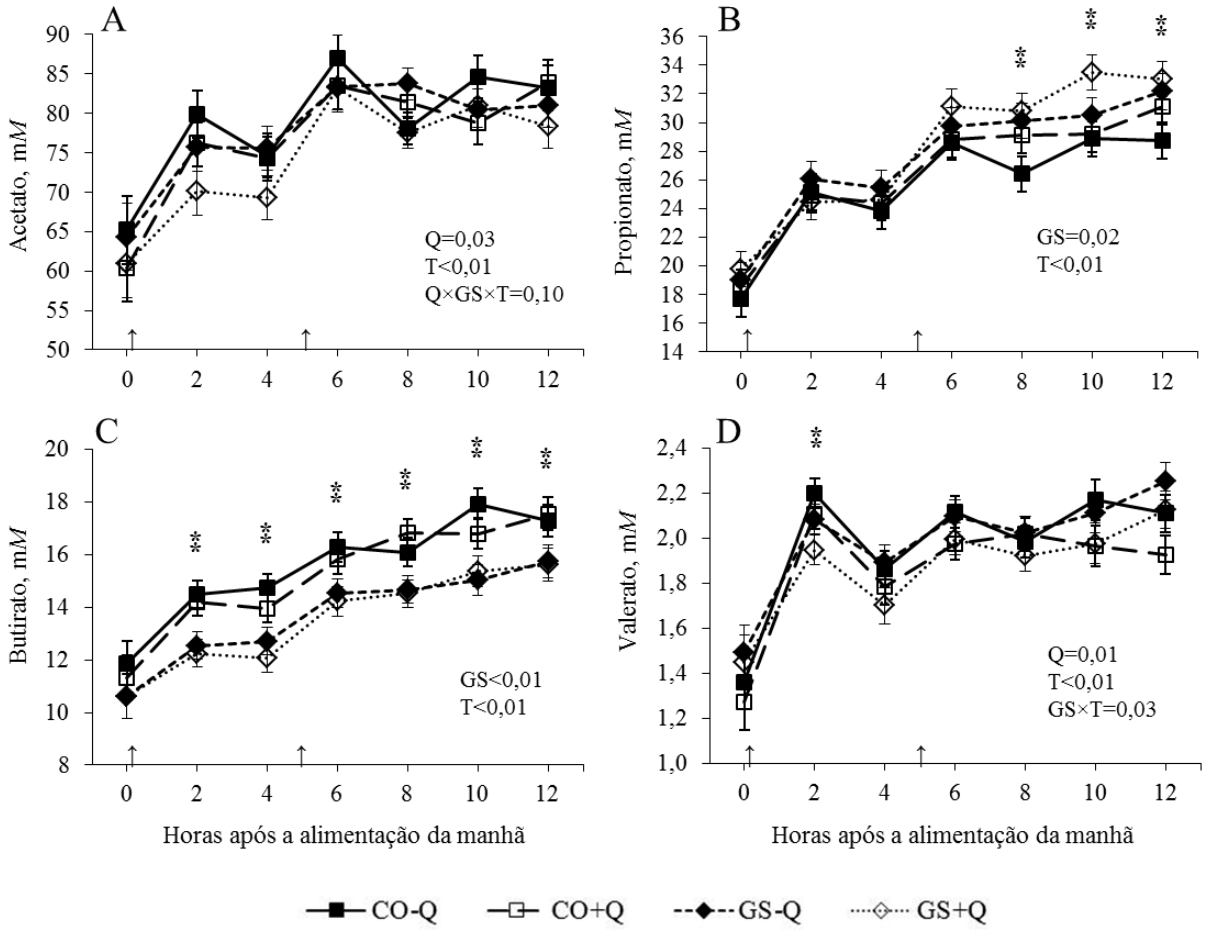
A inclusão de grão de soja nas dietas diminuiu a concentração de N amoniacal (P<0,05), a proporção molar de acetato (P<0,05), a concentração total e proporção molar de butirato (P<0,05) e a relação A:P (P<0,05); e aumentou a concentração total e proporção molar de propionato (P<0,05), e a concentração total de AGCCR (P<0,05). Já a produção total de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) não foi afetada pelos tratamentos (P>0,05).

Figura 2.1 – Comportamento do pH (A), concentração de N amoniacal (B) e concentrações de AGCCR (C) e AGCC total (D) ruminais de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral.



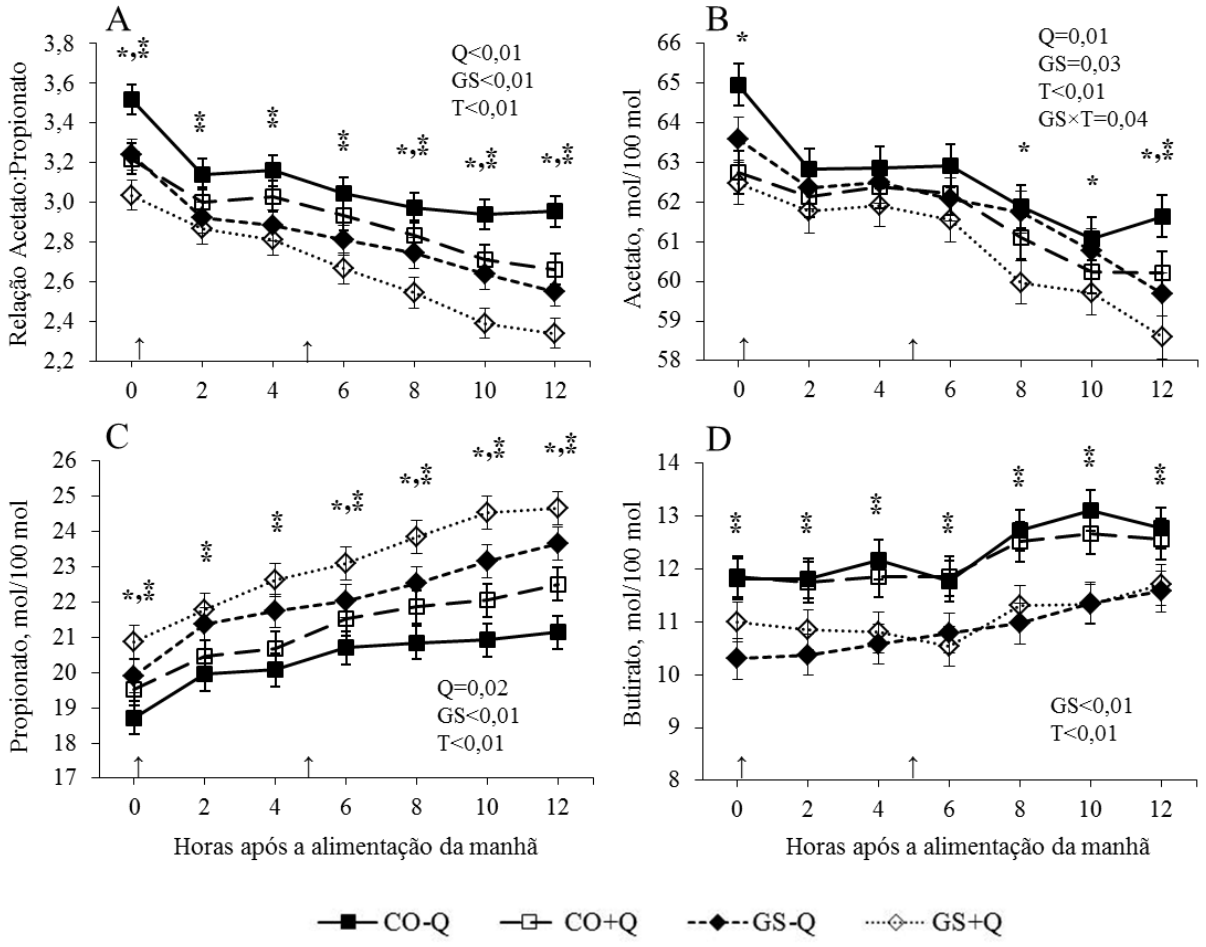
Fonte: Elaborado pelo autor. Médias expressas como *least squares means* (LSM) e n = 224, onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística para cada variável. Dietas controle (CO) e grão de soja (GS), sem (-Q) ou com (+Q) adição de quitosana. Q = efeito de quitosana (∗); GS = efeito de grão de soja (⁑); Q×GS = efeito de interação entre quitosana e grão de soja (⁂); T = efeito de tempo; GS×T = efeito de interação entre grão de soja e tempo. ↑ indicam os horários de alimentação. Apresentados *P*-valor ≤ 0,10.

Figura 2.2 – Comportamento das concentrações de acetato (A), propionato (B), butirato (C) e valerato (D) ruminais de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral.



Fonte: Elaborado pelo autor. Médias expressas como *least squares means* (LSM) e n = 224, onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística para cada variável. Dietas controle (CO) e grão de soja (GS), sem (-Q) ou com (+Q) adição de quitosana. Q = efeito de quitosana (∗); GS = efeito de grão de soja (⁑); Q×GS = efeito de interação entre quitosana e grão de soja (⁂); T = efeito de tempo; GS×T = efeito de interação entre grão de soja e tempo. ↑ indicam os horários de alimentação. Apresentados *P*-valor ≤ 0,10.

Figura 2.3 – Comportamento da relação entre concentração de acetato e propionato (A) e das proporções molares de acetato (B), propionato (C) e butirato (D) ruminais de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral.



Fonte: Elaborado pelo autor. Médias expressas como *least squares means* (LSM) e n = 224, onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística para cada variável. Dietas controle (CO) e grão de soja (GS), sem (-Q) ou com (+Q) adição de quitosana. Q = efeito de quitosana (∗); GS = efeito de grão de soja (⁑); Q×GS = efeito de interação entre quitosana e grão de soja (⁂); T = efeito de tempo; GS×T = efeito de interação entre grão de soja e tempo. ↑ indicam os horários de alimentação. Apresentados *P*-valor ≤ 0,10.

Tabela 2.4 – Fermentação ruminal de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral (LSM; n = 224[1])

	Controle[2]		Grão de soja[2]			*P*-valor[3]			
Item	- Q	+ Q	- Q	+ Q	EPM	Q	GS	Q×GS	T
pH	6,26	6,34	6,28	6,33	0,039	<0,01	0,76	0,61	<0,01
N-NH_3, mg/dL	24,9	26,0	23,3	22,7	1,37	0,78	0,01	0,34	<0,01
AGCC, m*M*									
Acetato	79,0	76,9	77,7	74,3	1,62	0,03	0,11	0,57	<0,01
Propionato	25,6	26,6	27,6	28,2	0,813	0,28	0,02	0,80	<0,01
Butirato	15,5	15,2	13,7	13,5	0,394	0,38	<0,01	0,80	<0,01
Valerato	1,97	1,87	2,00	1,88	0,045	0,01	0,72	0,90	<0,01
AGCCR[4]	4,28	4,02	4,52	4,56	0,110	0,17	<0,01	0,07	<0,01
Total	126	125	126	122	2,49	0,16	0,29	0,63	<0,01
Relação A:P	3,10	2,91	2,83	2,66	0,047	<0,01	<0,01	0,59	<0,01
AGCC, mol/100 mol									
Acetato	62,6	61,6	61,8	60,9	0,454	0,01	0,03	0,94	<0,01
Propionato	20,3	21,2	22,0	23,1	0,409	0,02	<0,01	0,89	<0,01
Butirato	12,3	12,2	10,9	11,1	0,341	0,87	<0,01	0,31	<0,01

[1] Médias expressas como *least squares means* (LSM), onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística.
[2] Dietas controle e grão de soja, sem (-Q) ou com (+Q) adição de quitosana.
[3] Q = efeito de quitosana; GS = efeito de grão de soja; Q×GS = efeito de interação entre quitosana e grão de soja; T = efeito de tempo.
[4] Ácidos graxos de cadeia curta e ramificada (isobutirato e isovalerato).
[5] Relação acetato:propionato.

2.5.3 População relativa de bactérias ruminais

Não houve interação entre quitosana e grão de soja sobre a população relativa de bactérias ruminais (P>0,05; Tabela 2.5). A adição de quitosana às dietas diminuiu a população ruminal de bactérias do grupo *Butyrivibrio* (P<0,05) e houve tendência de diminuição para *Butyrivibrio proteoclasticus* (P=0,08). Vacas consumindo dietas com grão de soja tiveram aumento expressivo da população ruminal de *Streptococcus bovis* (P<0,05) e diminuição do grupo de bactérias do gênero *Butyrivibrio* e da espécie *Fibrobacter succinogenes* (P<0,05), quando comparadas às vacas alimentadas com dietas controle. A população ruminal de *Anaerovibrio lipolytica* não foi afetada pelos tratamentos dietéticos (P>0,05).

Tabela 2.5 – População relativa de bactérias ruminais de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral (LSM; n = 32[1])

	Controle[2]		Grão de soja[2]			*P*-valor[3]		
Item	- Q	+ Q	- Q	+ Q	EPM	Q	GS	Q x GS
Streptococcus bovis	1,00	0,790	55,3	52,5	1,27	0,69	<0,01	0,80
Grupo *Butyrivibrio*	1,00	0,748	0,822	0,594	0,029	<0,01	0,01	0,81
B.proteoclasticus	1,00	0,698	0,824	0,778	0,028	0,08	0,71	0,19
Anaerovibrio lipolytica	1,00	1,37	1,07	1,26	0,030	0,46	0,98	0,81
Fibrobacter succinogenes	1,00	1,02	0,701	0,801	0,009	0,60	0,03	0,68

[1] Médias expressas como *fold-change* em relação ao tratamento referência (controle, sem quitosana), onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística.
[2] Dietas controle e grão de soja, sem (-Q) ou com (+Q) adição de quitosana.
[3] Q = efeito de quitosana; GS = efeito de grão de soja; Q×GS = efeito de interação.

2.5.4 Síntese de N microbiano

A adição de quitosana à dieta controle não alterou nenhuma das variáveis indicativas do metabolismo microbiano ruminal, no entanto, quando adicionada à dieta com grão de soja, a quitosana diminuiu a excreção de alantoína e, consequentemente, o total de derivados de purinas e o fluxo N microbiano (interação, P<0,05; Tabela 2.6). As dietas contendo grão de soja diminuíram a excreção de ácido úrico das vacas (P<0,05). A secreção de alantoína no leite não foi influenciada pelos tratamentos dietéticos (P>0,05).

A eficiência de síntese de Nmic (ESN) em função do consumo de energia, expressa em unidades de NDT corrigido para o nível real de consumo, foi menor para as vacas consumindo dietas com grão de soja (P<0,05). No entanto, quando descontado dos nutrientes digestíveis a contribuição do extrato etéreo, ou seja, considerada a energia potencialmente fermentável das dietas, através das estimativas de NDT fermentável (NDTf) e MO aparentemente degradada no rúmen (MOADR), não houve diminuição da eficiência de síntese microbiana para as dietas contendo grão de soja (P>0,05). Já a eficiência de uso de N (EUN) consumido para síntese de N microbiano foi menor nas vacas alimentadas com dietas com grão de soja (P<0,05). A quitosana não influenciou as estimativas das eficiências de síntese de N microbiano a partir dos consumos de energia e de N (P>0,05).

Tabela 2.6 – Síntese de N microbiano de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral (LSM; n = 32[1])

	Controle[2]		Grão de soja[2]			*P*-valor[3]		
Item	- Q	+ Q	- Q	+ Q	EPM	Q	GS	Q×GS
Excreção de DP[4], mmol/d								
Alantoína	313[a]	325[a]	300[a]	259[b]	21,5	0,21	<0,01	0,03
Ácido úrico	32,4	34,3	31,8	29,2	2,84	0,77	0,02	0,06
Secr. Alantoína,[5] mmol/d	4,86	5,01	4,95	4,76	0,375	0,91	0,53	0,18
DP[4] totais, mmol/d	350[a]	364[a]	337[a]	293[b]	23,7	0,20	<0,01	0,02
N microbiano, g/d	317[a]	331[a]	305[a]	263[b]	22,8	0,20	<0,01	0,02
Eficiência de síntese								
Nmic/NDT,[6] g/kg	21,9	22,6	21,0	18,9	1,12	0,34	<0,01	0,07
Nmic/NDTf,[7] g/kg	22,5	23,3	22,8	20,5	1,13	0,31	0,11	0,06
Nmic/MOADR,[8] g/kg	32,6	34,1	33,3	31,0	1,89	0,75	0,36	0,14
Nmic/N cons.,[9] g/g	0,49	0,52	0,47	0,43	0,024	0,60	<0,01	0,07

[a-b] Valores na mesma linha com diferentes sobrescritos diferem (P<0,05).
[1] Médias expressas como *least squares means* (LSM), onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística.
[2] Dietas controle e grão de soja, sem (-Q) ou com (+Q) adição de quitosana.
[3] Q = efeito de quitosana; GS = efeito de grão de soja; Q×GS = efeito de interação.
[4] Derivados de purinas.
[5] Secreção de alantoína no leite.
[6] g de N microbiano/kg de NDT corrigido para o nível real de consumo.
[7] g de N microbiano/kg de NDT fermentável.
[8] g de N microbiano/kg de MO aparentemente degradada no rúmen.
[9] g de N microbiano/g de N consumido.

2.5.5 Utilização de N

O consumo total de N e a secreção de N no leite (g/dia) das vacas consumindo dieta controle não foram alterados pela adição de quitosana, enquanto que a adição de quitosana na dieta com grão de soja diminuiu o consumo e a secreção de N das vacas (interação, P<0,05; Tabela 2.7). A excreção de N na urina (g/dia) foi menor nas vacas consumindo dietas com grão de soja (P<0,05), no entanto foi observado aumento da excreção fecal de N (g/dia) quando comparadas às vacas das dietas controle (P<0,05). Foi observada tendência (P=0,07) de diminuição do N total excretado (g/dia; N urinário + N fecal) e diminuição (P≤0,05) do total de N excretado e secretado (g/dia; N urinário + N fecal + N no leite) com a adição de quitosana às dietas, independentemente do nível de extrato etéreo das mesmas.

Quando a utilização de N foi expressa em proporção do N consumido, a excreção urinária de N diminuiu em 9,77% (P<0,05; 34,7 vs. 38,4%) e a excreção fecal de N aumentou em 30,1% (P<0,05; 33,1 vs. 25,5%) para as vacas alimentadas com dietas contendo grão de

soja em comparação às alimentadas com dietas controle. Como resultado, houve redução de 3,35% (P<0,05; 23,9 vs. 23,1%) na secreção de N no leite (P<0,05; 23,9 vs. 23,1%) para as vacas da dieta grão de soja em relação à dieta controle.

A proporção de N excretado pelas vacas reduziu com a adição de quitosana na dieta controle, mas não diferiu com adição de quitosana na dieta grão de soja (interação, P<0,05). A proporção de' N excretado e secretado foi menor com a adição de quitosana na dieta controle e maior com a adição de quitosana na dieta grão de soja (interação, P<0,05).

Tabela 2.7 – Utilização de N de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral (LSM; n = 32[1])

	Controle[2]		Grão de soja[2]			*P*-valor[3]		
Item	- Q	+ Q	- Q	+ Q	EPM	Q	GS	Q×GS
Consumo de N, g/d	643[a]	644[a]	645[a]	604[b]	30,1	0,06	0,07	0,04
Excreção e secreção de N, g/d								
N leite	150[a]	153[a]	148[a]	138[b]	8,43	0,10	<0,01	0,01
N urina	252	246	218	213	17,7	0,49	<0,01	0,93
N fezes	169	159	213	203	15,2	0,21	<0,01	0,98
N total excretado	421	405	431	417	25,7	0,07	0,19	0,91
N total excr. e secr.[4]	571	558	578	555	28,1	0,05	0,81	0,57
Proporção do N consumido, %								
N leite	23,6	24,2	23,2	23,0	1,13	0,38	0,01	0,18
N urina	39,0	37,8	33,9	35,4	1,95	0,89	<0,01	0,27
N fezes	26,2	24,7	32,8	33,4	1,56	0,60	<0,01	0,26
N total excretado	65,2[b]	62,5[c]	66,8[ab]	68,8[a]	1,58	0,72	<0,01	0,01
N total excr. e secr.[4]	88,7[bc]	86,7[c]	89,9[ab]	91,8[a]	0,899	0,92	<0,01	0,02

[a-c] Valores na mesma linha com diferentes sobrescritos diferem (P<0,05).
[1] Médias expressas como *least squares means* (LSM), onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística.
[2] Dietas controle e grão de soja, sem (-Q) ou com (+Q) adição de quitosana.
[3] Q = efeito de quitosana; GS = efeito de grão de soja; Q×GS = efeito de interação.
[4] N total excretado (N urina + N fezes) e secretado (N leite).

2.5.6 Balanço de energia

Os consumos de ED_{1X}, ED e EM foram similares para as vacas alimentadas com dietas controle, mesmo com a adição de quitosana, no entanto, houve redução dos consumos quando a quitosana foi adicionada à dieta com grão de soja (interação, P<0,05; Tabela 2.8). A mesma tendência (P=0,07) de comportamento foi observada para o consumo de ELl das vacas.

A exigência de ELl para produção de leite das vacas consumindo dieta controle não foi alterada pela adição de quitosana, no entanto as vacas consumindo dietas contendo grão de

soja tiveram menor exigência de ELl para produção com a adição de quitosana às dietas (interação, P<0,05). A exigência de ELl para mantença das vacas não foi afetada pelos tratamentos (P>0,05). O balanço entre consumo de ELl e exigências de ELl foi maior para as vacas consumindo dietas com grão de soja em relação às vacas alimentadas com as dietas controle (P<0,05).

Tabela 2.8 – Balanço de energia de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral (LSM; n = 96[1])

	Controle[2]		Grão de soja[2]			*P*-valor[3]		
Item	- Q	+ Q	- Q	+ Q	EPM	Q	GS	Q×GS
Consumo, Mcal/d								
ED_{1X}	78,3[b]	78,8[ab]	80,2[a]	77,9[b]	1,63	0,17	0,45	0,04
ED	68,6[a]	68,9[a]	67,9[a]	66,5[b]	1,19	0,21	<0,01	0,05
EM	58,7[a]	58,9[a]	58,5[a]	57,3[b]	0,988	0,23	0,01	0,05
ELl	36,7	36,9	37,0	36,3	0,607	0,22	0,42	0,07
Exigência, Mcal/d								
ELl para produção	23,8[a]	24,4[a]	23,9[a]	22,8[b]	0,656	0,41	0,02	0,01
ELl para mantença	9,94	9,94	9,91	9,89	0,108	0,53	0,12	0,73
Balanço de ELl[4], Mcal/d	2,96	2,56	3,19	3,60	0,485	0,89	<0,01	0,11

[a-b] Valores na mesma linha com diferentes sobrescritos diferem (P<0,05).
[1] Médias expressas como *least squares means* (LSM), onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística.
[2] Dietas controle e grão de soja, sem (-Q) ou com (+Q) adição de quitosana.
[3] Q = efeito de quitosana; GS = efeito de grão de soja; Q×GS = efeito de interação.
[4] Balanço de ELl = consumo de ELl - (exigência de ELl para produção + exigência de ELl para mantença).

2.5.7 Perfil metabólico sanguíneo

As dietas com grão de soja diminuíram as concentrações sanguíneas de glicose e N ureico das vacas (P<0,05) e tenderam a diminuir as proteínas séricas totais (P=0,06; Tabela 2.9). Foi observado aumento de todas as frações lipídicas circulantes avaliadas (colesterol total, colesterol HDL, colesterol VLDL, colesterol LDL e triglicerídeos) para as vacas alimentadas com grão de soja (P<0,05). Também houve tendência de aumento da atividade da enzima GGT com a suplementação lipídica (P=0,08). Com a adição de quitosana às dietas, embora foi observado tendência em aumentar os níveis de colesterol total circulantes (P=0,06), as demais variáveis metabólicas sanguíneas não foram alteradas (P>0,05).

Tabela 2.9 – Perfil metabólico sanguíneo de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral (LSM; n = 96[1])

	Controle[2]		Grão de soja[2]			*P*-valor[3]		
Item	- Q	+ Q	- Q	+ Q	EPM	Q	GS	Q×GS
Glicose, mg/dL	71,4	72,2	70,2	70,3	1,20	0,41	0,01	0,56
NUS[4], mg/dL	21,4	21,6	20,5	20,6	0,597	0,70	0,03	0,93
Proteínas totais, g/L	8,28	8,31	8,18	8,12	0,102	0,87	0,06	0,56
Albumina, g/L	3,49	3,46	3,44	3,46	0,051	0,87	0,45	0,51
Lipidograma, mg/dL								
Colesterol total	150	154	185	190	7,39	0,06	<0,01	0,88
Colesterol HDL	94,5	96,1	104	105	3,13	0,53	<0,01	0,84
Colesterol LDL	52,5	56,3	79,3	81,2	5,44	0,17	<0,01	0,64
Colesterol VLDL	2,65	2,70	2,81	2,85	0,066	0,48	0,01	0,90
Triglicerídeos	13,1	13,5	14,1	14,2	0,309	0,25	<0,01	0,61
Enzimas hepáticas[5], U/L								
GGT	29,2	28,7	30,8	30,0	1,27	0,42	0,08	0,90
AST	65,1	66,1	65,6	67,3	2,04	0,33	0,52	0,77

[1] Médias expressas como *least squares means* (LSM), onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística.
[2] Dietas controle e grão de soja, sem (-Q) ou com (+Q) adição de quitosana.
[3] Q = efeito de quitosana; GS = efeito de grão de soja; Q×GS = efeito de interação.
[4] N ureico no soro.
[5] Gama glutamil transferase (GGT) e aspartato aminotransferase (AST).

2.5.8 Produção e composição do leite e eficiência produtiva

As produções de leite, leite corrigido para gordura (LCG) e leite corrigido para energia (LCE), bem como as produções de gordura, proteína e lactose foram similares para as vacas da dieta controle, com ou sem a adição de quitosana, no entanto, quando a quitosana foi adicionada na dieta contendo grão de soja as vacas diminuíram as produções de leite e de sólidos (interação, P<0,05; Tabela 2.10). Adicionalmente, as produções de leite, proteína e lactose não diferiram entre as vacas consumindo dietas controle e grão de soja, ambas sem adição de quitosana, porém a adição de quitosana à dieta controle resultou em maior produção de leite, proteína e lactose em comparação com as vacas da dieta grão de soja (P<0,05).

Com relação ao teor de sólidos no leite, vacas alimentadas com dietas contendo grão de soja tiveram maior teor de gordura no leite (P<0,05). Os teores de proteína e lactose não diferiram entre os tratamentos (P>0,05). A concentração de N ureico no leite diminuiu para as vacas das dietas com grão de soja (P<0,05).

Tabela 2.10 – Produção e composição do leite e eficiência produtiva de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral (LSM; eficiência de N, n = 32; demais variáveis, n = 96[1])

	Controle[2]		Grão de soja[2]			*P*-valor[3]		
Item	- Q	+ Q	- Q	+ Q	EPM	Q	GS	Q×GS
Produção, kg/d								
Leite	34,6[ab]	35,4[a]	34,2[b]	33,1[c]	0,932	0,63	<0,01	0,01
LCG[4]	36,0[a]	37,1[a]	36,3[a]	34,7[b]	0,866	0,57	0,02	0,01
LCE[5]	35,9[a]	36,9[a]	36,0[a]	34,5[b]	0,855	0,56	0,01	<0,01
Gordura	1,25	1,30	1,29	1,24	0,038	0,96	0,74	0,03
Proteína	1,07[ab]	1,09[a]	1,05[b]	1,02[c]	0,028	0,58	<0,01	0,01
Lactose	1,60[ab]	1,63[a]	1,59[b]	1,53[c]	0,042	0,49	<0,01	0,02
Composição do leite, %								
Gordura	3,67	3,72	3,86	3,77	0,106	0,68	0,01	0,08
Proteína	3,08	3,08	3,08	3,08	0,024	0,43	0,85	0,56
Lactose	4,63	4,61	4,63	4,62	0,035	0,17	0,67	0,79
NUL[6], mg/dL	18,8	18,7	17,2	17,6	0,514	0,84	<0,01	0,55
Eficiência alimentar, kg/kg								
Leite/CMS[7]	1,47	1,50	1,48	1,47	0,036	0,29	0,35	0,06
LCG[4]/CMS[7]	1,52[b]	1,57[a]	1,56[ab]	1,53[ab]	0,027	0,52	0,83	0,02
LCE[5]/CMS[7]	1,51[b]	1,56[a]	1,55[ab]	1,52[ab]	0,027	0,48	0,98	0,02
Eficiência de N[8]	0,253	0,260	0,249	0,248	0,012	0,31	0,01	0,22
Eficiência energética[9]	0,649[a]	0,661[a]	0,648[a]	0,627[b]	0,014	0,57	0,02	0,02

[a-c] Valores na mesma linha com diferentes sobrescritos diferem (P<0,05).
[1] Médias expressas como *least squares means* (LSM), onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística.
[2] Dietas controle e grão de soja, sem (-Q) ou com (+Q) adição de quitosana.
[3] Q = efeito de quitosana; GS = efeito de grão de soja; Q×GS = efeito de interação.
[4] Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura.
[5] Produção de leite corrigida para energia.
[6] N ureico no leite.
[7] Consumo de matéria seca.
[8] Eficiência de N = {[proteína do leite (kg/d)/0.93]/6.38}/consumo de N (kg/d) (DSCHAAKA et al., 2010).
[9] Eficiência energética = ELl no leite (Mcal/d)/consumo de ELl (Mcal/d).

A eficiência alimentar, expressa em kg de LCG e LCE por kg de MS consumida, foi maior para as vacas consumindo dieta controle com adição de quitosana quando comparada à dieta controle sem o aditivo, porém a adição de quitosana nas dietas com grão de soja não alterou a eficiência alimentar (interação, P<0,05). Essa mesma tendência de efeito de interação (P=0,06) foi observada quando a eficiência alimentar foi calculada como produção de leite por unidade de consumo de MS. Já a eficiência aparente de utilização de energia para produção de leite não diferiu com a adição de quitosana à dieta controle, mas diminuiu com a adição de quitosana na dieta com grão de soja (interação, P<0,05). A eficiência de utilização do N consumido para produção de leite diminuiu nas vacas da dieta grão de soja (P<0,05).

2.5.9 Perfil de ácidos graxos do leite

Não houve efeito de interação (P>0,05) entre quitosana e grão de soja sobre o perfil de ácidos graxos do leite, exceto para ácidos graxos não identificados, onde a adição de quitosana à dieta controle não teve alteração, enquanto que sua adição aumentou a concentração de ácidos graxos não identificados na gordura do leite das vacas alimentadas com dietas contendo grão de soja (P<0,05; Tabela 2.11).

De modo geral, a adição de quitosana, independentemente do nível de extrato etéreo das dietas, aumentou (P<0,05) o total de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI; 27,4 vs 26,7 g/100 g) e o total de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI; 3,66 vs 3,51 g/100 g), e diminuiu (P<0,05) o total de ácidos graxos saturados (AGS; 64,9 vs 65,7 g/100 g) e a relação total AGS/(AGMI+AGPI) (2,12 vs 2,21). Ainda, destacam-se os efeitos da quitosana sobre a composição de ácidos graxos da gordura do leite que estão relacionados aos processos de biohidrogenação ruminal, com aumento (P<0,05) dos teores de *cis*-9, *trans*-11 CLA (0,36 vs 0,32 g/100 g) e de *trans*-11 18:1 (ácido vacênico; 0,62 vs 0,56 g/100g) e diminuição (P<0,05) do teor de 18:0 (ácido esteárico; 10,9 vs 11,5 g/100g).

Com relação às dietas grão de soja, foram observadas significativas mudanças no perfil de ácidos graxos do leite das vacas quando comparado àquelas alimentadas com dietas controle, onde do total de 24 ácidos graxos identificados na análise, 21 sofreram mudanças nos teores com a suplementação lipídica (P<0,05). De modo geral, observa-se a diminuição (P<0,05) do total de ácidos graxos de 4 a 14 carbonos (20,3 vs 23,5 g/100g) e aumento (P<0,05) do total de ácidos graxos com mais de 16 carbonos (43,9 vs 36,9 g/100g). Ainda, foi observado aumento (P<0,05) do total de AGMI (28,4 vs 25,7 g/100 g) e AGPI (4,01 vs 3,16 g/100 g), e diminuição (P<0,05) do total de AGS (63,5 vs 67,1 g/100 g) e da relação total AGS/AGMI+AGPI (1,97 vs 2,35). Pode ser destacada também a diminuição de três das quatro relações avaliadas entre a concentração de AG que são produto e substrato da enzima *estearoil-CoA dessaturase* (SCD1) na glândula mamária para as vacas alimentadas com grão de soja nas dietas.

Tabela 2.11 – Perfil de ácidos graxos da gordura do leite de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral (LSM; n = 96[1])

	Controle[2]		Grão de soja[2]			*P*-valor[3]		
Item	- Q	+ Q	- Q	+ Q	EPM	Q	GS	Q×GS
4:0	1,44	1,43	1,43	1,39	0,018	0,04	0,04	0,24
6:0	1,59	1,56	1,50	1,47	0,020	0,03	<0,01	0,78
8:0	1,17	1,13	1,04	1,02	0,024	0,03	<0,01	0,45
10:0	3,03	2,92	2,55	2,52	0,090	0,10	<0,01	0,37
11:0	0,087	0,083	0,067	0,064	0,008	0,49	<0,01	0,93
12:0	3,79	3,64	3,04	3,03	0,120	0,18	<0,01	0,26
13:0	0,235	0,246	0,197	0,191	0,013	0,67	<0,01	0,21
14:0	11,8	11,5	10,1	10,2	0,200	0,31	<0,01	0,22
*c*9 14:1	1,00	0,98	0,74	0,77	0,036	0,67	<0,01	0,12
15:0	1,10	1,12	0,97	0,96	0,044	0,73	<0,01	0,69
16:0	33,0	32,6	29,1	29,2	0,511	0,50	<0,01	0,26
*c*9 16:1	1,44	1,46	1,15	1,22	0,047	0,06	<0,01	0,35
17:0	0,626	0,626	0,538	0,533	0,011	0,72	<0,01	0,68
18:0	9,64	9,44	13,4	12,5	0,275	0,01	<0,01	0,12
*c*9 18:1	22,0	22,7	25,5	25,8	0,591	0,09	<0,01	0,42
*t*9 18:1	0,192	0,193	0,185	0,190	0,006	0,35	0,14	0,48
*t*11 18:1	0,623	0,681	0,500	0,549	0,020	<0,01	<0,01	0,74
*c*9,*c*12 18:2	2,31	2,38	3,06	3,17	0,060	0,05	<0,01	0,63
*c*9,*c*12,*c*15 18:3	0,160	0,173	0,283	0,311	0,008	<0,01	<0,01	0,25
*c*9,*t*11 CLA	0,354	0,394	0,284	0,324	0,016	<0,01	<0,01	0,95
20:0	0,109	0,108	0,133	0,128	0,003	0,09	<0,01	0,24
*c*11 20:1	0,007	0,010	0,007	0,007	0,004	0,28	0,34	0,34
*c*8,*c*11,*c*14 20:3	0,107	0,108	0,117	0,112	0,005	0,55	0,02	0,32
*c*5,*c*8,*c*11,*c*14 20:4	0,157	0,161	0,160	0,160	0,005	0,40	0,65	0,46
Σ não identificados	4,19[a]	4,16[a]	3,96[b]	4,11[a]	0,087	0,15	<0,01	0,04
Sumário								
Σ 4- a 14-C[4]	23,8	23,2	20,3	20,2	0,445	0,15	<0,01	0,37
Σ acima de 16-C[5]	36,5	37,2	44,2	43,6	0,726	0,99	<0,01	0,11
Σ AGS[6]	67,5	66,6	63,8	63,2	0,685	0,02	<0,01	0,65
Σ AGMI[7]	25,2	26,1	28,1	28,6	0,586	0,04	<0,01	0,49
Σ AGPI[8]	3,09	3,23	3,92	4,09	0,084	0,01	<0,01	0,72
Σ AGCI[9]	2,07	2,08	1,75	1,75	0,074	0,94	<0,01	0,99
Relação sat/insat[10]	2,41	2,29	2,00	1,95	0,065	0,01	<0,01	0,27
Relação sat/insat 18-C[11]	0,379	0,357	0,452	0,415	0,011	<0,01	<0,01	0,27
Relação produto/substrato[12]								
*c*9 14:1/14:0	0,086	0,087	0,073	0,077	0,003	0,07	<0,01	0,21
*c*9 16:1/16:0	0,044	0,045	0,040	0,042	0,001	0,12	0,00	0,27
*c*9 18:1/18:0	2,30	2,43	1,92	2,07	0,062	<0,01	<0,01	0,95
*c*9,*t*11 CLA/ *t*11 18:1	0,581	0,590	0,568	0,599	0,020	0,09	0,85	0,35

[a-b] Valores na mesma linha com diferentes sobrescritos diferem (P<0,05).

[1] Médias expressas como *least squares means* (LSM), onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística.
[2] Dietas controle e grão de soja, sem (-Q) ou com (+Q) adição de quitosana.
[3] Q = efeito de quitosana; GS = efeito de grão de soja; Q×GS = efeito de interação.
[4] Ácidos graxos de 4 a 14 carbonos.
[5] Ácidos graxos com mais de 16 carbonos.
[6] Ácidos graxos saturados.
[7] Ácidos graxos monoinsaturados.
[8] Ácidos graxos poliinsaturados.
[9] Ácidos graxos de cadeia ímpar.
[10] Relação ácidos graxos saturados/insaturados total.
[11] Relação ácidos graxos saturados/insaturados com 18 carbonos.
[12] Relação produto/substrato da enzima *estearoil-CoA dessaturase*.

2.6 DISCUSSÃO

Até o presente momento não temos conhecimento de estudos semelhantes que avaliaram a associação de quitosana com lipídios em dietas e seus efeitos sobre os parâmetros digestivos, metabólicos e produtivos de vacas leiteiras, portanto, não são possíveis comparações diretas de nossas observações com outros estudos publicados.

A adição de quitosana na dieta sem inclusão de grão de soja não alterou o consumo de nutrientes, estando de acordo com os resultados encontrados nos estudos prévios de Paiva et al. (2016), Araújo et al. (2015) e Goiri et al. (2010a), com vacas leiteiras, bovinos de corte e ovinos, respectivamente, alimentados com dietas contendo baixo teor de extrato etéreo. No entanto, a adição de quitosana na dieta contendo grão de soja diminuiu o consumo de nutrientes, com exceção do extrato etéreo. A redução do consumo das vacas pela associação de quitosana com grão de soja na dieta pode ser justificada pelas modificações na fermentação ruminal e diminuição da digestibilidade dos nutrientes.

Embora o exato mecanismo de ação da quitosana ainda não é conhecido, são observadas alterações no padrão de fermentação ruminal e aproveitamento de nutrientes (GOIRI et al., 2010a; ARAÚJO et al., 2015; PAIVA et al., 2016), similar ao efeito dos ionóforos (IPHARRAGUERRE e CLARK, 2003; DUFFIELD et al., 2008). Assim como os ionóforos e a quitosana, os ácidos graxos, em especial AG insaturados, exercem efeito sobre o metabolismo ruminal, pois também têm a capacidade de selecionar populações microbianas (JENKINS, 1993; LOURENÇO et al., 2010). No presente estudo, mudanças na fermentação ruminal foram observadas tanto pela adição de quitosana como pela inclusão de grão de soja nas dietas, com melhorias de ambos nos padrões fermentativos, destacando o aumento na proporção molar de propionato e diminuição da proporção de acetato e da relação

acetato:propionato. Apesar da melhoria na eficiência energética de fermentação, a digestibilidade dos nutrientes não foi alterada com adição de quitosana na dieta controle, porém foi reduzida ao ser adicionada na dieta contendo grão de soja, destacando a drástica redução de 18,6% na digestibilidade da fibra em comparação à dieta controle (46,7% vs. 38,0%).

Quando a suplementação lipídica ultrapassa 5% de AG na MS da dieta comumente podem ser observados efeitos adversos dos AG insaturados sobre a população microbiana ruminal, com diminuição na digestibilidade da MO e FDN (LOCK e SHINGFIELD, 2004). Adicionalmente, a inclusão de lipídios nas dietas causa aumento na secreção de peptídeos intestinais reguladores de consumo e diminuição da motilidade intestinal (RELLING e REYNOLDS, 2007). Embora o grão de soja tenha menor disponibilidade ruminal de ácidos graxos e o nível de inclusão destes não ultrapassou 5% na MS da dieta, ainda assim foram observadas reduções na digestibilidade aparente total da MO e FDN e no consumo de FDN, independentemente da adição de quitosana. Segundo o NRC (2001), efeitos adversos de sementes de oleaginosas sobre a fermentação ruminal variam não somente em função do nível de inclusão nas dietas, mas também podem variar dependendo da dieta basal, sendo mais pronunciados em dietas com baixa proporção de forragem e a base de silagem de milho, sendo esta a fonte de forragem utilizada no estudo. Determinados ácidos graxos insaturados, como é o caso do ácido linoleico presente em grande quantidade no grão de soja, possuem efeitos tóxicos sobre bactérias específicas, em especial celulolíticas e produtoras de butirato (MAIA et al., 2007, 2010; YANG et al., 2009). O grão de soja diminuiu a proporção molar de acetato e a produção total e proporção molar de butirato.

No entanto, apesar da inclusão de grão de soja nas dietas ter ocasionado queda na digestibilidade da MS, MO, PB e FDN quando comparado à dieta controle, a combinação com a quitosana reduziu de forma mais drástica a digestibilidade dos nutrientes. A quantificação relativa de bactérias ruminais revelou que ambos, quitosana e grão de soja, causaram alterações. Das populações avaliadas, *Fibrobacter succinogenes*, *Butyrivibrio proteoclasticus* e o grupo *Butyrivibrio*, que compreende as espécies *B. fibrosolvens*, *B. hungatei* e *Pseudobutyrivibrio* spp. (BOECKAERT et al., 2008), possuem atividade fibrolítica. A quitosana diminuiu o grupo *Butyrivibrio* e tendeu em diminuir a *B. proteoclasticus*, enquanto que o grão de soja foi responsável pela diminuição do grupo *Butyrivibrio* e *F. succinogenes*. Estes resultados confirmam as evidências levantadas em trabalhos anteriores de que a quitosana altera as populações ruminais *in vivo*, e que a combinação com lipídios, mesmo cuja fonte tenha menor disponibilidade ruminal como o

grão de soja, resulta em alterações mais drásticas sobre os microrganismos do rúmen, com efeitos negativos sobre a digestibilidade dos nutrientes, sobretudo da fração fibrosa dos alimentos. Essa informação é inédita até o presente momento.

De acordo com Lourenço et al. (2010), a manipulação de uma determinada atividade microbiana, como a diminuição da biohidrogenação de AG insaturados, sempre resultará em consequências sobre outras atividades ruminais, particularmente sobre a atividade celulolítica, cujos microrganismos são bastante vulneráveis à mudanças. Por exemplo, a espécie bacteriana gram-positiva *Butyrivibrio fibrisolvens*, pertencente ao grupo das *Butyrivibrio* que predomina sobre as atividades de biohidrogenação ruminal, tem um importante papel na digestão das fibras e, adicionalmente, muitas cepas são altamente proteolíticas (MAIA et al., 2010). Ainda segundo Maia et al. (2010), *B. fibrosolvens* possui alta susceptibilidade aos efeitos bacteriostáticos de AG insaturados. Sendo assim, há hipótese de que esta espécie tenha sido a principal afetada do grupo *Butyrivibrio* pela inclusão de grão de soja nas dietas em função da diminuição da digestibilidade aparente total da PB.

Mudanças na população microbiana das vacas consumindo dietas com grão de soja indicam ser a principal causa da redução na digestibilidade aparente total da PB devido à concomitante redução do N amoniacal no rúmen. De acordo com Ferme et al. (2004), as principais bactérias produtoras de amônia incluem as espécies *Prevotella ruminantium* e *Prevotella bryantii*, sendo esta última sensível a ação dos AG insaturados (MAIA et al., 2007). Adicionalmente, AG insaturados exercem efeitos tóxicos sobre a população ruminal de protozoários, sendo comumente observado diminuição da concentração de N amoniacal em animais defaunados em decorrência da redução da atividade predatória e proteolítica dos protozoários (DOREAU e FERLAY, 1995; EUGÈNE et al., 2004). Porém, não foram avaliadas as populações de *P. bryantii* e protozoários no presente estudo, logo essas são apenas hipóteses.

A diminuição do N amoniacal no rúmen das vacas consumindo dietas com grão de soja também pode ser explicada pela menor inclusão de ureia nas mesmas, que teve como objetivo tornar as dietas basais iso-proteína degradável no rúmen (PDR), mas não iso-N não proteico (NNP). O comportamento da fermentação ruminal ao longo dos intervalos de avaliação diários reforça essa hipótese, visto que anteriormente o fornecimento da primeira alimentação diária a concentração de N amoniacal era menor no rúmen das vacas das dietas controle, mas aumentou imediatamente após a alimentação em resposta à maior proporção de ureia consumida nessas dietas. Portanto, diferenças na taxa de degradação dos compostos nitrogenados das dietas, aliado à alta taxa de passagem das vacas devido ao nível de consumo,

são fatores que contribuem para diminuição da produção de N amoniacal das vacas alimentadas com dietas com grão de soja em relação às dietas controle.

A combinação de quitosana com grão de soja diminuiu a digestibilidade aparente total do EE. Em estudos prévios que avaliaram o uso da quitosana em dietas sem suplementação lipídica não foram observadas alterações na digestibilidade do extrato etéreo (GOIRI et al., 2010a; ARAÚJO et al., 2015; PAIVA et al., 2016). No entanto, Zhang et al. (2008) reportaram que a quitosana possui pronunciada atividade hipolipidêmica em ratos alimentados com dietas ricas em gordura, com diminuição dos níveis plasmáticos e hepáticos e aumento da excreção fecal de lipídios, sendo tais efeitos atribuídos à redução na absorção da gordura dietética. Segundo Cho et al. (1998), citado por Zhang et al. (2008), a quitosana possui potente capacidade de ligação às gorduras *in vitro*, devido sua estrutura policatiônica.

Comportamento semelhante foi observado em frangos de corte, cuja adição de quitosana reduziu a digestibilidade ileal da gordura, sem alteração sobre a digestibilidade da proteína e do amido (RAZDAN e PETTERSSON, 1994). Estes autores citam os possíveis mecanismos para tal efeito, incluindo aumento da viscosidade da digesta com uso da quitosana, criando uma barreira para a ação de lipases intestinais sobre as partículas de alimentos, e a quelação dos grupamentos glicosamina da quitosana com as micelas lipídicas, prejudicando a absorção das mesmas. Uma característica importante da quitosana é sua baixa solubilidade em água ou pH neutro, tornando-se solúvel em soluções ácidas (KONG et al., 2010). Deste modo, além da possível complexação da quitosana com os lipídios, há hipótese de que ao atingir o abomaso, o qual possui característica ácida, a quitosana se solubilizou e formou uma solução de alta viscosidade com a digesta, prejudicando a ação enzimática sobre os lipídios. Apesar da diminuição numérica na digestibilidade do extrato etéreo pela adição de quitosana na dieta controle, efeito significativo foi observado somente na dieta com grão de soja, o que pode indicar que esse efeito é condicionado ao nível de lipídios da dieta.

Sobre a fermentação ruminal, ainda foi observado que a quitosana foi eficiente em aumentar o pH do rúmen. Embora nos estudos prévios reportados o pH não foi alterado com a adição de quitosana (GOIRI et al., 2010a; ARAÚJO et al., 2015; PAIVA et al., 2016), aumento do pH ruminal já havia sido observado *in vitro* (GOIRI et al., 2009). Os autores relacionaram o aumento do pH ruminal à diminuição da digestibilidade *in vitro* da MO com uso da quitosana, o que não foi observado no presente estudo. O comportamento do pH ruminal ao longo do tempo e em função dos tratamentos nos revela que a quitosana preveniu a queda do pH nas primeiras horas após a alimentação da manhã, sendo significativamente maior somente no intervalo 4 h após o fornecimento das dietas. Tal resultado hipoteticamente

pode nos indicar que o aditivo antimicrobiano aumentou a fase de latência (*lag time*) para adesão e colonização bacteriana às partículas de alimento após a ingestão, mas que a longo prazo não comprometeu a fermentação ruminal devido a ausência de efeitos sobre o total de AGV produzidos. A quitosana possui alta capacidade quelante com vários íons metálicos, em especial cátions divalentes (KONG et al., 2010), os quais parecem ser essenciais ao processo de adesão (KOZLOSKI, 2011). Porém, essa hipótese necessita de maiores estudos.

Não houve alteração do pH ruminal das vacas com o uso de grão de soja nas dietas, embora foi observado um inesperado e expressivo aumento de *Streptococcus bovis*. *S. bovis* é uma bactéria gram-positiva do tipo amilolítica, sendo reconhecida por ser a principal produtora de lactato no rúmen e normalmente associada às desordens digestivas, como acidose ruminal (RUSSEL e STROBEL, 1989). A hipótese era de que caso o grão de soja alterasse essa população, fosse observada uma diminuição em virtude do menor nível de CNF dessa dieta, com consequente redução do aporte de substrato. Entretanto, resultado semelhante foi relatado por Rico et al. (2015), que ao elevar em 2% o teor de AG insaturados na dieta de vacas leiteiras observaram um surpreendente aumento de 380% (0,0024 vs. 0,0005% de bactérias totais) na abundância relativa de *S. bovis* em comparação às vacas da dieta controle, ambas com o mesmo teor de FDN. Das 11 populações microbianas avaliadas, diferenças expressivas entre os tratamentos foram observadas apenas para *S. bovis*, sem alterações sobre o pH ruminal, provavelmente pela baixa participação dessa espécie em relação ao total de bactérias no rúmen mesmo após seu expressivo aumento. Os autores sugerem ainda um efeito positivo de AG insaturados sobre essa espécie, talvez relacionado à sua maior tolerância aos AG insaturados, embora seja sensível aos ionóforos (RUSSEL e STROBEL, 1989).

Os efeitos negativos da associação de quitosana com grão de soja também foram observados sobre a síntese de Nmic. As alterações na fermentação ruminal e populações bacterianas avaliadas, bem como a diminuição do consumo e digestibilidade dos nutrientes, possivelmente causaram inibição do crescimento microbiano e redução de substratos para síntese ruminal nas vacas alimentadas com dietas contendo a combinação de quitosana e grão de soja. Além de mudanças na população bacteriana ruminal, há informações de que a quitosana inibe outros microrganismos *in vitro*, como algumas populações de protozoários, porém com menor intensidade se comparado ao efeito de óleos vegetais (WENCELOVÁ et al., 2014). O efeito inibitório de lipídios sobre os protozoários embora normalmente não resulte em aumento da síntese de Nmic, pode resultar em melhoria da eficiência da síntese de

proteína microbiana com a redução da digestibilidade da MO e FDN (DOREAU e FERLAY, 1995; EUGÈNE et al., 2004).

A síntese de Nmic é dependente do equilíbrio entre a disponibilidade de N e energia para os microrganismos ruminais. Por isso a forma mais comum de avaliar a eficiência de síntese de Nmic (ESN) é a determinação de g de Nmic por unidade de energia disponível do rúmen, tipicamente expressa em MO degradável no rúmen ou carboidratos fermentáveis (BACH et al., 2005). Houve redução da ESN nas vacas consumindo dietas com grão de soja quando essa foi expressa em função do consumo de NDT. No entanto, em virtude de que o uso de lipídios contribui para o consumo total de NDT, mas não para o consumo de energia fermentável no rúmen, quando a ESN foi expressa em função do NDTf não houve diminuição com o uso de grão de soja, apenas tendeu a ser menor para as vacas consumindo a dieta com quitosana e grão e soja. Quando a ESN foi expressa em função da estimativa de MOADR, houve ausência de efeito dos tratamentos, indicando que a diminuição na síntese de Nmic não acompanhou a queda de MOADR, podendo ser devido à inibição de protozoários para as vacas da dieta com quitosana e grão de soja. Entretanto, conforme já relatado, essa hipótese não pode ser comprovada já que não foram quantificados protozoários.

Segundo Bach et al. (2005), a ESN, embora é um parâmetro importante para avaliação do funcionamento do metabolismo microbiano ruminal, é incapaz de avaliar a eficiência com que as bactérias capturam o N disponível no rúmen. Esses autores propõem a avaliação complementar da eficiência de uso de N (EUN) pelas bactérias ruminais. A disponibilidade ruminal de N é uma avaliação complexa de ser realizada *in vivo*, pois não depende apenas da estimativa de degradação ruminal da PB, mas também da reciclagem de N. Considerando essas limitações, avaliamos a EUN a partir do consumo total de N, onde foi observado redução da EUN para as vacas consumindo grão de soja nas dietas. Esse resultado reforça a hipótese de que a diminuição na digestibilidade aparente total da PB da dieta foi em virtude da menor degradação ruminal dos compostos nitrogenados, comprometendo sua eficiência de incorporação pelos microrganismos ruminais.

Em relação à utilização do N consumido para produção ou excreção, foi observado que a secreção de N no leite acompanhou o consumo deste nutriente, onde novamente a combinação de quitosana com grão de soja causou redução. Com a diminuição da digestibilidade da PB para as vacas consumindo dietas com grão de soja, consequentemente houve aumento da excreção fecal de N e diminuição do N na urina. De modo geral, a quitosana melhorou a utilização de N das dietas, pois tendeu a diminuir o total de N excretado, que, consequentemente, aumenta a disponibilidade de N produtivo; e diminuiu o

total de N excretado e secretado, o que indica aumento da retenção aparente de N nas vacas. O efeito positivo da quitosana sobre a utilização do N foi observado somente nas dietas sem suplementação lipídica quando expresso em proporção do consumo, diminuindo a excreção total. Paiva et al. (2016) também observaram melhoria na utilização de N pela adição de quitosana na dieta de vacas em lactação com baixo teor de extrato etéreo.

Embora o consumo de MS foi menor com a adição de quitosana na dieta com grão de soja, em função do aumento no consumo de extrato etéreo com a suplementação lipídica, e consequentemente, maior densidade energética, o consumo de ELl não diferiu das demais dietas. Weiss e Pinos-Rodríguez (2009) relataram que a suplementação lipídica, especialmente na forma de AG insaturados, pode reduzir o consumo de MS, no entanto normalmente o consumo de ELl aumenta ou se mantém. Como o consumo de ELl foi semelhante entre os tratamentos, vacas alimentadas com dietas contendo grão de soja resultaram em maior balanço energético, especialmente na dieta contendo grão de soja adicionada de quitosana, cuja exigência de ELl para produção de leite reduziu consideravelmente.

A quitosana não alterou o perfil metabólico sanguíneo, no entanto foram observados efeitos do grão de soja, com diminuição dos níveis circulantes de glicose e N ureico, além de tendência de diminuição das proteínas totais. Embora o grão de soja tenha aumentado às concentrações ruminais de propionato, esta mudança não refletiu no aumento da glicose sanguínea. Segundo Kozloski (2011), a quantidade de AGV que aparece no sangue portal é diferente daquela produzida no interior do rúmen, pois depende da extensão que são metabolizados pela mucosa ruminal durante o processo de absorção. Ainda, diferentemente do que ocorre no rúmen, onde a proporção molar de AGV vai depender das características da dieta, por exemplo, a proporção de acetato e propionato liberados no sistema portal apresenta alta correlação, ou seja, é relativamente constante e independe do tipo de dieta consumida pelo animal, onde o fluxo portal líquido de AGV glicogênicos (propionato e lactato) representa em torno de 50% do fluxo líquido de AGV cetogênicos (acetato e butirato) (KOZLOSKI, 2011). O mesmo autor aponta que a quantidade líquida de AGV que entra no sistema portal normalmente é relacionada ao consumo de ED ou EM. Embora a dieta com grão de soja adicionada de quitosana resultou em maior produção ruminal de propionato, as vacas deste tratamento tiveram menores consumos de ED e EM.

Adicionalmente, as dietas controle possuíam maior teor de CNF, podendo ter havido algum escape ruminal de amido e ter sido fermentado no intestino grosso, cuja produção de propionato contribuiu para o fluxo líquido portal de AGV. Outra observação é de que, nas

dietas com grão de soja, quando adicionada quitosana, houve redução do consumo de MS das vacas, e consequentemente, um menor *pool* de digesta ruminal, onde o aumento da concentração e proporção molar de propionato não resulta em maior fluxo portal líquido devido à menor quantidade total produzida quando comparado aos demais tratamentos.

Entretanto, dentre as hipóteses levantadas para explicar o aumento da produção ruminal de propionato e diminuição da concentração sanguínea de glicose nas vacas consumindo dietas com grão de soja, pode-se destacar a queda de 10,4% na digestibilidade aparente total da PB nessas dietas, comprometendo a gliconeogênese hepática. O fígado tem alta demanda de aminoácidos, os quais são, em parte, oxidados para produção de ATP ou utilizados para síntese de glicose, proteínas, neurotransmissores, entre outras moléculas. Mesmo no estado alimentado, a gliconeogênese hepática é a principal fonte de glicose nos ruminantes, onde os principais precursores são o propionato e aminoácidos glicogênicos (KOZLOSKI, 2011). Ou seja, é muito provável que devido à diminuição na digestibilidade da PB as dietas com grão de soja tenham resultado em menor suprimento hepático de aminoácidos, o que comprometeu a produção de glicose e sua exportação para o sangue. Ainda, para tentar compensar o menor fluxo portal de aminoácidos oriundos da proteína metabolizável da dieta, é possível que tenha ocorrido demanda hepática de aminoácidos por vias alternativas, como do tecido muscular, evidenciada pela tendência de diminuição dos níveis de proteínas totais no sangue.

Já a diminuição do N ureico no sangue das vacas consumindo dietas com grão de soja é resultado da diminuição da concentração de N amoniacal no rúmen. Segundo Doreau e Ferlay (1995), a amônia produzida no rúmen pela degradação do N dos alimentos e reciclagem de N, tem como vias de saída a incorporação pelos microrganismos ruminais, a absorção pelo epitélio ruminal e ainda uma menor parte via fluxo pelo orifício retículo-omasal. Como não foi observado efeito do grão de soja sobre a síntese de N microbiano, logo a incorporação de N pelos microrganismos não diferiu, a menor concentração de N ureico no sangue é devido a menor absorção de N amoniacal.

O aumento das concentrações de colesteróis e triglicerídeos no sangue com a suplementação de grão de soja é decorrente do aumento do consumo de lipídios presentes na dieta grão de soja. Todas as variáveis sanguíneas avaliadas, incluindo as enzimas hepáticas, estão dentro dos intervalos de confiança para valores de referência preconizados para perfil metabólico normal em vacas leiteiras, segundo Wittwer (2000).

Com relação à produção de leite, dentre os fatores que a afetam, o consumo de MS é o principal determinante para vacas leiteiras em lactação (HRISTOV et al., 2004). Sendo assim,

como resultado da diminuição do consumo, juntamente com as alterações negativas sobre a digestão e metabolismo de nutrientes das vacas alimentadas com dietas contendo a associação de grão de soja e quitosana, foi observada queda na produção de leite, LCG, LCE e produções de gordura, proteína e lactose neste tratamento com relação aos demais.

Diferente do que normalmente ocorre quando são utilizados suplementos lipídicos nas dietas de vacas leiteiras, o uso de grão de soja resultou em maior teor de gordura no leite. Dentre as teorias que explicam o fenômeno da depressão na gordura do leite induzida pela dieta, normalmente são levantadas três hipóteses (SHINGFIELD et al., 2010): diminuição no suprimento de acetato e beta-hidroxibutirato para síntese de novo na glândula mamária; aumento da secreção de insulina, causando a partição de ácidos graxos em direção ao tecido adiposo em detrimento da glândula mamária; e inibição direta da lipogênese mamária por específicos ácidos graxos *trans* intermediários, formandos por alterações nas principais vias de biohidrogenação ruminal. No entanto, o uso de grão de soja nas dietas não causou diminuição na produção total de acetato ruminal, não aumentou a glicose sanguínea para estimular a maior liberação de insulina e, quando avaliado o perfil de ácidos graxos na gordura do leite, foi observada redução na concentração de ácidos graxos *trans* intermediários do processo de biohidrogenação ruminal.

Dentre os ácidos graxos intermediários da biohidrogenação ruminal, o *trans*-10, *cis*-12 CLA tem sido tradicionalmente associado como o principal ácido graxo depressor da gordura no leite (BAUMAN e GRIINARI, 2003). Porém, este não foi detectado na análise do perfil de ácidos graxos no leite, evidenciando que o grão de soja, apesar de ter comprometido a digestibilidade da fibra e modificado a população ruminal de bactérias, não resultou na formação deste isômero de CLA como comumente ocorre com outras fontes lipídicas. O grão de soja também diminuiu os teores de *trans*-11 18:1 (vacênico) e *cis*-9, *trans*-11 CLA na gordura do leite, importantes ácidos graxos formados ao longo da biohidrogenação ruminal.

Todos os ácidos graxos de 4 a 12 carbonos (-C), a maioria dos ácidos graxos de 14-C e uma alta proporção de 16-C são sintetizados de novo na glândula mamária, usando acetato e beta-hidroxibutirato como substrato (CHILLIARD et al., 2000). Pela avaliação do perfil de ácidos graxos, as dietas com grão de soja reduziram em 13,8% o total de ácidos graxos de 4 a 14-C, no entanto houve um aumento de 19,1% no total de ácidos graxos com mais de 16-C. Esses resultados evidenciam que apesar de ter havido diminuição do aporte de acetato e butirato produzidos pela fermentação ruminal para síntese de novo na glândula mamária, vacas consumindo dietas com grão de soja tiveram maior consumo e aporte intestinal de ácidos graxos dietéticos, que são, em sua maioria, ácidos graxos de cadeia longa, podendo ter

ocorrido maior transporte via albumina para absorção direta na glândula mamária, não havendo queda na produção de gordura do leite.

Embora o teor de gordura no leite das vacas consumindo grão de soja foi maior, a produção total de gordura não diferiu das vacas alimentadas com dietas controle, ou seja, assume-se que o aumento no teor de gordura no leite é devido à diminuição proporcional no volume de leite produzido e não a maior síntese de gordura na glândula mamária. Adicionalmente, o consumo de ELl não diferiu entre as dietas, o que justifica ausência de queda na produção de gordura no leite. Segundo Von Soosten et al. (2012), a síntese de gordura do leite representa grande proporção da exigência de energia de uma vaca leiteira especializada, podendo representar até 50% das exigências energéticas de uma vaca de alta produção.

A excreção de N ureico no leite foi menor nas vacas consumindo grão de soja, como resposta à diminuição da digestibilidade da PB, N amoniacal ruminal e N ureico no sangue com uso dessas dietas. Rodriguez et al. (1997) também observaram redução de N ureico no leite com a suplementação lipídica em dietas de vacas leiteiras ricas em amido e de baixa fibra. O N ureico no leite é derivado principalmente da N ureico sanguíneo, oriundo da degradação proteica ruminal e produção de N amoniacal, bem como do catabolismo de aminoácidos no fígado (DEPETERS e FERGUSON, 1992).

Conforme discutido anteriormente, a adição de quitosana aumentou a retenção aparente de N e a proporção de N produtivo nas vacas consumindo dietas controle, e embora não foi observado aumento da eficiência de uso de N consumido para produção de proteína do leite nessas dietas, a quitosana aumentou a eficiência alimentar das vacas para produções de leite corrigidas para gordura e energia. Tal resultado evidencia o grande potencial de uso deste aditivo em dietas com baixo teor de extrato etéreo. Já o grão de soja, devido diminuição da digestibilidade da proteína da dieta, da EUN e da proporção de N no leite em relação ao consumido, consequentemente também diminuiu a eficiência de uso do N para produção de proteína do leite.

A hipótese inicial desse estudo sugeria que a quitosana, além de possíveis melhorias no desempenho ou eficiência produtiva das vacas leiteiras, poderia resultar em melhor composição de ácidos graxos na gordura do leite das vacas, reduzindo a biohidrogenação ruminal de ácidos graxos insaturados da dieta. Esta hipótese foi aceita, pois a adição de quitosana nas dietas aumentou a concentração de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e poliinsaturados (AGPI) e diminuiu a concentração de ácidos graxos saturados (AGS) na gordura do leite das vacas. Do total de AGPI, destaca-se o aumento de 12,9% no teor total de

cis-9, *trans*-11 CLA na gordura do leite com uso da quitosana, sendo este ácido graxo um produto da incompleta biohidrogenação ruminal e importante isômero do ácido linoleico conjugado, com diversos efeitos nutracêuticos comprovados sobre a saúde humana (PARODI, 2001; BENJAMIN e SPENER, 2009). Em um dos poucos estudos que já avaliaram a associação de quitosana com lipídeos (óleo de girassol e farelo de canola), foi observado que a mesma foi eficiente em inibir a completa biohidrogenação *in vitro*, aumentando *trans*-11 18:1 e a proporção de CLA (GOIRI et al., 2010b), similar ao observado neste estudo com vacas leiteiras.

Dentre as microorganismos ruminais responsáveis pela biohidrogenação de ácidos graxos insaturados, as bactérias são reconhecidas como as principais, podendo estar na forma livre ou associadas a protozoários (LOURENÇO et al., 2010). Das bactérias ruminais capazes de hidrogenar ácidos graxos insaturados, podem ser divididas em dois grupos, A e B. O grupo A reduz 18:2 n-6 e 18:3 n-3 à *trans*-11 18:1 e o grupo B hidrogenam AGPI e *trans*-11 18:1 à 18:0 (LOURENÇO et al., 2010). Modernas análises filogenéticas demonstraram que bactérias do grupo A compreendem uma gama de espécies, que incluem o grupo das *Butyrivibrio*, como *B. fibrosolvens*, *B. hungatei* e *Pseudobutyrivibrio* spp. (BOECKAERT et al., 2008). Já no grupo B é reconhecido um pequeno conjunto de cepas de bactérias da espécie *B. proteoclasticus* (WALLACE et al., 2006), embora possa haver outros grupos de bactérias ainda não identificadas.

Neste estudo, além da quantificação de bactérias envolvidas na biohidrogenação de AG insaturados, sendo o grupo *Butyrivibrio* e a espécie *B. proteoclasticus*, foram quantificadas mais duas espécies bacterianas envolvidas na lipólise e transformação de lipídeos, sendo *Anaerovibrio lipolytica* (HENDERSON, 1971) e *Streptococcus bovis* (HUDSON et al., 1998, 2000), respectivamente. Adicionalmente, foi avaliada a espécie *Fibrobacter succinogenes*, importante bactéria celulolítica ruminal, que recentemente foi apontada como principal espécie sensível à ação da quitosana em estudo *in vitro* (BELANCHE et al., 2016).

Confirmando nossa hipótese, a quitosana diminuiu a população de bactérias do grupo *Butyrivibrio* e tendeu a diminuir a espécie *B. proteoclasticus*, sendo estas as principais bactérias envolvidas na biohidrogenação ruminal de AG poliinsaturados. Já o grão de soja diminuiu as bactérias biohidrogenantes do grupo *Butyrivibrio* e também a espécie celulolítica *Fibrobacter succinogenes*, o que justifica a queda na digestibilidade da FDN nessa dieta. Mas o efeito mais expressivo do grão de soja foi sobre o significativo aumento (mais de 50 *fold-changes* em relação à dieta controle) da espécie *Streptococcus bovis*. Embora esta espécie seja

comumente conhecida por ser a principal produtora de lactato no rúmen e que normalmente não era associada com o metabolismo de AG insaturados, os estudos de Hudson et al. (1998, 2000) apontaram que *S. bovis* facilmente hidrata o ácido linoleico, abundante no grão de soja, para ácido 13-hidroxi-9-octadecenoico. Recentemente Rico et al. (2015) observaram relação entre aumento de ácido linoleico na dieta via inclusão de óleo de soja com pronunciado aumento da abundância relativa de *S. bovis* na população ruminal.

O fenômeno de hidratação de ácidos graxos compete com os processos de biohidrogenação (HUDSON et al., 1998, 2000). Deste modo, devido ao aumento significativo de *S. bovis* no rúmen das vacas consumindo grão de soja e a baixa concentração de AG intermediários do processo de biohidrogenação identificados no leite, é possível que essa rota foi parcialmente substituída pelos processos de hidratação ruminal do ácido linoleico. No entanto, no momento da análise do perfil de ácidos das amostras de leite ainda não tínhamos os resultados de quantificação de populações microbianas, tampouco o conhecimento desse processo de hidratação ruminal de ácidos graxos pela espécie *S. bovis*. Assim, sem o padrão interno analítico de 3-hidroxi-9-octadecenoico, não foi possível identifica-lo nas amostras de leite para comprovar a hipótese levantada.

Outra avaliação importante sobre o metabolismo de AG insaturados em vacas leiteiras, além do processo de biohidrogenação ruminal, diz respeito às modificações estruturais que ocorrem na glândula mamária antes de serem excretados no leite. Embora o *cis*-9, *trans*-11 CLA pode ser formado no rúmen pela incompleta biohidrogenação de AG poliinsaturados da dieta, a maior parte do CLA do leite bovino, podendo chegar até 90%, é formado pela dessaturação do ácido vacênico na glândula mamária (KEATING et al., 2006). A enzima *estearoil-CoA dessaturase* (sigla SCD1), ou também conhecida por *Δ9 dessaturase*, é a responsável pela inserção de dupla ligação na posição 9 em diferentes tipos de AG, sendo encontrada no tecido adiposo e glândula mamária de ruminantes (GRIINARI et al., 2000). No entanto, o aumento da disponibilidade de AG poliinsaturados na glândula mamária pode diminuir a atividade da SCD1 (ANGULO et al., 2012). Uma forma indireta de avaliar se houveram mudanças na atividade desta enzima é através da relação entre a concentração de determinados AG na gordura do leite que são produtos (AG com insaturação do tipo *cis*-9) e substratos da SCD1.

Embora o grão de soja aumentou o teor de AG insaturados na gordura do leite, há evidências de que diminuiu a expressão da enzima SCD1 na glândula mamária devido redução nas relações de dessaturação dos AG, exceto para *cis*-9, *trans*-11 CLA/*trans*-11 18:1. Segundo Halmemies-Beauchet-Filleau et al. (2017), a relação *cis*-9, *trans*-11 CLA/*trans*-11

18:1 na gordura do leite varia de 0,35 a 0,60. Dependendo da fonte lipídica utilizada nas dietas, essa relação pode ser ainda menor, de 0,31 com uso de óleo de canola e de 0,16 para óleo de canola com algas enriquecidas com DHA (ANGULO et al., 2012). A relação média observada nesse experimento foi de 0,59, evidenciando que apesar de ter diminuído as demais relações, aparentemente o grão de soja não tem um efeito negativo substancial sobre a SCD1 na glândula mamária se comparado a outras fontes de AG.

Contrariamente, a quitosana aumentou a relação *cis*-9 18:1/18:0 e tendeu a aumentar outras duas relações de dessaturação. É pouco provável que esse efeito seja em decorrência do aumento da atividade da SCD1, e sim devido ao aumento do fluxo de AG com insaturações do tipo *cis*-9 para glândula mamária, visto que a quitosana diminuiu a biohidrogenação ruminal.

2.7 CONCLUSÕES

Para vacas em lactação, a utilização de quitosana associada à suplementação com grão de soja nas dietas altera a fermentação ruminal e a população relativa de bactérias, que apesar de diminuir a biohidrogenação ruminal completa e aumentar o teor de ácidos graxos insaturados na gordura do leite, afeta negativamente o consumo e digestibilidade dos nutrientes, e a síntese de proteína microbiana, resultando na diminuição da produção de leite. No entanto, a adição de quitosana em dietas com baixo teor de extrato etéreo pode ser uma boa estratégia nutricional para aumentar a retenção de N e a eficiência alimentar de vacas em lactação, e adicionalmente, aumentar o teor de ácidos insaturados e de *cis*-9, *trans*-11 CLA na gordura do leite.

2.8 LITERATURA CITADA

AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL - ARC. **The Nutrient Requirements of Ruminant Livestock** (Suppl. 1). Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, UK, 1984.

AHVENJÄRVI, S.; VANHATALO, A.; HUHTANEN, P. Supplementing barley or rapeseed meal to dairy cows fed grass-red clover silage: I. Rumen degradability and microbial flow. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 2176-2187, 2002.

ANGULO, J.; MAHECHA, L.; NUERNBERG, K.; NUERNBERG, G.; DANNENBERGER, D.; OLIVERA, M.; BOUTINAUD, M.; LEROUX, C.; ALBRECHT, E.; BERNARD, L. Effects of polyunsaturated fatty acids from plant oils and algae on milk fat yield and

composition are associated with mammary lipogenic and SREBF1 gene expression. **Animal**, v. 6, p. 1961-1972, 2012.

AOAC. **Official Methods of Analysis**. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA. 2000.

ARAÚJO, A. P. C.; VENTURELLI, B. C.; SANTOS M. C. B.; GARDINAL R.; CÔNSOLO N. R. B.; CALOMENI G. D.; FREITAS J. E.; BARLETTA R. V.; GANDRA J. R.; PAIVA P. G.; RENNÓ F. P. Chitosan affects total nutrients digestion and ruminal fermentation in Nellore steers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 206, p. 114-118, 2015.

BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D. Nitrogen Metabolism in the Rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 88 (E. Suppl.), p. E9–E21, 2005.

BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review of Nutrition**, v. 23, p. 203–227, 2003.

BELANCHE, A.; PINLOCHE, E.; PRESKETT, D.; NEWBOLD, C. J. Effects and mode of action of chitosan and ivy fruit saponins on the microbiome, fermentation and methanogenesis in the rumen simulation technique. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, p. 01-13, 2016.

BENJAMIN, S.; SPENER, F. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 6, p. 36, 2009.

BOECKAERT, C.; VLAEMINCK, B.; FIEVEZ, V.; MAIGNIEN, L.; DIJKSTRA, J.; BOON, N. Accumulation of *trans*C18:1 fatty acids in the rumen after dietary algal supplementation is associated with changes in the *Butyrivibrio*community. Applied and Environmental Microbiology, v. 74, p. 6923-6930, 2008.

BRODERICK, G. A.; KANG-MEZNARICH, J. H. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino-acids in ruminal fluid and *in vitro* media **Journal of Dairy Science**, v. 63, p. 64-75, 1980.

CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, W.; CASTILLEJOS, L.; FERRET, A. Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation – A Review. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2580-2595, 2007.

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of technical details. (Occasional publication) **International Feed Research Unit**. Bucksburnd, Aberdeen: Rowett Research Institute. 21p. 1992.

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; MANSBRIDGE, R. M.; DOREAU, M. Ruminant milk plasticity: Nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids. **Annales de Zootechnie**, v. 49, p. 181-205, 2000.

CHILLIARD, Y.; MARTIN, C.; RUEL, J.; DOREAU, M. Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 5199-5211, 2009.

CHO, Y.I.; NO, H. K.; MEYERS, S.P. Physicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3839-3843, 1998.

DAIRY RECORDS MANAGEMENT SYSTEMS, DHI Glossary, Disponívelem: <http://www.drms.org/PDF/materials/glossary.pdf>. Acessoem: 21 set. 2016.

DePETERS, E. J.; FERGUSON, J. D. Nonprotein nitrogen and protein distribution in the milk of cows. **Journal of Dairy Science,** v. 75, p. 3192, 1992.

DOREAU, M.; FERLAY, A. Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: A review. **Livestock Production Science**, v. 43, p. 97-110, 1995.

DSCHAAKA, C. M.; EUN, J. S.; YOUNG, A. J.; BERGMAN, J. W. Nutritive merits of whole Nutrasaff safflower seed when fed to Holstein dairy cows during mid lactation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 156, p. 26–36, 2010.

DUFFIELD, T. F.; RABIEE, A. R.; LEAN, I. J. A Meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 1. Metabolic effects. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 1334-1346, 2008.

ERWIN, E. S.; MARCO, G. J.; EMERY, E. M. Volatile Fatty Acid Analyses of Blood and Rumen Fluid by Gas Chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 44, n. 9, p. 1768–1771, 9 set. 1961. Disponível em: <http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022030261899566/fulltext>. Acesso em: 18 dez. 2015.

EUGÈNE, M.; ARCHIMÈDE, H.; SAUVANT, D. Quantitative metaanalysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. **Livestock Production Science**, v. 85, p. 81-97, 2004.

EUROPEAN COMMISSION. **Regulation (EC) No. 1831/2003** of the European parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. Off. J. L268: 229-243. 2003.

FENG, S.; LOCK, A. L.; GARNSWORTHY, P. C.A rapid method for determining fatty acid composition of milk. **Jounal of Dairy Science**, v. 87, p. 3785–3788, 2004.

FERME, D.; BANJAC, M.; CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; KAMEL, C.; AUGUSTIN, G. The effects of plant extracts on microbial community structure in a rumen-simulating continuous-culture system as revealed by molecular profiling. **Folia Microbiologia**, v. 49, p. 151-155, 2004.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S.A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497–509, 1957.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO.Fats and fatty acids in human nutrition.Report of an expert consultation.**FAO food and nutrition**

paper 91. FAO, Rome, Italy. 2010. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i1953e.pdf>. Acessoem: 5 abr. 2016.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. 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.

FUJIHARA, T.; ØRSKOV, E. R.; REEDS, P. J.The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 109, p. 7-12, 1987.

GETACHEW, G.; ROBINSON, P. H.; DEPETERS, E. J.; TAYLOR, S. J.; GISI, D. D.; HIGGINBOTHAM, G. E.; RIORDAN, T. J. Methane production from commercial dairy rations estimated using an in vitro gas technique. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123-124, p. 391–402, set. 2005. Disponívelem: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840105001720>. Acessoem: 1 dez. 2015.

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, 2009.

GOIRI, I.; INDURAIN, G.; INSAUSTI, K.; SARRIES, V.; GARCIA-RODRIGUES, A. Ruminal biohydrogenation of unsaturated fatty acids in vitro as affected by chitosan. **Animal Feed Science and Technology**, v. 159, p. 35–40, 2010b.

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

GONZÁLEZ-RONQUILLO, M.; BALCELLS, J.; GUADA, J. A.; VICENTE, F. Purine derivative excretion in dairy cows: endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic acid supply. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1282–1291, 2003.

GRIINARI, J. M.; CORL, B. A.; LACY, S. H.; CHOUINARD, P. Y.; NURMELA, K. V. V.; BAUMAN, D. E. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by D9-desaturase. **Nutrient Metabolism**, p. 2285-2291, 2000.

HALMEMIES-BEAUCHET-FILLEAU, A.; SHINGFIELD, K. J.; SIMPURA, I.; KOKKONEN, T.; JAAKKOLA, S.; TOIVONEN, V.; VANHATALO, A. Effect of incremental amounts of camelina oil on milk fatty acid composition in lactating cows fed diets based on a mixture of grass and red clover silage and concentrates containing camelina expeller. **Journal of Dairy Science,** v. 100(1), p. 305-324, 2017.

HENDERSON, C. A study of the lipase of *Anaerovibriolipolytica*: a rumen bacterium. **Journal of General Microbiology**, v. 65, p. 81–89, 1971.

HRISTOV, A. N.; PRICE, W. J.; SHAFII, B. A meta-analysis examining the relationship among dietary factors, dry matter intake, and milk yield and milk protein yield in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 2184-2196, 2004.

HUDSON, J. A.; CAI, Y.; CORNER, R. J.; MORVAN, B.; JOBLIN, K. N. Identification and enumeration of oleic acid and linoleic acid hydrating bacteria in the rumen of sheep and cows. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 286-292, 2000.

HUDSON, J. A.; MORVAN, B.; JOBLIN, K. N. Hydration of linoleic acid by bacteria isolated from ruminants. **FEMS Microbiology Letter**, v. 169, p. 277-282, 1998.

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.

JENKINS, T. C. Symposium: advances in ruminant metabolism: lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 3851-3863, 1993.

KEATING, A. F.; KENNELLY, J. J.; ZHAO F. Characterization and regulation of the bovine stearoyl-CoA desaturase gene promoter. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 344, p. 233-240, 2006.

KHAFIPOUR, E.; LI, S.; PLAIZIER, J. C. et al. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 7115-7124, 2009.

KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of art review. **International Journal of Food Microbiology,** v. 144, p. 51-63, 2010.

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos Ruminantes**. 3.ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2011. 214p.

KRAMER, J. K. G.; FELLNER, V.; DUGAN, M. E. R. et al. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. **Lipids**, v. 32, p. 1219-1228, 1997.

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T. M.; VAN SOEST, P. J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 57, p. 347–358, 1996.

LIVAK K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{\Delta\Delta}$CT Method. **Methods**, v. 25(4), p. 402–408, 2001.

LOCK, A. L.; SHINGFIELD, K. J. Optimising milk composition.Pages 107–188 in Dairying -Using Science to Meet Consumers' Needs.KEBREAB, E.; MILLS, J.; BEEVER, D.E. ed. **The British Society of Animal Science** Publ. 29.Nottingham University Press, Loughborough, UK, 2004.

LOURENÇO, M.; RAMOS-MORALES, E.; WALLACE, R. J.The role of microbes in rumen lipolysis and lipid metabolism in vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 3874-3882, 2010.

MAEDA, H.; FUJIMOTO, C.; HARUKI, Y.; MAEDA, T.; KOKEGUCHI, S.; PETELIN, M.; ARAI, H.; TANIMOTO, I.; NISHIMURA, F.; TAKASHIBA, S. Quantitative real-time PCR

using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillusactinomycetemcomitans*, *Porphyromonasgingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 39, p. 81-86, 2003.

MAIA, M. R. G.; CHAUDHARY, L. C.; BESTWICK, C. S.; RICHARDSON, A. J; MCKAIN, N.; LARSON, T. R.; GRAHAM, I. A.; WALLACE, R. J. Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibriofibrisolvens*. **BMC Microbiology**, v. 52. p. 1-10, 2010.

MAIA, M. R. G.; CHAUDHARY, L. C.; FIGERES, L.; WALLACE, R. J. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 91, p. 303–314, 2007.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Purine quantification in digesta from ruminants by spectrophotometric and HPLC methods. **British Journal of Nutrition**, v. 81, p. 107–112, 1999.

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.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**.7.ed. Washington, D.C.: Academic Press, 2001. 381 p.

ORELLANA-BOERO, P.; BALCELLS, J.; MARTÍN-ORÚE, S. M.; LIANG, J. B.; GUADA, J. A. Excretion of purine derivatives in cows: Endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. **Livestock Production Science**, v. 68, p. 243–250, 2001.

OTT, R. L. **An introduction to statistical methods and data analysis**.Wadsworth, 1983. 354p.

PAILLARD, D.; McKAIN, N; RINCON, M. T.; SHINGFIELD, K. J.; GIVENS, D. I.; WALLACE, R. J. Quantification of ruminal *Clostridium proteoclasticum*by real-time PCR using a molecular beacon approach. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 1251-1261, 2007.

PAIVA, P. G.; FERREIRA DE JESUS, E.; DEL VALLE, T. A.; ALMEIDA, G. F.; COSTA, A. G. B. V. B.; CONSENTINI, C. E. C.; ZANFERARI, F.; TAKIYA, C. S.; BUENO, I. C. S.; RENNÓ, F. P. Effects of chitosan on ruminal fermentation, nutrient digestibility, and milk yield and composition of dairy cows. **Animal Production Science**, v. 57, p. 301-307, 2016.

PARODI, P. W. Cows' milk components with anti-cancer potential. **Australian Journal of Dairy Technology**,. v. 56, p. 65-73, 2001.

PLAIZIER, J. C.; MARTIN, A.; DUFFIELD, T.; BAGG, R.; DICK, P.; McBRIDE, B. W. Effect of a prepartum administration of monensin in a controlled-release capsule on apparent digestibilities and nitrogen utilization in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 2918–2925, 2000.

RAZDAN, A.; PETTERSSON, D. Effect of chitin and chitosan on nutrient digestibility and plasma lipid concentrations in broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, v. 72, p. 277-288, 1994.

RELLING, A. E.; REYNOLDS, C. K. Feeding rumen-inert fats differing in their degree of saturation decreases intake and increases plasma concentrations of gut peptides in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 1506-1515, 2007.

RICO, D. E.; HOLLOWAY, A. W.; HARVATINE, K. J. Effect of diet fermentability and unsaturated fatty acid concentration on recovery from diet-induced milk fat depression. **Journal of Dairy Science**, v. 98(11), p. 7930-7943, 2015.

RODRIGUEZ, L. A.; STALLINGS, C. C.; HERBEIN, J. H.; MCGILLIARD, M. L. Effect of Degradability of Dietary Protein and Fat on Ruminal, Blood, and Milk Components of Jersey and Holstein Cows. **Journal of Dairy Science,** v. 80, n. 2, p. 353-363, 1997.

RUSSEL, J. B.; STROBEL, H. L. Mini-review: the effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 1, p. 1-6, 1989.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning – A laboratory manual.** 3rd ed. Cold Spring Harbor Press, Woodbury, NY, 2001.

SENEL, S.; MCCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine, **Adv Drug Deliver Reviews**, v. 56, p. 1467-1480, 2004.

SHINGFIELD, K. J.; BERNARD, L.; LEROUX, C.; CHILLIARD, Y. Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. **Animal**, v. 4, p. 1140-1166, 2010.

SKLAN, D. R.; ASHKENAZI, R.; BRAUN, A.; DEVORIN, A.; TABORI, K. Fatty acids, calcium soaps of fatty acids, and cotton seeds fed to high yielding cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2463-2472, 1992.

STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 165–174, 2007.

TAJIMA, K.; AMINOV, R. I.; NAGAMINE, T.; MATSUI, H.; NAKAMURA, M.; BENNO, Y. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2766–2774, 2001.

VON SOOSTEN, D.; MEYER, U.; PIECHOTTA, M.; FLACHOWSKY, G.; DÄNICKE, S. Effect of conjugated linoleic acid supplementation on body composition, body fat mobilization, protein accretion, and energy utilization in early lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 3, p. 1222-1239, 2012.

WALLACE, R. J.; CHAUDHARY, L. C.; McKAIN, N; McEWAN, N. R.; RICHARDSON, A. J.; VERCOE, P. E.; WALKER, N. D.; PAILLARD, D. *Clostridium proteoclasticum*: A ruminal bacterium that forms stearic acid from linoleic acid. **FEMS Microbiology Letter**,v. 265, p. 195-201, 2006.

WEISS, W. P.; PINOS-RODRÍGUEZ, J. M. Production responses of dairy cows when fed supplemental fat in low- and high-forage diets. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 6144-6155, 2009.

WELD, K. A.; ARMENTANO, L. E. The effects of adding fat to diets of lactating dairy cows on total-tract neutral detergent fiber digestibility: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 3, p. 1766-1779, 2017.

WENCELOVÁ, M.; VARADYOVA, Z.; MIHALIKOVA, K.; KISIDAYOVA, S.; JALC, D. Evaluating the effects of chitosan, plant oils, and different diets on rumen metabolism and protozoan population in sheep. **Turkish Journal of Veterinary and Animal.**v. 38, p. 26-33, 2014.

WITTWER, F. Marcadores bioquímicos no controle de problemas metabólicos nutricionais em gado de leite. In: **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais.** Porto Alegre: Brasil. UFRGS, p. 63-74, 2000.

YANG, S. L.; BU, D. P.; WANG, J. Q.; HU, Z. Y.; LI, D.; WEI, H. Y.; ZHOU, L. Y.; LOOR, J. J. Soybean oil and linseed oil supplementation affect profiles of ruminal microorganisms in dairy cows. **Animal**, v. 3, p.1562-1569, 2009.

ZHANG, J.; JIU, J.; LI, L.; XIA, W. Dietary chitosan improves hipercholesterolemia in rats fed high fat diets. **Nutrition Research,** v. 28, p. 383-390, 2008.

3 INDICADORES DE EXCREÇÃO FECAL PARA ESTIMATIVAS DE DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL EM VACAS LEITEIRAS: ASPECTOS METODOLÓGICOS E ESTUDO DE ACURÁCIA, PRECISÃO E ROBUSTEZ

3.1 RESUMO

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar a acurácia, precisão e robustez das estimativas de excreção fecal obtidas com o uso de indicadores externos Cr_2O_3 e TiO_2 e internos MSi, FDNi e FDAi, estes analisados em diferentes sacos de incubação *in situ*, em ensaio de digestão com vacas leiteiras consumindo diferentes dietas. Foram utilizadas oito vacas canuladas no rúmen (144 ± 39,7 DEL, 34,3 ± 5,1 kg de leite/dia e 592 ± 57,9 kg de PV) distribuídas em quadrado latino 4×4 replicado, alimentadas com quatro dietas obtidas por esquema fatorial 2×2 pela combinação de quitosana (0 e 4 g/kg de MS da dieta) e grão de soja integral (0 e 140 g/kg de MS da dieta). Foram realizadas coletas totais de fezes ao longo de 24, 48 e 72 horas. Os indicadores externos foram dosados diariamente, sendo 15g/vaca, via cânula ruminal. Os indicadores MSi, FDNi e FDAi foram determinados sequencialmente por incubação *in situ* de 288 h, cujas amostras de alimentos, sobras e fezes do ensaio de digestibilidade foram incubadas em diferentes sacos, sendo poliéster com porosidade de 12 µm (P12) e 25 µm (P25), sacos F57 (Ankom Technology) e sacos de tecido não-tecido com 100 g/m² (TNT). De modo geral, o Cr_2O_3 gerou estimativas acuradas e precisas, no entanto a recuperação fecal e a robustez foram afetadas pelo consumo de extrato etéreo das vacas. O indicador TiO_2 apresentou incompleta recuperação fecal, com estimativas de baixa acurácia e precisão, além da ausência de robustez com a mudança de peso vivo das vacas. Os indicadores internos MSi, FDNi e FDAi apresentaram recuperação fecal dependente da presença de quitosana na dieta e da combinação entre saco de incubação e indicador. Dentre as combinações avaliadas sem a presença de quitosana, a FDNi em sacos de poliéster de 12 ou 25 µ teve completa recuperação e gerou as estimativas mais acuradas, precisas e robustas. A falta de acurácia e precisão dos indicadores têm grande impacto final sobre as estimativas de digestibilidade aparente total dos nutrientes.

Palavras-chave: Matéria seca indigestível. Fibra em detergente neutro indigestível. Fibra em detergente ácido indigestível. Óxido crômico. Dióxido de titânio.

FECAL EXCRETION MARKERS FOR TOTAL-TRACT APPARENT DIGESTIBILITY ESTIMATES IN DAIRY COWS: METHODOLOGICAL ASPECTS AND ACCURACY, PRECISION AND ROBUSTNESS STUDY

3.2 ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the accuracy, precision and robustness of the fecal excretion estimates obtained with the Cr_2O_3 and TiO_2 external indicators and the internal iDM, iNDF and iADF, which were analyzed in *in situ* different incubation bags, in a digestion assay with diferent dairy cow diets. Multiparous Holstein cows (n = 8, 144 ± 39.7 DIM, 34.3 ± 5.1 kg of milk / day and 592 ± 57.9 kg of BW) fitted with ruminal cannula was allocated in a replicated 4 × 4 Latin squares. Treatments were diets supplemented with chitosan (C - 0 and 4 g / kg of dietary DM basis) and whole raw soybean (WRS - 0 and 140 g / kg of dietary DM basis) arranged in a 2 × 2 factorial design. Total fecal collections were performed over 24, 48 and 72 hours. The external indicators were measured daily (15g / cow) and offer to cows via ruminal cannula. The iDM, iNDF and iADF indicators were determined with food, orts and feces samples from the digestibility assay in *in situ* incubation over 288 hours. This samples were incubated in different bags made of: 1) polyester with porosity of 12 μm (P12) and 25 μm (P25); 2) F57 (Ankom Technology) and 3) nonwoven textile (NWT - 100 g / m²). The Cr_2O_3 generated accurate estimates, but fecal recovery and robustness were affected by the ethereal extract intake. The TiO_2 indicator presented incomplete fecal recovery, with low accurate estimates, besides the absence of robustness with the BW changes. The internal indicators iDM, iNDF and iADF showed fecal recovery according the chitosan inclusion and dependent on the combination of incubation bags and indicator. According the combinations without chitosan, the iNDF in polyester bags both of 12 or 25 μ indicated complete recovery and generated the most accurate, define and robust estimates. The lack of accuracy and precision of the indicators have a big final impact on the estimates of total apparent digestibility of nutrients.

Keywords: Indigestible dry matter. Indigestible neutral detergent fiber. Indigestible acid detergente fiber. Chromic oxide. Titanium dioxide.

3.3 INTRODUÇÃO

A digestibilidade de determinado alimento ou dieta permite a caracterização quanto ao seu valor nutritivo, estando diretamente relacionada à disponibilidade de energia e desempenho animal (VAN SOEST, 1994). Portanto, esta é uma avaliação de fundamental importância para a adequação de dietas, mas um tanto desafiadora para nutricionistas de ruminantes. O procedimento padrão para avaliação da digestibilidade aparente total requer um rigoroso controle da ingestão e excreção por um determinado período de tempo, com coleta total de fezes e separação da urina, tornando-o trabalhoso e oneroso. Embora o aumento da duração do período de coleta comumente aumenta a precisão dessa avaliação (HATTAN e OWEN, 1969; FARENZENA et al., 2016), períodos menores, desde que não comprometam a confiabilidade dos resultados, geram consideráveis economias de despesas, trabalho e tempo, além da redução do estresse animal. Mesmo com períodos mais reduzidos de coleta total, há dificuldade para condução deste tipo de experimento quando são utilizados animais de grande porte, em condições de pastejo e fêmeas, especialmente vacas leiteiras de alta produção.

Como abordagem alternativa à coleta total de fezes, o uso de indicadores externos e internos tem sido extensivamente avaliado como método indireto para estimativas da excreção fecal e digestibilidade aparente total em ruminantes. Dos indicadores externos, historicamente o óxido crômico (Cr_2O_3) é o mais utilizado (OWENS e HANSON, 1992; TITGEMEYER 1997). Entretanto, devido a limitações legais associadas ao seu uso como aditivo alimentar e possíveis propriedades carcinogênicas, alternativas têm sido avaliadas, destacando-se o dióxido de titânio (TiO_2; TITGEMEYER et al., 2001; FERREIRA et al., 2009; SAMPAIO et al., 2011a, 2011b). Entre os indicadores internos, a matéria seca indigestível (MSi) e principalmente as fibras em detergentes neutro e ácido indigestíveis (FDNi e FDAi, respectivamente), são bastante empregadas (HUHTANEN et al., 1994; BERCHIELLI et al., 2000, 2005; DETMANN et al., 2007; FERREIRA et al., 2009; KOZLOSKI et al., 2009; SAMPAIO et al., 2011a, 2011b; LEE e HRISTOV, 2013).

Apesar do volume de informações existentes sobre o assunto, os resultados encontrados com o uso de indicadores são muito variáveis, o que compromete a escolha e segurança de aplicação da técnica em estudos de digestão. Diversidade de informações para indicadores externos são mais comumente associadas à variação no perfil nictemeral de excreção (OWENS e HANSON, 1992; TITGEMEYER 1997, et al., 2001; KOZLOSKI et al., 2006), exigindo maior atenção quanto ao número de coletas ao longo do dia. Já a falta de padronização nos procedimentos metodológicos de determinação é atribuída como a grande e

principal causa de variação entre estudos com indicadores internos (BERCHIELLI et al., 2005; CASALI et al., 2009; ÅKERLIND et al., 2011; KRIZSAN et al., 2015; VALENTE et al., 2015).

Avaliações *in situ* de componentes indigestíveis são melhores relacionadas à digestibilidade da MO que as *in vitro*, sendo recomendadas para padronização (KRIZSAN et al., 2012). No entanto, variações metodológicas ainda são observadas para: tempo de incubação ruminal; número de animais para incubação e a relação volumoso:concentrado das suas dietas; tamanho de partícula da amostra; quantidade total de amostra e por área superficial específica do saco de incubação; porosidade e tipo de material têxtil do saco; entre outras. Dentre essas causas de variação, o tipo de tecido e a porosidade do saco de incubação *in situ* apresentam baixa consensualidade, com diferentes recomendações na literatura. O tipo de tecido varia desde os similares nylon e poliéster (HUHTANEN et al., 1994, 1998; ÅKERLIND et al., 2011; KRIZSAN et al., 2015) à materiais não têxteis, como o tecido não-tecido (TNT), e ainda sacos comerciais, como o F57 (F57 filter bags, Ankom Technology, Fairport, EUA; CASALI et al., 2009; VALENTE et al., 2011, 2015). Nesses estudos, as características de porosidade variam desde 6 a 50 µm, até o uso de têxteis sem padrão homogêneo de poros, como o TNT. No entanto, as avaliações de sacos de incubação, em sua maioria, apresentam recomendações generalistas, ou seja, assumem como melhor material aquele que provem maior resíduo de incubação, pressupondo que os demais propiciaram perdas de partículas (CASALI et al., 2009; VALENTE et al., 2011; KRIZSAN et al., 2015). Todavia, se o objetivo é utilizar componentes indigestíveis como indicadores internos para ensaios de digestibilidade, pode ser prudente considerar a recuperação fecal como critério de escolha do melhor material têxtil. O trabalho de Huhtanen et al. (1994) é o único que fez este tipo de abordagem até o momento.

Adicionalmente, há indícios de que indicadores podem sofrer influência da dieta utilizada no ensaio de digestibilidade (LEE e HRISTOV, 2013). Como a ausência de interação com a dieta é uma das características cruciais do indicador ideal (OWENS e HANSON, 1992), essa premissa deve ser investigada, principalmente quando são utilizados ingredientes ou aditivos não convencionais nas dietas.

Além das lacunas nos aspectos metodológicos, grande parte das investigações com indicadores de excreção fecal resume-se à comparação dos valores observados e estimados de digestibilidade, o que permite apenas a avaliação da acurácia, mas não da precisão das estimativas. Além disso, são raros os estudos que incluem uma avaliação da robustez dos indicadores em gerar estimativas isentas de variação associadas às condições experimentais

(RODRIGUES et al., 2010), sejam elas ligadas aos animais (como o peso vivo), ou à dieta e animais (como o consumo de nutrientes).

Com base no exposto, os objetivos desse estudo foram: (a) avaliar a eficiência da coleta total em ensaios de digestão de curto prazo; (b) determinar os efeitos da duração do período de coleta total e da dieta sobre a recuperação fecal dos indicadores externos Cr_2O_3 e TiO_2; (c) determinar os efeitos do tipo de saco de incubação e da dieta sobre a recuperação fecal dos indicadores internos MSi, FDNi e FDAi; (d) avaliar a acurácia, precisão e robustez das estimativas de excreção fecal dos indicadores; (e) quantificar o impacto da falta de acurácia e/ou precisão dos indicadores sobre os coeficientes de digestibilidade dos nutrientes estimados.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais aplicados neste estudo seguiram os "Princípios Éticos na Experimentação Animal", recomendados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), de acordo com o protocolo de nº 3059/2013.

3.4.1 Local, instalações e animais

O experimento foi conduzido nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da FMVZ-USP, em Pirassununga - SP, no período de 14 de setembro a 14 de dezembro de 2013.

Foram utilizadas oito vacas da raça Holandesa canuladas no rúmen, multíparas, com 144 ± 39,7 dias em lactação, 34,3 ± 5,1 kg de leite/dia e 592 ± 57,9 kg de PV ao início do experimento. Essas vacas pertenciam a um grupo total de 24 vacas, que foram submetidas a um experimento de avaliação nutricional de dietas, conforme descrito na Seção 2. As vacas foram alojadas em estábulo tipo *free-stall* com ventilação forçada, porém adaptado com baias individuais de 17,5m^2 de área e providas de camas de areia, sendo ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia, as 6 h e as 16 h.

3.4.2 Delineamento experimental e dietas

Foi utilizado delineamento em duplo quadrado latino 4×4, balanceados para efeitos de *carryover*. Os períodos experimentais tinham duração de 23 dias, sendo 15 dias de adaptação e 8 dias de coletas para variáveis de consumo, e 20 dias de adaptação e 3 dias de coletas para variáveis de digestibilidade. As vacas foram blocadas e distribuídas aos quadrados com base na produção de leite, dias em lactação e peso vivo ao início do experimento.

Para composição das dietas, inicialmente foram formuladas duas dietas basais, isonitrogenadas, com diferentes teores de extrato etéreo a partir da adição de dois níveis de grão de soja integral (0 e 140 g/kg de MS da dieta). Sobre essas dietas basais (*top-dressed*), foram adicionados dois níveis de quitosana (0 e 4 g/kg de MS da dieta; Polymar Ciência e Nutrição, Fortaleza, CE, Brasil), um aditivo antimicrobiano, de modo que as quatro dietas experimentais foram obtidas por um esquema fatorial 2×2, como segue: CO-Q) Controle, composta por uma dieta sem suplementação lipídica e sem adição de quitosana; CO+Q) Quitosana, composta por dieta sem suplementação lipídica e com adição de quitosana; GS-Q) Grão de soja, composta por dieta contendo suplementação lipídica e sem adição de quitosana; e GS+Q) Grão de soja e Quitosana, composta por dieta contendo suplementação lipídica e com adição de quitosana. A proporção volumoso:concentrado das dietas foi 50:50, cuja fonte de volumoso era silagem de milho (Tabela 2.1).

3.4.3 Consumo de nutrientes e análises de alimentos

Diariamente foram feitas pesagens das quantidades de volumoso e concentrado fornecidos para cada vaca, bem como das sobras para estimativa do consumo individual. As vacas foram arraçoadas duas vezes ao dia, às 8 h e às 13 h, de acordo com o consumo de MS do dia anterior, de forma a ser mantido um percentual de sobras das dietas entre 5 e 10 % do fornecido, para não haver limitação de consumo. Os alimentos eram misturados no cocho e fornecidos na forma de dieta completa. Do 16º ao 23º dia de cada período experimental, amostras de ingredientes fornecidos e de sobras foram coletadas diariamente, perfazendo uma amostra composta por período, as quais eram armazenadas a -20ºC para posteriores análises.

As amostras de alimentos e sobras foram pré-secas a 60ºC em estufa com ventilação forçada de ar por 72 horas e moídas a 1 mm em moinho do tipo Wiley (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA, EUA). Foram analisados os teores de MS (método nº 930.15), PB (onde N × 6.25; método de Dumas nº 990.03), EE (método nº 920.39) e cinzas (método nº

942.05), todos de acordo com AOAC (2000). Os teores de FDN foram determinados conforme método descrito por Mertens (2002), com adição de alfa-amilase termoestável e sem a adição de sulfito de sódio ao detergente. A MO foi determinada pela diferença entre os conteúdos de MS e cinzas (Tabelas 2.1 e 2.2).

3.4.4 Coletas de excreção fecal

Coletas totais de fezes foram realizadas nos últimos três dias de cada período experimental, durante 72 h (HATTAN e OWEN, 1969). As fezes foram coletadas diretamente do piso das baias, imediatamente após os animais defecarem, e o conteúdo foi armazenado em sacos plásticos com capacidade de 50 kg, devidamente identificados. Durante os dois intervalos diários de ordenha, cada vaca foi conduzida acompanhada de uma pessoa equipada com balde para colheita da excreção fecal que eventualmente ocorria neste período. Ao final de cada período de 24 h, a produção fecal diária era pesada e homogeneizada, retirando-se uma amostra representativa (aprox. 10% do total), sendo armazenada a -20ºC para posteriores análises. As amostras foram pré-secas à 60ºC por 72 h, moídas a 1 mm e analisados os teores de MS, cinzas, PB, extrato etéreo e FDN, conforme procedimentos já descritos anteriormente. As análises químicas foram realizadas nas amostras dos três dias consecutivos, individualmente. A excreção fecal de MS e nutrientes ao longo de 24, 48 e 72 h foi obtida por cálculos de reconstituição, com base na composição química e na produção fecal relativa de cada um dos três dias de coleta em relação ao total excretado em 72 h, em kg de matéria natural. Os coeficientes de digestibilidade aparente total da MS, MO, PB, EE e FDN foram calculados como {[consumo (kg/d) – excreção fecal (kg/d)]/consumo (kg/d)} × 100.

Além do procedimento de coletas totais, concomitantemente foram realizadas coletas pontuais de fezes em dois protocolos de amostragem fecal, para posterior dosagem de indicadores externos. O objetivo desses dois protocolos era criar situações hipotéticas distintas: intervalos de coleta que abrangessem a possível variação diária na excreção fecal do indicador externo, denominada amostragem “composta”; e uma única coleta pontual, possivelmente não representa do perfil nictemeral de excreção do indicador externo, denominada amostragem “*spot*”. Na amostragem composta, aproximadamente 500 g de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal das vacas em oito intervalos de tempo ao longo de 72 h, sendo uma coleta a cada 9 h, correspondendo a um intervalo de 3 em 3 h de um período de 24 h. Essas amostras foram armazenadas a -20°C, sendo que ao final de cada período eram descongeladas e 300 g de fezes de cada tempo foram homogeneizadas, obtendo-

se uma amostra composta por vaca e por período. Na amostragem *spot*, aproximadamente 700 g de fezes de cada vaca foram coletadas às 12 h do dia 21, em torno 4 horas após a alimentação da manhã. Ambas as amostras, composta e *spot*, foram pré-secas por 72 h à 60ºC e analisadas quanto à composição química de nutrientes, já detalhadas anteriormente.

3.4.5 Fornecimento e dosagem fecal de indicadores externos

Os indicadores externos Cr_2O_3 e TiO_2 foram fornecidos na dose diária de 15 g de indicador por vaca, divididos em duas porções de 7,5 g cada, que eram enroladas em cartuchos de papel e colocadas diretamente no rúmen por intermédio da fístula ruminal, às 9 h e 17 h. O fornecimento iniciou oito dias antes do início das coletas totais de fezes, de modo a permitir a estabilização da excreção do indicador, sendo mantido o fornecimento durante todo período de coleta. As concentrações de Cr_2O_3 nas amostras de fezes foram determinadas conforme técnica descrita por Kimura e Miller (1957) e os teores de TiO_2 foram determinados segundo Myers et al. (2004), este com adaptações na etapa de digestão, realizada em tubos de micro Kjeldahl.

3.4.6 Incubação *in situ* e análises dos indicadores internos

O procedimento metodológico de avaliação *in situ* dos teores de componentes indigestíveis das amostras obtidas no ensaio de digestibilidade foi conduzido utilizando três vacas da raça Holandesa canuladas no rúmen, com 453 ± 19,9 dias em lactação, 14,8 ± 2,3 kg de leite/dia e 740 ± 12,9 kg de peso vivo ao início da incubação. As vacas foram alimentadas com a mesma dieta, contendo alta proporção de volumoso (KRIZSAN e HUHTANEN, 2013), composta de 70% de silagem de milho e 30% de concentrado comercial, sendo previamente adaptadas por 14 dias antes do início das incubações. Condições de alojamento e manejo das vacas foram as mesmas utilizadas no experimento *in vivo*.

Para avaliar o efeito do tipo de saco de incubação *in situ* sobre os resíduos indigestíveis, foram testados os seguintes materiais: P12) sacos de poliéster, com porosidade de 12 µm; P25) sacos de poliéster, com porosidade de 25 µm; F57) sacos comerciais de polímero industrial, com porosidade de 25 µm (F57 filter bags, Ankom Technology, Fairport, EUA); e TNT) sacos de tecido não-tecido, com gramatura de 100 g/m². Os sacos P12, P25 e TNT foram confeccionados com uso de máquina de selagem térmica (Solda Banner 60 cm x 5 mm, Flock Color Ltda., Guarulhos, SP, Brasil). Tecidos de poliéster com porosidade de 12 e

25 µm e respectiva área percentual de poros em relação à área total de superfície de 13 e 18% (Cód. 5058 e 5060, Tegape Importação e Comercio de Tecidos Técnicos Ltda., Curitiba, PR, Brasil), foram utilizados para confecção dos sacos P12 e P25. As dimensões internas dos sacos e a quantidade de amostra pesada foram ajustadas para uma relação de 20 mg de amostra (com base na MS) por cm² de área superficial (NOCEK, 1988).

As amostras de alimentos, sobras e fezes do ensaio de digestibilidade *in vivo* foram pré-secas à 60ºC por 72 h e moídas a 2 mm em moinho do tipo Wiley (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA, EUA). Após processadas, foram pesadas 1 g de amostra, em triplicata, para cada tipo de saco de incubação (uma amostra por saco por vaca), perfazendo um total de 960 sacos. Os sacos foram incubados *in situ* por 288 h conforme recomendações de Krizsan e Huhtanen (2013) e ao final do período de incubação, foram removidos do rúmen e conduzidos para laboratório para início das análises sequenciais dos teores de MSi, FDNi e FDAi das amostras.

Imediatamente após a remoção do rúmen, os sacos foram abundantemente lavados com água corrente, seguidos de banhos de imersão em água destilada até o total clareamento desta e colocados em estufa de ventilação forçada, a 60ºC por 72 h. Para remoção da umidade residual, os sacos foram submetidos à secagem em estufa não ventilada a 105ºC por 1 h, sendo retirados, acondicionados em dessecador (20 sacos/dessecador) e pesados, cujo resíduo foi assumido como MSi. Na sequência, os sacos foram fervidos por 1 h em solução de detergente neutro, incluindo sulfito de sódio (100 mL/g de amostra; MERTENS et al., 2002) em equipamento analisador automático de fibras (Ankom^{2000}, Ankom Technology, Fairport, NY, EUA). Após os procedimentos automáticos de lavagem com água destilada quente, os sacos foram removidos do equipamento e submersos em recipiente contendo acetona P.A. por 5 min, em capela de exaustão. Após a retirada do recipiente e evaporação da acetona, os sacos foram colocados em estufa de ventilação forçada, a 60ºC por 72 h, seguido de estufa a 105ºC por 1 h e pesados, cujo resíduo deste tratamento foi assumido como FDNi. Para obtenção da FDAi, os sacos foram submetidos sequencialmente aos mesmos procedimentos de análise da FDNi, substituindo a solução de detergente neutro pela solução de detergente ácido (método 973.18; AOAC, 2000). O resíduo deste tratamento foi considerado a FDAi. A composição de MSi, FDNi e FDAi dos ingredientes e das dietas basais utilizadas no experimento *in vivo* em função dos diferentes sacos de incubação, expressos em % da MS e incluindo as cinzas residuais, encontra-se na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Componentes indigestíveis *in situ* dos ingredientes e das dietas basais utilizadas no ensaio de digestibilidade em função dos diferentes sacos de incubação (% da MS)

		Ingredientes			
Item	Subitem	Silagem de milho	Milho moído	Farelo de soja	Grão de soja
Indicador[1]	Saco incubação[2]				
MSi	P12	27,1	1,43	0,76	2,66
	P25	26,9	1,33	0,58	2,52
	F57	34,9	9,43	4,61	21,9
	TNT	28,4	6,89	2,91	11,6
FDNi	P12	22,7	0,79	0,42	0,30
	P25	22,2	0,76	0,36	0,30
	F57	27,2	2,79	1,28	1,72
	TNT	21,9	2,24	1,35	2,01
FDAi	P12	13,9	0,37	0,23	0,11
	P25	13,8	0,36	0,17	0,08
	F57	17,2	1,11	0,59	0,67
	TNT	13,5	1,13	0,69	0,88
		---------- Dietas basais ----------			
		Controle		Grão de soja	
MSi	P12	14,1		14,4	
	P25	13,9		14,2	
	F57	21,1		23,2	
	TNT	16,7		17,8	
FDNi	P12	11,6		11,6	
	P25	11,4		11,4	
	F57	14,6		14,6	
	TNT	11,8		11,9	
FDAi	P12	7,12		7,10	
	P25	7,03		7,00	
	F57	9,02		9,01	
	TNT	7,18		7,19	

[1] MSi = matéria seca indigestível; FDNi = fibra em detergente neutro indigestível; FDAi = fibra em detergente ácido indigestível.
[2] P12 = sacos de poliéster com 12 µm; P25 = sacos de poliéster com 25 µm; F57 = sacos comerciais com 25 µm (F57 filter bags, Ankom); TNT = sacos de tecido-não-tecido com gramatura de 100 g/m².

3.4.7 Cálculos

O consumo dos indicadores internos (CI) foi estimado pelo produto da MS ofertada e a concentração do indicador na dieta ([I]dieta), corrigido para as sobras, onde CI (kg/d) = {[MS ofertada (kg/d) × [I]dieta (kg/kg)] – [MS de sobras (kg/d) × [I]sobras (kg/kg)]}. A excreção fecal dos indicadores (EFI) foi estimada pelo produto da excreção fecal de MS observada

(EFo; via coleta total de fezes) e a concentração do indicador nas amostras da coleta total de fezes ([I]fezes), segundo a equação: EFI (kg/d) = EFo (kg/d) × [I]fezes (kg/kg). Logo, a recuperação fecal dos indicadores (RF) foi calculada pela razão entre consumo e excreção fecal, dada por: RF (%) = [EFI (kg/d)/CI (kg/d)] × 100.

As estimativas de excreção fecal de MS (kg/d) foram obtidas dividindo o consumo do indicador (CI; kg/d) pela respectiva concentração do mesmo nas fezes ([I]fezes; kg/kg). As estimativas dos coeficientes de digestibilidade aparente total dos nutrientes foram calculadas como {[consumo (kg/d) – excreção fecal estimada (kg/d)]/consumo (kg/d)} × 100.

3.4.8 Acurácia, precisão e robustez das estimativas

O estudo dos vieses (também chamado de erros residuais ou vícios) das estimativas de excreção fecal, obtidas a partir dos indicadores externos e internos, foi realizado considerando as avaliações de acurácia, precisão e robustez. A acurácia dos indicadores foi avaliada pela diferença entre o valor predito pelo indicador e o valor observado pela coleta total de fezes. Essa diferença foi chamada de viés médio, cujo indicador mais acurado é aquele que possui um viés médio mais próximo de zero (KOHN et al., 1998), segundo a fórmula abaixo:

$$\text{Viés médio} = \frac{\sum (\text{Predito - Observado})}{\text{n° observações}} \tag{3}$$

A precisão dos indicadores foi avaliada considerando a variabilidade dos vieses, ou seja, a variabilidade média de distância entre valores preditos e observados. Logo, a precisão é uma medida de dispersão, que pode ser calculada pela raiz quadrada média do erro de predição (RQMEP; KOHN et al., 1998; St-PIERRE, 2003), de acordo com a fórmula:

$$\text{RQMEP} = \sqrt{\frac{\sum (\text{Predito - Observado})^2}{\text{n° observações}}} \tag{4}$$

Entretanto, toda vez que há falta de acurácia ou o viés médio for alto, ocorre superestimativa da RQMEP ou da falta de precisão, uma vez que a distância média entre o valor predito e o observado leva também ao aumento da variabilidade entre predito e

observado. Deste modo, a correção da RQMEP para falta de acurácia ($RQMEP_{adj}$) permite melhor avaliar a precisão (KOHN et al., 1998), obtida a partir da seguinte fórmula:

$$RQMEP_{adj} = \sqrt{[\ RQMEP^2 - (\text{Viés médio})^2]} \quad (5)$$

O somatório de viés médio e $RQMEP_{adj}$ originou o "índice composto de acurácia e precisão", o qual foi ranqueado, cuja proximidade ao valor paramétrico zero foi adotada como critério de classificação de ordem crescente.

Por fim, a robustez dos indicadores foi avaliada como a capacidade do indicador de gerar estimativas isentas de erros associados às variações nas condições experimentais (RODRIGUES, et al., 2010), ou seja, se há relação linear entre o viés médio das estimativas com características como peso vivo das vacas e nível de consumo de nutrientes.

3.4.9 Análises estatísticas

Os dados foram inicialmente submetidos aos testes de normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (teste de Hartley), segundo Ott (1983), usando os procedimentos UNIVARIATE e GLM, respectivamente, do SAS (version 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA).

Para análise de variância, os dados de excreção fecal de MS e digestibilidade aparente total dos nutrientes observados ao longo de 24, 48 e 72 h de coletas totais de fezes foram analisados como duplo quadrado latino com medidas repetidas no tempo usando o procedimento MIXED do SAS (version 9.2), de acordo com o modelo a seguir:

$$Y_{ijklmn} = \mu + Q_i + GS_j + Q_i \times GS_j + P_k + S_l + V_m(S_l) + T_n + T_n \times Q_i + T_n \times GS_j + T_n \times Q_i \times GS_j + e_{ijklmn} \quad (6)$$

em que: Y_{ijklm} = variável dependente; μ = média geral; Q_i = efeito fixo de quitosana; GS_j = efeito fixo de grão de soja; $Q_i \times GS_j$ = efeito fixo da interação entre quitosana e grão de soja; P_k = efeito fixo de período; S_l = efeito fixo de quadrado; $V_m(S_l)$ = efeito aleatório de vaca dentro do quadrado; T_n = efeito fixo de tempo; $T_n \times Q_i$ = efeito fixo da interação entre tempo e quitosana; $T_n \times GS_j$ = efeito fixo da interação entre tempo e grão de soja; $T_n \times Q_i \times GS_j$ = efeito

fixo da interação entre tempo, quitosana e grão de soja; e e_{ijklmn} = erro residual. A interação entre período × vaca dentro de quadrado foi o erro termo.

Foram comparadas 10 estruturas de covariância para os resíduos (CS, CSH, UN, UN(1), AR(1), ARH(1), HF, TOEP, TOEPH e VC), cuja melhor estrutura para cada variável resposta foi definida pelo menor valor de AICC como critério de escolha, conforme metodologia de Akaike. As médias foram ajustadas pela opção LSMEANS e o teste F para efeito de tratamento em cada tempo foi conduzido usando a opção SLICE. Foram construídos intervalos de confiança ($1 - \alpha = 0,95$) para médias gerais dos tempos, as quais foram também comparadas usando o teste de Dunnett ajustado, considerando o valor obtido em 72 h de coleta total como referência. Adicionalmente, a proporção dos erros padrões em relação às respectivas médias gerais obtidas para cada variável em 24, 48 e 72 h de coleta total, foi utilizada como índice de precisão relativa para identificar quais variáveis nutricionais foram mais ou menos sensíveis e quanto elas variaram ao longo do período de coleta.

Para análise de variância dos dados de RF dos indicadores, assumiram-se modelos estatísticos distintos. As RF dos indicadores externos Cr_2O_3 e TiO_2 foram avaliadas segundo modelo descrito em (6) e de forma independente para cada indicador. As estimativas de variância residual geradas pelo modelo foram utilizadas para construção de intervalos de confiança para RF média ($1 - \alpha = 0,95$), admitindo-se haver RF completa quando o valor paramétrico 100 estivesse contido nos intervalos gerados.

As RF dos indicadores internos MSi, FDNi e FDAi em amostras de 72 h de coleta total foram analisadas como delineamento split-split plot, usando o procedimento MIXED do SAS (version 9.2). Os efeitos de dieta, período, quadrado e de vaca dentro de quadrado compunham o plot principal de observação; o efeito de tipo de saco de incubação dentro de dieta, período, quadrado e vaca compunha o sub plot; e o efeito de tipo de indicador dentro de saco de incubação, dieta, período, quadrado e vaca o sub-sub plot. O modelo está descrito a seguir:

$$Y_{ijklmn} = \mu + D_i + P_j + Q_k + V_l(Q_k) + S_m + S_m \times D_i + I_n + I_n \times D_i + I_n \times S_m + I_n \times S_m \times D_i + e_{ijklmn} \qquad (7)$$

em que: Y_{ijklmn} = variável dependente; μ = média geral; D_i = efeito fixo de dieta; P_j = efeito fixo de período; Q_k = efeito fixo de quadrado; $V_l(Q_k)$ = efeito aleatório de vaca dentro de quadrado; S_m = efeito fixo de saco de incubação; $S_m \times D_i$ = efeito fixo da interação entre saco de incubação e dieta; I_n = efeito fixo de indicador; $I_n \times D_i$ = efeito fixo da interação entre indicador e dieta; $I_n \times S_m$ = efeito fixo da interação entre indicador e saco de incubação;

$I_n \times S_m \times D_i$ = efeito fixo da interação entre indicador, saco de incubação e dieta; e e_{ijklmn} = erro residual. A interação entre dieta × período × vaca dentro de quadrado foi o erro termo do plot principal. A interação entre saco de incubação × dieta × período × vaca dentro de quadrado foi o erro termo do sub plot. O efeito de dieta originalmente incluía os efeitos de quitosana, grão de soja e a interação entre quitosana e grão de soja, os quais foram testados no modelo e devido à ausência de efeito significativo para grão de soja e interação entre quitosana e grão de soja sobre a recuperação, ambos foram removidos.

Foram comparadas 10 estruturas de covariância para os resíduos (CS, CSH, UN, UN(1), AR(1), ARH(1), HF, TOEP, TOEPH e VC), cuja estrutura UN (não estruturada) foi escolhida por apresentar o menor valor de AICC, conforme metodologia de Akaike. Semelhante ao procedimento adotado para indicadores externos, a partir da variância residual do modelo foram construídos intervalos de confiança para RF média ($1 - \alpha = 0{,}95$), admitindo-se haver RF completa quando o valor paramétrico 100 estivesse contido nos intervalos gerados. Os dados são apresentados como *least squares means* (dieta × saco de incubação × indicador).

Os dados de excreção fecal observados com a coleta total e estimados com o uso de indicadores foram avaliados por regressão linear, usando o procedimento GLM do SAS (version 9.2). Os valores observados (Y) foram plotados contra os valores estimados (X) e uma equação de regressão foi ajustada. A reta ajustada foi avaliada segundo as hipóteses de que o coeficiente angular (*slope*) não difere de 1 e o coeficiente linear (intercepto) é igual a 0 (MAYER et al., 1994). O teste t para média igual a 0 foi utilizado para avaliar a significância dos vieses médios (falta de acurácia). Posteriormente, os vieses médios (Y) foram plotados contra os valores observados de excreção fecal (X) para avaliação da inclinação das retas ajustadas, obtendo-se desta forma o viés linear (*slope*), o coeficiente de determinação do modelo (R^2) e a significância (*P*-valor) para cada indicador (KOHN et al., 1998; St-PIERRE, 2003). Por último, a avaliação da robustez dos indicadores foi conduzida pela regressão dos vieses médios (Y) em função de variáveis selecionadas (X; nível de consumo de FDN e extrato etéreo, e peso vivo das vacas) para análise da significância dos *slopes* obtidos. Para todas as variáveis e procedimentos estatísticos conduzidos, significância foi declarada a $P \leq 0{,}05$. Diferenças entre $0{,}05 < P \leq 0{,}10$ foram consideradas tendências de significância.

3.5 RESULTADOS

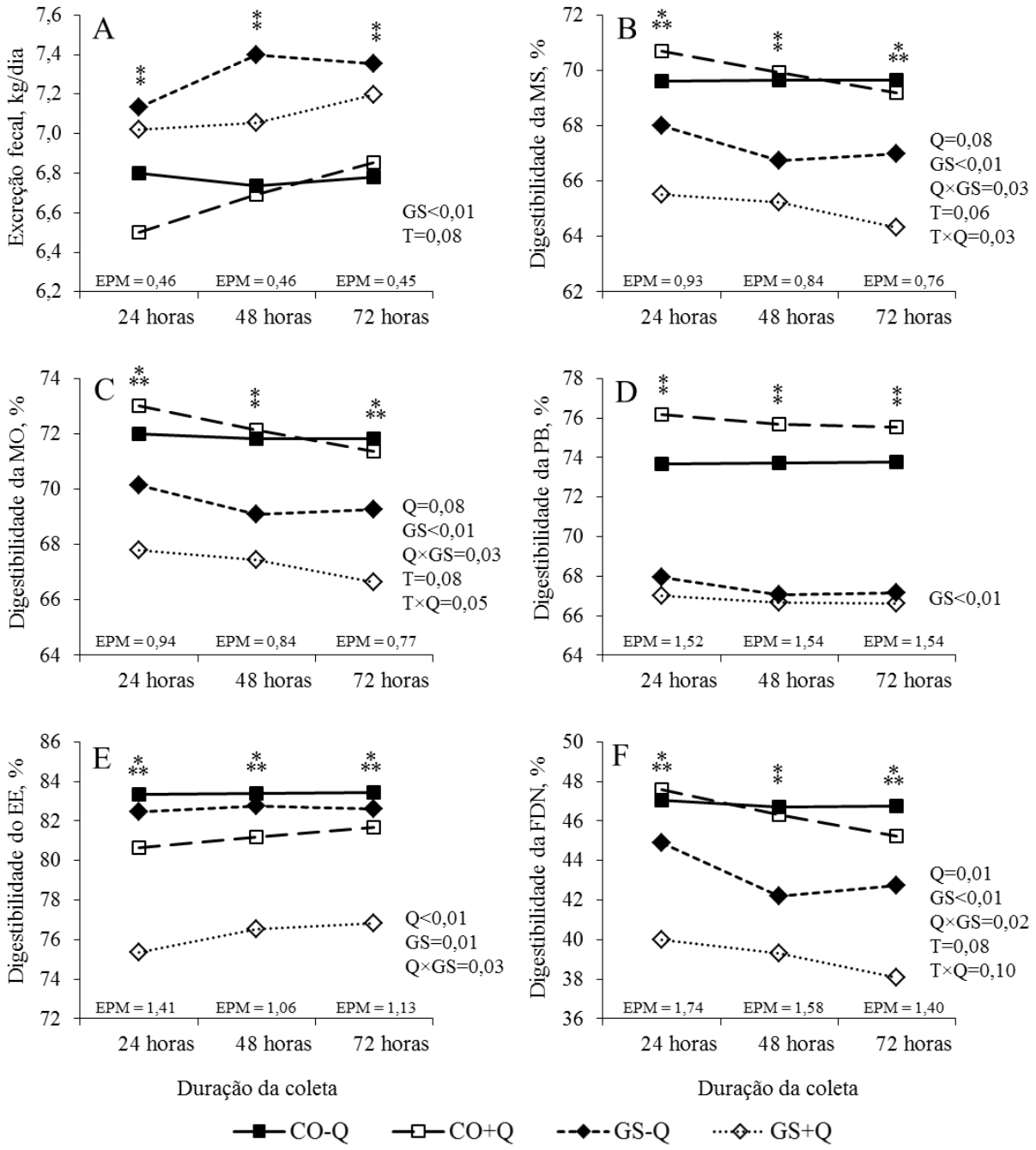
3.5.1 Duração do período de coleta total

Foi observado efeito de interação entre quitosana e tempo sobre a digestibilidade aparente total da MS e MO (P≤0,05) e tendência para digestibilidade da FDN (P=0,10; Figura 3.1). A adição de quitosana às dietas reduziu a digestibilidade desses nutrientes à medida que aumentou a duração do período de coleta total de fezes, sendo que a queda foi maior quando a avaliação teve 72 h de duração em comparação aos tempos de 24 e 48 h. No entanto, a redução na digestibilidade da MS, MO e FDN em 72 h de coletas totais foi significativa apenas quando a quitosana foi adicionada à dieta contendo grão de soja, não diferindo quando adicionada à dieta controle (interação quitosana × grão de soja, P<0,05).

Houve ainda efeito do grão de soja sobre o aumento da excreção fecal de MS e diminuição da digestibilidade da PB, sendo este efeito observado independentemente da duração do período de coletas totais (P<0,05). Interação entre quitosana e grão de soja foi observada para digestibilidade do EE, onde a adição de quitosana à dieta com grão de soja reduziu à digestibilidade deste nutriente, a qual não foi alterada pela adição de quitosana à dieta controle (P<0,05). De modo similar, este efeito também se manteve do menor até o maior período de duração do ensaio de digestão.

Em termos de valores absolutos para médias dos tratamentos obtidas ao longo de 24, 48 e 72 h de duração do período de avaliação, foi observado que as variáveis de digestibilidade da PB e EE se mantiveram muito semelhantes, justificando a ausência de efeito de tempo para duração do período de coleta total (P>0,10). Para as demais variáveis, embora o efeito de tempo sobre a duração do período de coleta total não foi significativo, houve tendência para digestibilidade da MS (P=0,06), excreção fecal e digestibilidades da MO e FDN (P=0,08). À medida que aumentou a duração do período de coleta total, a excreção fecal tendeu a aumentar, e consequentemente, reduziu as digestibilidades da MS, MO e FDN. Diferenças entre valores absolutos foram maiores quando comparado 72 h com 24 h de duração de coletas totais e a variável mais afetada foi a digestibilidade da FDN. A diferença observada de 1,68%, que representa um aumento de 3,89% na digestibilidade da FDN se o período de coletas totais é reduzido de 72 h para 24 h, foi significativa pela comparação de médias do teste de Dunnett (P=0,04; Tabela 3.2).

Figura 3.1 – Efeito da adição de quitosana e grão de soja integral nas dietas de vacas em lactação sobre a excreção fecal (A) e digestibilidade aparente total da MS (B), MO (C), PB (D), EE (E) e FDN (F) ao longo de 24, 48 e 72 h de coletas totais de fezes.



Fonte: Elaborado pelo autor. Médias expressas como *least squares means* (LSM) e n = 96, onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística. Dietas controle (CO) e grão de soja (GS), sem (-Q) ou com (+Q) adição de quitosana. Q = efeito de quitosana (∗); GS = efeito de grão de soja (⁑); Q×GS = efeito de interação entre quitosana e grão de soja (⁂); T = efeito de tempo (duração da coleta); T×GS = efeito de interação entre tempo e grão de soja. Apresentados *P*-valor ≤ 0,10.

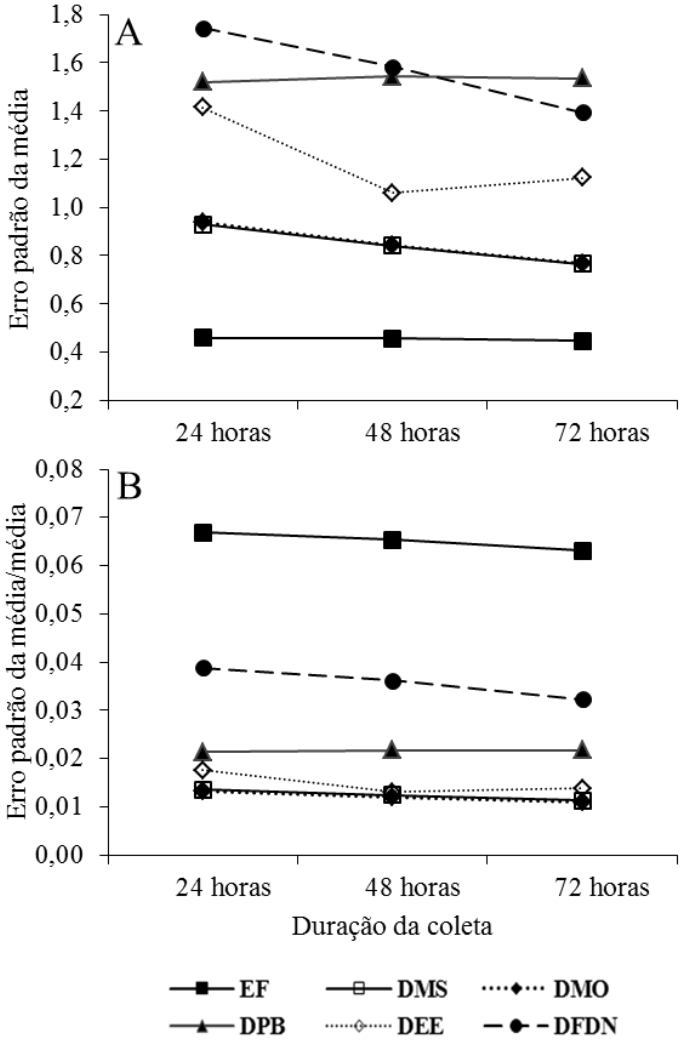
Tabela 3.2 – Efeito da duração do período de coleta total em ensaio de digestão de curto prazo sobre a excreção fecal e digestibilidade aparente total dos nutrientes de vacas em lactação (LSM; n = 96[1])

				IC[3]	
Item	Média	EPM	*P*-valor[2]	< 95%	> 95%
Excreção fecal, kg/dia			0,08		
24 horas	6,86	0,46		5,81	7,91
48 horas	6,97	0,46		5,92	8,02
72 horas	7,05	0,45		6,00	8,09
24h vs. 72h [4]	-0,18	0,09	0,08	-0,39	0,02
48h vs. 72h [4]	-0,08	0,04	0,08	-0,16	0,01
Digestibilidade da MS, %			0,06		
24 horas	68,5	0,93		66,9	70,0
48 horas	67,9	0,84		66,4	69,4
72 horas	67,5	0,76		66,1	69,0
24h vs. 72h [4]	0,94	0,43	0,07	-0,06	1,95
48h vs. 72h [4]	0,36	0,17	0,08	-0,03	0,76
Digestibilidade da MO, %			0,08		
24 horas	70,7	0,94		69,2	72,3
48 horas	70,1	0,84		68,6	71,6
72 horas	69,8	0,77		68,3	71,3
24h vs. 72h [4]	0,96	0,43	0,06	-0,05	1,98
48h vs. 72h [4]	0,35	0,17	0,08	-0,04	0,74
Digestibilidade da PB, %			0,51		
24 horas	71,2	1,52		68,0	74,4
48 horas	70,8	1,54		67,6	74,0
72 horas	70,8	1,54		67,6	73,9
24h vs. 72h [4]	0,44	0,37	0,42	-0,44	1,33
48h vs. 72h [4]	0,02	0,14	0,98	-0,31	0,36
Digestibilidade do EE, %			0,62		
24 horas	80,4	1,41		78,4	82,5
48 horas	81,0	1,06		79,1	82,9
72 horas	81,1	1,13		79,2	83,1
24h vs. 72h [4]	-0,70	0,69	0,51	-2,32	0,93
48h vs. 72h [4]	-0,17	0,32	0,80	-0,92	0,57
Digestibilidade da FDN, %			0,08		
24 horas	44,9	1,74		41,8	48,0
48 horas	43,6	1,58		40,6	46,7
72 horas	43,2	1,40		40,1	46,3
24h vs. 72h [4]	1,68	0,69	0,04	0,05	3,30
48h vs. 72h [4]	0,43	0,33	0,32	-0,33	1,20

[1] Médias expressas como *least squares means* (LSM), onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística.
[2] Efeito de tempo para duração do período de coletas totais de fezes.
[3] Intervalo de confiança ($1 - \alpha = 0,95$), com os respectivos limites inferiores e superiores.
[4] Comparações de médias usando o teste de Dunnett ajustado, considerando os valores observados em 72 h de coleta total como referência.

À medida que aumentou a duração do período de coletas totais, de modo geral, o erro padrão das médias foi reduzido, tornando as avaliações mais precisas, especialmente para as variáveis digestibilidade da FDN e EE. Quando o EPM foi expresso como proporção da respectiva média, as variáveis mais afetadas foram excreção fecal, digestibilidade da FDN e PB, nesta ordem, indicando que suas avaliações foram menos precisas que das demais variáveis. No entanto, mesmo a excreção fecal, que teve menor precisão, apresentou uma razão muito baixa (<0,07), evidenciando que apesar do ensaio de digestibilidade ser de curta duração a precisão das avaliações não foi comprometida (Figura 3.2).

Figura 3.2 – Valores absolutos de erro padrão da média (A) e como proporção da respectiva média (B) para excreção fecal e digestibilidade aparente total dos nutrientes ao longo de 24, 48 e 72 h de coletas totais de fezes de vacas em lactação.



Fonte: Elaborado pelo autor. Excreção fecal (EF) e digestibilidade aparente total da MS, MO, PB, EE e FDN (DMS, DMO, DPB, DEE e DFDN, respectivamente).

3.5.2 Recuperação fecal dos indicadores

A recuperação fecal de indicadores internos e externos foi avaliada de forma independente, com modelos distintos. Para indicadores internos, a RF foi afetada pelas características da dieta usada no ensaio de digestibilidade, pelo tipo de saco de incubação *in situ* utilizado para determinação e também diferiu entre os indicadores (P<0,05). Ainda, foi observada interação entre indicador e saco de incubação para RF (P<0,05; Tabela 3.3).

Tabela 3.3 – Recuperação fecal (RF) dos indicadores internos MSi, FDNi e FDAi avaliada em amostras de 72 h de coleta total de fezes em função do tipo de saco de incubação *in situ* e da adição de quitosana nas dietas de vacas em lactação (LSM; n = 384[1])

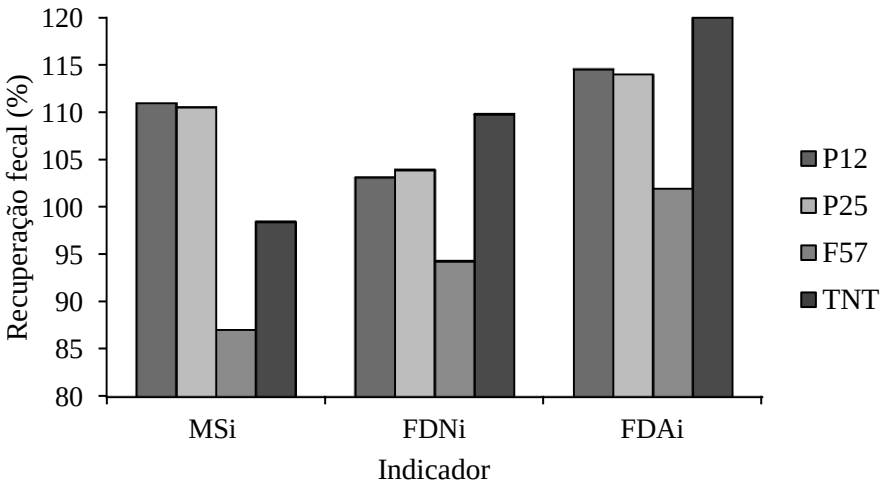
		- Q[2]			+ Q[2]			
			IC[3]			IC[3]		
Item	Subitem	RF	< 95%	> 95%	RF	< 95%	> 95%	EPM
Indicador	Saco[4]							
MSi	P12	107,0	102,2	111,8	115,0	110,2	119,7	2,29
	P25	106,2	101,4	111,0	114,9	110,2	119,7	2,29
	F57	82,6	77,8	87,4	91,6	86,8	96,3	2,29
	TNT	94,3	89,6	99,1	102,6*	97,9	107,4	2,29
FDNi	P12	99,3*	94,5	104,1	107,0	102,2	111,8	2,34
	P25	99,7*	94,9	104,6	108,2	103,3	113,0	2,34
	F57	89,3	84,4	94,1	99,4*	94,5	104,2	2,34
	TNT	104,7*	99,9	109,6	114,9	110,1	119,8	2,34
FDAi	P12	110,5	104,8	116,3	118,6	112,9	124,4	2,86
	P25	109,3	103,5	115,1	118,8	113,1	124,6	2,86
	F57	96,9*	91,2	102,7	107,1	101,3	112,9	2,86
	TNT	116,6	110,9	122,4	127,6	121,8	133,3	2,86
Média		101,4*	97,0	105,7	110,5	106,1	114,8	2,02
P-valor[5]	D				<0,01			
	S				<0,01			
	I				<0,01			
	S×D				0,86			
	I×D				0,72			
	I×S				<0,01			
	I×S×D				0,91			

[1] Médias expressas como *least squares means* (LSM; dieta × saco de incubação × indicador), onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística.
[2] Sem (-Q) ou com (+Q) adição de quitosana nas dietas.
[3] Intervalo de confiança (1 – α = 0,95), com os respectivos limites inferiores e superiores.
[4] P12 = sacos de poliéster com 12 µm; P25 = sacos de poliéster com 25 µm; F57 = sacos comerciais com 25 µm (F57 filter bags, Ankom); TNT = sacos de tecido não-tecido com gramatura de 100 g/m².
[5] D = efeito de dieta (quitosana); S = efeito de saco de incubação; I = efeito de indicador; S×D = efeito de interação entre saco de incubação e dieta; I×D = efeito de interação entre indicador e dieta; I×S = efeito de interação entre indicador e saco de incubação; I×S×D = efeito de interação entre indicador, saco e dieta.
* Recuperação fecal = 100.

Vacas utilizadas no ensaio de digestibilidade eram alimentadas com quatro dietas, obtidas a partir da combinação fatorial 2×2 entre quitosana e grão de soja. Conforme já mencionado, para avaliação do efeito de dieta sobre a RF dos indicadores internos, foram incluídos no modelo os efeitos dos fatores principais e o efeito da interação entre eles, sendo observada significância somente do fator quitosana. Sendo assim, os dados foram reagrupados e reanalisados com base na presença ou não de quitosana nas dietas, de modo a facilitar a apresentação dos resultados. Foi observado que a quitosana aumentou os valores de RF (101,4% vs. 110,5% de RF média para dietas sem e com quitosana, respectivamente), independentemente do indicador avaliado e tipo de saco de incubação utilizado ($P<0,05$).

O efeito de saco de incubação sobre a RF foi dependente do tipo de indicador (interação, $P<0,05$; Figura 3.3). Para sacos F57 e de TNT, independentemente da dieta, as médias de RF aumentaram à medida que foram realizados os procedimentos sequenciais de análise de MSi, FDNi e FDAi, respectivamente. Ainda, os valores de RF para TNT foram em média superiores aos obtidos com F57, independentemente do indicador. Já para sacos de poliéster (P12 e P25), a RF média teve os menores valores para FDNi e maiores para FDAi, e apesar das diferenças de porosidade entre ambos, os resultados dentro de cada indicador foram muitos similares. Para todos os indicadores, os menores valores médios de RF foram sempre observados com sacos F57, enquanto que os maiores valores foram com sacos de poliéster nas avaliações de MSi e com sacos de TNT nas análises de FDNi e FDAi.

Figura 3.3 – Avaliação da interação entre indicador e saco de incubação sobre a recuperação fecal da MSi, FDNi e FDAi em amostras de 72 h de coletas totais de fezes de vacas em lactação.



Fonte: Elaborado pelo autor. P12 = sacos de poliéster com 12 µm; P25 = sacos de poliéster com 25 µm; F57 = sacos comerciais com 25 µm (F57 filter bags, Ankom); TNT = sacos de tecido não-tecido com gramatura de 100 g/m².

Como houve efeito de dieta, as médias demonstradas na Figura 3.3 não servem para avaliar os valores de RF de forma segura, apenas para entender as mudanças na RF dos indicadores dependendo do saco de incubação utilizado. Separados por dieta, os valores da combinação saco × indicador são mais indicados para esta avaliação. Na dieta sem quitosana, o indicador FDNi analisado em sacos de poliéster de 12 ou 25 micra, ou em sacos de TNT, bem como o indicador FDAi analisado em sacos F57, apresentaram completa RF, pois o valor paramétrico 100 estava contido no intervalo de confiança gerado na análise de variância ($1 - \alpha = 0,95$). Já na dieta com quitosana, o indicador MSi analisado em sacos de TNT, além do indicador FDNi analisado em sacos F57, apresentaram valores médios de RF = 100.

Para indicadores externos, a RF foi avaliada utilizando o mesmo modelo que incluiu os efeitos de tempo e dieta, mas de forma independente para Cr_2O_3 e TiO_2 (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 – Recuperação fecal dos indicadores externos Cr_2O_3 e TiO_2 em função da adição de quitosana e grão de soja integral nas dietas e da duração do período de coleta total de fezes em vacas em lactação (LSM; n = 96[1])

		Controle[2]		Grão de soja[2]			IC[3]		
Item	Subitem	- Q	+ Q	- Q	+ Q	Média	< 95%	> 95%	EPM
Indicador	Tempo								
Cr_2O_3	24 horas	89,9	90,6	96,9*	100,4*	94,5	90,3	98,6	1,84
	48 horas	91,8	95,3*	98,7*	101,4*	96,8*	93,0	100,6	1,59
	72 horas	93,7*	97,0*	98,0*	101,2*	97,5*	93,6	101,3	1,63
P-valor[4]	Q					0,18			
	GS					0,01			
	Q×GS					0,88			
	T					0,19			
	T×Q					0,94			
	T×GS					0,18			
	T×Q×GS					0,71			
Indicador	Tempo								
TiO_2	24 horas	86,5	84,7	83,1	84,5	84,7	75,0	94,4	4,23
	48 horas	87,6*	88,9*	83,0	83,3	85,7	76,0	95,4	4,13
	72 horas	85,0	91,0*	82,5	83,3	85,4	75,8	95,1	3,99
P-valor[4]	Q					0,77			
	GS					0,39			
	Q×GS					0,91			
	T					0,71			
	T×Q					0,35			
	T×GS					0,59			
	T×Q×GS					0,50			

[1] Médias expressas como *least squares means* (LSM), onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística para cada indicador.
[2] Dietas controle e grão de soja, sem (-Q) ou com (+Q) adição de quitosana.

[3] Intervalo de confiança (1 – α = 0,95), com os respectivos limites inferiores e superiores.
[4] Q = efeito de quitosana; GS = efeito de grão de soja; Q×GS = efeito de interação entre quitosana e grão de soja; T = efeito de tempo; T×Q = efeito de interação entre tempo e quitosana; T×GS = efeito de interação entre tempo e grão de soja; T×Q×GS = efeito de interação entre tempo, quitosana e grão de soja. Valores de *P* da análise de variância de modelos independentes para Cr_2O_3 e TiO_2.
* Recuperação fecal = 100.

A RF do TiO_2 não foi influenciada pelas dietas (P>0,05), no entanto, a adição de grão de soja nas dietas aumentou a RF do Cr_2O_3 (P<0,05). Não foi observado efeito da duração do período de coleta total sobre a RF de ambos indicadores externos (P>0,05), porém o valor médio de RF do óxido crômico em 24 h de coletas totais foi menor aos obtidos nas avaliações com duração de 48 e 72 h, sendo inferior a 100% (P<0,05). Houve incompleta RF do TiO_2, evidenciada pelos valores médios de RF obtidos ao longo de 24, 48 e 72 h de coleta totais, todos inferiores a 100% (P<0,05).

3.5.3 Acurácia, precisão e robustez dos indicadores

Indicadores internos que apresentaram completa RF geraram estimativas de excreção fecal acuradas, ou seja, o viés médio ou a diferença entre o valor estimado com o uso do indicador e o observado com a coleta total não diferiu de zero (P>0,05; Tabela 3.5). Contrariamente, os demais indicadores cuja RF diferiu de 100%, o viés médio das estimativas foi significativo, indicando que estes não foram capazes de gerar valores médios de excreção fecal próximos dos valores reais observados com a coleta total de fezes (P<0,05).

O mesmo comportamento foi observado para os indicadores externos, onde o uso do Cr_2O_3 gerou estimativas acuradas de excreção fecal (P>0,05), enquanto que os vieses médios elevados das estimativas do TiO_2 diferiram de zero como reflexo da sua incompleta RF (P<0,05; Tabela 3.6). Embora a RF do óxido crômico foi menor que 100% quando avaliada em amostras de 24 h de coletas totais, a consequente superestimativa da excreção fecal não foi significativa para gerar um viés médio diferente de zero (P>0,05). Adicionalmente, o comportamento dos vieses médios do Cr_2O_3 nas amostras de coletas pontuais de fezes foi similar ao observado na coleta total. Mesmo no protocolo de amostragem pontual única, denominada de "*spot*", o qual era esperado variação na excreção do indicador, o parâmetro de acurácia de predição não foi comprometido para Cr_2O_3 (viés médio = 0; P>0,05).

Tabela 3.5 – Acurácia e precisão das estimativas de excreção fecal dos indicadores internos MSi, FDNi e FDAi analisados *in situ* em diferentes sacos de incubação, com valores apresentados de acordo com a presença ou não de quitosana nas dietas de vacas em lactação (n = 384[1])

						Acurácia[4]		Precisão[5]			
Item	Subitem	Sub-subitem	n	EFobs[2]	EFest[3]	Viés médio	*P*-valor	RQMEP	$RQMEP_{adj}$	Índice[6]	*Rank*[7]
Dieta[8]	Indicador	Saco[9]									
-Q	MSi	P12	16	7,06	6,61	-0,44	<0,01	0,64	0,46	0,90	4º
		P25	16	7,06	6,67	-0,39	0,01	0,61	0,48	0,87	3º
		F57	16	7,06	8,53	1,47	<0,01	1,56	0,53	2,00	12º
		TNT	16	7,06	7,53	0,47	0,01	0,81	0,65	1,12	6º
	FDNi	P12	16	7,06	7,14	0,08*	0,55	0,52	0,52	0,60	2º
		P25	16	7,06	7,12	0,07*	0,64	0,53	0,53	0,59	1º
		F57	16	7,06	7,96	0,90	<0,01	1,23	0,84	1,74	10º
		TNT	16	7,06	6,78	-0,27*	0,15	0,73	0,68	0,95	5º
	FDAi	P12	16	7,06	6,46	-0,59	<0,01	0,91	0,69	1,28	8º
		P25	16	7,06	6,49	-0,56	0,01	0,90	0,70	1,26	7º
		F57	16	7,06	7,38	0,33*	0,20	1,02	0,96	1,29	9º
		TNT	16	7,06	6,15	-0,91	<0,01	1,30	0,93	1,84	11º
+Q	MSi	P12	16	7,05	6,16	-0,90	<0,01	0,97	0,38	1,27	8º
		P25	16	7,05	6,15	-0,90	<0,01	0,97	0,36	1,26	7º
		F57	16	7,05	7,74	0,69	<0,01	0,89	0,56	1,25	6º
		TNT	16	7,05	6,93	-0,13*	0,37	0,54	0,52	0,65	1º
	FDNi	P12	16	7,05	6,62	-0,43	<0,01	0,59	0,39	0,83	3º
		P25	16	7,05	6,53	-0,53	<0,01	0,64	0,37	0,89	4º
		F57	16	7,05	7,17	0,12*	0,52	0,70	0,69	0,81	2º
		TNT	16	7,05	6,23	-0,82	<0,01	1,06	0,67	1,50	9º
	FDAi	P12	16	7,05	6,00	-1,05	<0,01	1,19	0,54	1,60	11º
		P25	16	7,05	5,95	-1,10	<0,01	1,20	0,48	1,58	10º
		F57	16	7,05	6,65	-0,41	0,03	0,89	0,80	1,20	5º
		TNT	16	7,05	5,66	-1,39	<0,01	1,61	0,81	2,20	12º

[1] N representa o número de observações utilizadas na análise estatística.
[2] EFobs = excreção fecal observada (kg/dia).

[3] EFest = excreção fecal estimada (kg/dia).
[4] Viés médio = EFest – EFobs; *P*-valor = probabilidade do viés médio ser igual a zero.
[5] RQMEP = raiz quadrada média do erro de predição; $RQMEP_{adj}$ = RQMEP corrigida para falta de acurácia.
[6] Índice composto de acurácia e precisão = viés médio + $RQMEP_{adj}$.
[7] Ranqueamento do índice composto de acurácia e precisão.
[8] Sem (-Q) ou com (+Q) adição de quitosana nas dietas.
[9] P12 = sacos de poliéster com 12 µm; P25 = sacos de poliéster com 25 µm; F57 = sacos comerciais com 25 µm (F57 filter bags, Ankom); TNT = sacos de tecido não-tecido com gramatura de 100 g/m².
* Viés médio = 0.

Tabela 3.6 – Acurácia e precisão das estimativas de excreção fecal dos indicadores externos Cr_2O_3 e TiO_2 a partir de procedimentos de coletas totais e pontuais de fezes de vacas em lactação (n = 96[1])

					Acurácia[4]		Precisão[5]			
Item	Subitem	n	EFobs[2]	EFest[3]	Viés médio	*P*-valor	RQMEP	$RQMEP_{adj}$	Índice[6]	*Rank*[7]
Indicador	Tipo de amostragem[8]									
Cr_2O_3	Coleta total 24 h	32	7,05	7,20	0,14*	0,22	0,65	0,64	0,78	4º
	Coleta total 48 h	32	7,05	7,15	0,09*	0,38	0,58	0,57	0,67	3º
	Coleta total 72 h	32	7,05	7,20	0,15*	0,10	0,52	0,50	0,65	1º
	Composta	32	7,05	6,94	-0,11*	0,29	0,56	0,55	0,66	2º
	Spot	32	7,05	7,33	0,28*	0,14	0,97	0,93	1,21	5º
TiO_2	Coleta total 24 h	32	7,05	8,31	1,26	<0,01	1,90	1,43	2,68	7º
	Coleta total 48 h	32	7,05	8,32	1,27	<0,01	1,88	1,39	2,66	6º
	Coleta total 72 h	32	7,05	8,44	1,39	<0,01	1,92	1,34	2,72	8º
	Composta	32	7,05	8,25	1,19	<0,01	2,14	1,78	2,97	9º
	Spot	32	7,05	8,56	1,50	<0,01	3,10	2,71	4,22	10º

[1] N representa o número de observações utilizadas na análise estatística para cada indicador.
[2] EFobs = excreção fecal observada (kg/dia).
[3] EFest = excreção fecal estimada (kg/dia).
[4] Viés médio = EFest – EFobs; *P*-valor = probabilidade do viés médio ser igual a zero.
[5] RQMEP = raiz quadrada média do erro de predição; $RQMEP_{adj}$ = RQMEP corrigida para falta de acurácia.
[6] Índice composto de acurácia e precisão = viés médio + $RQMEP_{adj}$.
[7] Ranqueamento do índice composto de acurácia e precisão.
[8] Amostras de fezes oriundas de 24, 48 e 72 h de coletas totais e amostras pontuais de 9 em 9 h por 72 h (Composta) e pontuais de um único horário ao longo do dia (*Spot*).
* Viés médio = 0.

Quando avaliada a precisão das estimativas, de modo geral, os resultados mais precisos para indicadores internos foram observados para MSi e FDNi analisadas em sacos de poliéster, independentemente da dieta conter ou não quitosana, cujos valores de $RQMEP_{adj}$ variaram entre 0,36 a 0,53 kg de MS (Tabela 3.5). Em contrapartida, as estimativas menos precisas foram observadas para FDAi quando analisada em sacos F57 ou TNT, com valores de $RQMEP_{adj}$ entre 0,80 e 0,96 kg de MS. Novamente, o comportamento foi independente da dieta, o que aparentemente indica que a precisão parece ser uma característica intrínseca da combinação entre indicador e material têxtil do saco usado no procedimento de determinação.

Para indicadores externos, o Cr_2O_3 apresentou boa precisão para as estimativas oriundas de 48 e 72 h de coletas totais, bem como de coletas pontuais compostas (de 9 em 9 h por 72 h), com valores de $RQMEP_{adj}$ entre 0,50 e 0,57 kg de MS (Tabela 3.6). Estimativas de excreção fecal de Cr_2O_3 a partir de 24 h de coleta total apresentaram valores mais elevados de $RQMEP_{adj}$ (0,64 kg de MS), corroborando com os resultados de RF, no entanto ainda satisfatórios. Já as amostras de coletas pontuais *spot* geraram estimativas com elevado erro de precisão ($RQMEP_{adj}$ = 0,93 kg de MS). Para o TiO_2 os resultados estimados de excreção fecal apresentaram valores bastante elevados de $RQMEP_{adj}$, de 1,34 kg de MS para 72 h de coleta total até o expressivo erro de 2,71 kg de MS para coleta pontual *spot*, indicando que o mesmo apresenta muito baixa precisão.

Para o índice composto de acurácia e precisão, o qual representa o somatório de erros para viés médio e $RQMEP_{adj}$, foi observado que dentre todas as combinações avaliadas entre tipo de indicador interno e tipo de saco de incubação, melhores valores (erro inferior a 0,60 kg de MS) foram obtidos com o uso do FDNi analisado em sacos de poliéster de 12 ou 25 micra para as dietas convencionais (sem quitosana). Para os indicadores externos, o Cr_2O_3 apresentou os melhores valores para o índice composto de acurácia e precisão ao ser analisado em amostras de 48 e 72 h de coletas totais ou em amostra pontual composta (erro inferior a 0,67 kg de MS).

Quando o indicador foi acurado e sua precisão não foi comprometida, o *slope* e o intercepto da reta ajustada da relação entre valores observados e estimados não foram diferentes da unidade e de zero, respectivamente ($P>0,05$; Tabelas 3.7 e 3.8). No entanto, quando o resultado foi acurado, mas a precisão da estimativa foi baixa, os parâmetros da regressão linear entre excreção fecal observada e estimada não atenderam a hipótese estatística (slope $\neq 1$ e intercepto $\neq 0$; $P<0,05$), conforme observado para FDAi analisada em sacos F57 (sem quitosana) e para Cr_2O_3 de amostra pontual *spot*, onde ambos apresentaram viés médio igual a zero, porém elevado $RQMEP_{adj}$.

Tabela 3.7 – Relação entre excreção fecal (EF) observada vs. estimada e viés linear das estimativas dos indicadores internos MSi, FDNi e FDAi analisados *in situ* a partir de diferentes sacos de incubação, com valores apresentados de acordo com a presença ou não de quitosana nas dietas de vacas em lactação (n = 384[1])

			EF observada vs. EF estimada[2]						Viés médio vs. EF observada[3]			
Item	Subitem	Sub-subitem	Intercepto	EPM	*Slope*	EPM	R²	*P*-valor	Viés linear	EPM	R²	*P*-valor
Dieta[4]	Indicador	Saco[5]										
-Q	MSi	P12	0,47	0,60	1,00	0,09	0,90	0,01	-0,10	0,08	0,09	0,26
		P25	0,66	0,61	0,96	0,09	0,89	0,03	-0,07	0,09	0,04	0,44
		F57	-0,12	0,65	0,84	0,08	0,90	<0,01	0,07	0,10	0,04	0,48
		TNT	1,24	0,60	0,77	0,08	0,88	<0,01	0,14	0,11	0,10	0,24
	FDNi	P12	0,72	0,61	0,89	0,08	0,89	0,36	0,00	0,09	0,00	0,99
		P25	0,99	0,56	0,85	0,08	0,90	0,17	0,05	0,10	0,02	0,58
		F57	1,13	0,92	0,74	0,11	0,76	0,01	0,02	0,15	0,00	0,91
		TNT	1,09	0,83	0,88	0,12	0,80	0,22	-0,09	0,12	0,04	0,45
	FDAi	P12	1,45	0,78	0,87	0,12	0,80	0,01	-0,08	0,12	0,03	0,52
		P25	1,85	0,67	0,80	0,10	0,82	0,01	0,03	0,13	0,00	0,82
		F57	1,86	0,97	0,70	0,13	0,68	0,04	-0,03	0,18	0,00	0,87
		TNT	2,02	1,07	0,82	0,17	0,63	0,01	-0,24	0,16	0,14	0,16
+Q	MSi	P12	0,77	0,50	1,02	0,08	0,92	<0,01	-0,10	0,07	0,12	0,18
		P25	0,66	0,48	1,04	0,08	0,93	<0,01	-0,10	0,07	0,15	0,14
		F57	1,06	0,53	0,77	0,07	0,90	<0,01	0,17	0,10	0,16	0,12
		TNT	1,37	0,55	0,82	0,08	0,89	0,07	0,08	0,10	0,05	0,42
	FDNi	P12	0,88	0,50	0,93	0,07	0,92	<0,01	-0,02	0,08	0,00	0,84
		P25	0,47	0,51	1,01	0,08	0,93	<0,01	-0,08	0,07	0,09	0,25
		F57	1,64	0,70	0,76	0,10	0,82	0,06	0,08	0,14	0,02	0,58
		TNT	2,15	0,66	0,79	0,10	0,81	<0,01	0,02	0,13	0,00	0,87
	FDAi	P12	1,33	0,69	0,95	0,11	0,84	<0,01	-0,12	0,10	0,09	0,25
		P25	0,61	0,67	1,08	0,11	0,87	<0,01	-0,19	0,08	0,28	0,03
		F57	2,14	0,81	0,74	0,12	0,74	0,02	0,00	0,16	0,00	0,98
		TNT	2,73	0,78	0,76	0,13	0,70	<0,01	-0,09	0,16	0,02	0,60

[1] N representa o número de observações utilizadas na análise estatística.

[2] Parâmetros de regressão da equação de predição ajustada, cujo *P*-valor testa a hipótese de *slope* = 1 e intercepto = 0.
[3] Parâmetros de regressão, cujo *P*-valor testa a hipótese do viés linear ≠ 0.
[4] Sem (-Q) ou com (+Q) adição de quitosana nas dietas.
[5] P12 = sacos de poliéster com 12 µm; P25 = sacos de poliéster com 25 µm; F57 = sacos comerciais com 25 µm (F57 filter bags, Ankom); TNT = sacos de tecido não-tecido com gramatura de 100 g/m².

Tabela 3.8 – Relação entre excreção fecal (EF) observada vs. estimada e viés linear das estimativas dos indicadores externos Cr_2O_3 e TiO_2 a partir de procedimentos de coletas totais e pontuais de fezes de vacas em lactação (n = 96[1])

		EF observada vs. EF estimada[2]						Viés médio vs. EF observada[3]			
Item	Subitem	Intercepto	EPM	*Slope*	EPM	R²	*P*-valor	Viés linear	EPM	R²	*P*-valor
Indicador	Tipo de amostragem[4]										
Cr_2O_3	Coleta total 24 h	-0,19	0,69	1,01	0,09	0,79	0,47	-0,21	0,07	0,22	0,01
	Coleta total 48 h	-0,08	0,60	1,00	0,08	0,83	0,68	-0,17	0,07	0,16	0,02
	Coleta total 72 h	-0,12	0,50	1,00	0,07	0,87	0,27	-0,12	0,06	0,12	0,05
	Composta	0,55	0,51	0,94	0,07	0,85	0,39	-0,09	0,07	0,06	0,19
	Spot	2,11	0,62	0,67	0,08	0,71	<0,01	0,06	0,13	0,01	0,64
TiO_2	Coleta total 24 h	2,97	0,73	0,49	0,08	0,53	<0,01	0,08	0,19	0,01	0,68
	Coleta total 48 h	2,87	0,72	0,50	0,08	0,54	<0,01	0,08	0,18	0,01	0,65
	Coleta total 72 h	2,65	0,74	0,52	0,08	0,56	<0,01	0,07	0,17	0,01	0,69
	Composta	3,85	0,72	0,39	0,08	0,42	<0,01	0,07	0,23	0,00	0,76
	Spot	4,71	0,50	0,27	0,05	0,46	<0,01	0,67	0,33	0,12	0,05

[1] N representa o número de observações utilizadas na análise estatística para cada indicador.
[2] Parâmetros de regressão da equação de predição ajustada, cujo *P*-valor testa a hipótese de *slope* = 1 e intercepto = 0.
[3] Parâmetros de regressão, cujo *P*-valor testa a hipótese do viés linear ≠ 0.
[4] Amostras de fezes oriundas de 24, 48 e 72 h de coletas totais e amostras pontuais de 9 em 9 h por 72 h (Composta) e pontuais de um único horário ao longo do dia (*Spot*).

Todos os indicadores internos e externos cujo viés médio foi significativo, independente de possuírem um baixo $RQMEP_{adj}$, a reta ajustada da equação de predição também não atendeu as hipóteses estatísticas para a relação observado vs. estimado (P<0,05).

Com exceção do indicador FDAi analisado em sacos P25 para as dietas contendo quitosana, os demais indicadores internos não apresentaram relações lineares entre os resíduos (viés médio) e os valores observados de excreção fecal, ou seja, o viés linear ou erro sistemático de predição é igual a zero (P>0,05; Tabela 3.7). Para indicadores externos, no entanto, o viés linear foi significativo quando utilizado Cr_2O_3 em amostras de coleta total e TiO_2 em amostras pontuais *spot* (P<0,05; Tabela 3.8). Para esses indicadores, à medida que aumentou a excreção fecal observada aumentaram os erros, com subestimativa da excreção fecal para o Cr_2O_3 e para a FDAi P12 (+Q), pois a inclinação do erro (vieses lineares ou *slope*) foi negativa e diferente de zero, e superestimativa da excreção fecal para TiO_2 (viés linear positivo e diferente de zero; P<0,05).

Os *slope* da regressão linear entre o viés e os consumos de FDN e EE, bem como a relação entre viés e peso vivo das vacas, não foram diferentes de zero (P>0,05) para os indicadores internos avaliados, com exceção da MSi F57 (+Q), comprovando que o erro de predição foi independente da variação no nível de consumo de fibra e lipídios, bem como do peso das vacas (Tabela 3.9). Para MSi em sacos F57 nas dietas contendo quitosana, o erro aumentou à medida que o nível de consumo de FDN das vacas foi maior, com *slope* positivo (P<0,05), ou seja, maior excreção fecal estimada, estando de acordo com a RF < 100%.

A análise da robustez dos indicadores externos revelou que suas estimativas foram mais susceptíveis a erros associados às variações das condições experimentais (Tabela 3.10). O *slope* da relação entre viés e consumo de FDN paras as estimativas de TiO_2 em amostras pontuais *spot*, bem como da relação entre viés e peso vivo nas estimativas de TiO_2 de 24 h de coletas totais, foi significativo (P<0,05), ou seja, o erro foi influenciado pelas variáveis independentes relacionadas. Para as estimativas de excreção fecal do Cr_2O_3 em amostras de 24 e 48 h de coletas totais foi observado *slope* diferente de zero (P<0,05) entre a relação do viés com o consumo de EE, indicando que esta variável influencia as estimativas. Esse resultado está de acordo com o viés linear, que indicou variação no erro de predição do Cr_2O_3 à medida que a excreção fecal observada aumentou, mas, principalmente, reforça os resultados de RF, onde foi observado efeito significativo do grão de soja (P<0,05).

Por fim, na Tabela 3.11 e Figura 3.4 são sumarizados alguns resultados do impacto das estimativas de excreção fecal sobre os valores de digestibilidade aparente total dos nutrientes de indicadores internos e externos classificados com base na sua acurácia e precisão.

Tabela 3.9 – Robustez das estimativas de excreção fecal dos indicadores internos MSi, FDNi e FDAi analisados *in situ* a partir de diferentes sacos de incubação, com valores apresentados de acordo com a presença ou não de quitosana nas dietas de vacas em lactação (n = 384[1])

			Viés médio vs. Consumo de FDN[2]				Viés médio vs. Consumo de EE[2]				Viés médio vs. Peso vivo[2]			
Item	Subitem	Sub-subitem	*Slope*	EPM	R²	*P*-valor	*Slope*	EPM	R²	*P*-valor	*Slope*	EPM	R²	*P*-valor
Dieta[3]	Indicador	Tecido[4]												
-Q	MSi	P12	0,02	0,12	0,00	0,89	-0,63	0,33	0,21	0,08	0,00	0,00	0,00	1,00
		P25	0,02	0,12	0,00	0,89	-0,69	0,34	0,23	0,06	0,00	0,00	0,00	0,92
		F57	0,12	0,13	0,05	0,39	0,45	0,41	0,08	0,29	0,00	0,00	0,00	0,83
		TNT	0,21	0,16	0,11	0,21	0,28	0,51	0,02	0,60	0,00	0,00	0,03	0,53
	FDNi	P12	0,12	0,13	0,06	0,37	-0,29	0,41	0,04	0,49	0,00	0,00	0,01	0,70
		P25	0,13	0,13	0,06	0,35	-0,24	0,42	0,02	0,58	0,00	0,00	0,00	0,88
		F57	0,19	0,21	0,05	0,39	-0,15	0,67	0,00	0,83	0,00	0,00	0,01	0,67
		TNT	0,04	0,18	0,00	0,84	-0,48	0,53	0,06	0,38	0,00	0,00	0,00	0,90
	FDAi	P12	0,01	0,18	0,00	0,97	-0,30	0,54	0,02	0,59	0,00	0,00	0,02	0,65
		P25	0,08	0,18	0,01	0,67	-0,13	0,56	0,00	0,81	0,00	0,00	0,01	0,77
		F57	0,14	0,24	0,02	0,58	-0,07	0,77	0,00	0,93	0,00	0,00	0,00	0,91
		TNT	-0,11	0,24	0,02	0,64	-0,85	0,71	0,09	0,25	0,00	0,00	0,03	0,49
+Q	MSi	P12	-0,04	0,09	0,01	0,66	-0,46	0,31	0,14	0,16	0,00	0,00	0,01	0,70
		P25	-0,05	0,08	0,03	0,53	-0,26	0,31	0,05	0,41	0,00	0,00	0,02	0,56
		F57	0,27	0,11	0,31	0,02	0,55	0,46	0,09	0,26	0,00	0,00	0,08	0,28
		TNT	0,20	0,11	0,20	0,08	0,06	0,46	0,00	0,90	0,00	0,00	0,07	0,32
	FDNi	P12	0,04	0,09	0,02	0,63	-0,22	0,34	0,03	0,53	0,00	0,00	0,01	0,72
		P25	-0,05	0,08	0,02	0,58	-0,20	0,32	0,03	0,54	0,00	0,00	0,01	0,74
		F57	0,26	0,14	0,19	0,09	-0,29	0,60	0,02	0,63	0,00	0,00	0,02	0,65
		TNT	0,21	0,14	0,14	0,16	-0,37	0,58	0,03	0,53	0,00	0,00	0,02	0,58
	FDAi	P12	-0,04	0,12	0,01	0,74	-0,47	0,46	0,07	0,32	0,00	0,00	0,00	0,81
		P25	-0,13	0,10	0,09	0,25	-0,57	0,39	0,13	0,17	0,00	0,00	0,04	0,46
		F57	0,20	0,17	0,08	0,28	-0,56	0,68	0,05	0,43	0,00	0,00	0,00	1,00
		TNT	0,14	0,18	0,04	0,45	-0,76	0,68	0,08	0,28	0,00	0,00	0,00	0,84

[1] N representa o número de observações utilizadas na análise estatística.
[2] Parâmetros de regressão da relação entre vieses médios e variáveis independentes selecionadas, cujo *P*-valor testa a hipótese do *slope* = 0.

[3] Sem (-Q) ou com (+Q) adição de quitosana nas dietas.
[4] P12 = sacos de poliéster com 12 µm; P25 = sacos de poliéster com 25 µm; F57 = sacos comerciais com 25 µm (F57 filter bags, Ankom); TNT = sacos de tecido não-tecido com gramatura de 100 g/m².

Tabela 3.10 – Robustez das estimativas dos indicadores externos Cr_2O_3 e TiO_2 a partir de procedimentos de coletas totais e pontuais de fezes de vacas em lactação (n = 96[1])

		Viés médio vs. Consumo de FDN[2]				Viés médio vs. Consumo de EE[2]				Viés médio vs. Peso vivo[2]			
Item	Subitem	*Slope*	EPM	R²	*P*-valor	*Slope*	EPM	R²	*P*-valor	*Slope*	EPM	R²	*P*-valor
Indicador	Tipo de amostragem[3]												
Cr_2O_3	Coleta total 24 h	-0,15	0,10	0,07	0,15	-1,17	0,29	0,35	0,00	0,00	0,00	0,02	0,41
	Coleta total 48 h	-0,14	0,09	0,08	0,12	-0,81	0,29	0,20	0,01	0,00	0,00	0,01	0,54
	Coleta total 72 h	-0,13	0,08	0,09	0,10	-0,49	0,27	0,10	0,08	0,00	0,00	0,02	0,42
	Composta	-0,02	0,09	0,00	0,83	-0,28	0,31	0,03	0,37	0,00	0,00	0,02	0,47
	Spot	0,07	0,16	0,01	0,68	0,33	0,57	0,01	0,57	0,00	0,00	0,01	0,57
TiO_2	Coleta total 24 h	0,07	0,23	0,00	0,77	0,93	0,79	0,04	0,25	-0,01	0,00	0,14	0,03
	Coleta total 48 h	0,04	0,23	0,00	0,87	1,21	0,76	0,08	0,12	-0,01	0,00	0,09	0,09
	Coleta total 72 h	0,00	0,22	0,00	0,99	1,27	0,72	0,09	0,09	-0,01	0,00	0,11	0,11
	Composta	0,26	0,29	0,03	0,38	0,96	1,00	0,03	0,34	0,00	0,01	0,00	0,86
	Spot	0,91	0,41	0,14	0,04	1,82	1,51	0,05	0,24	0,01	0,01	0,09	0,10

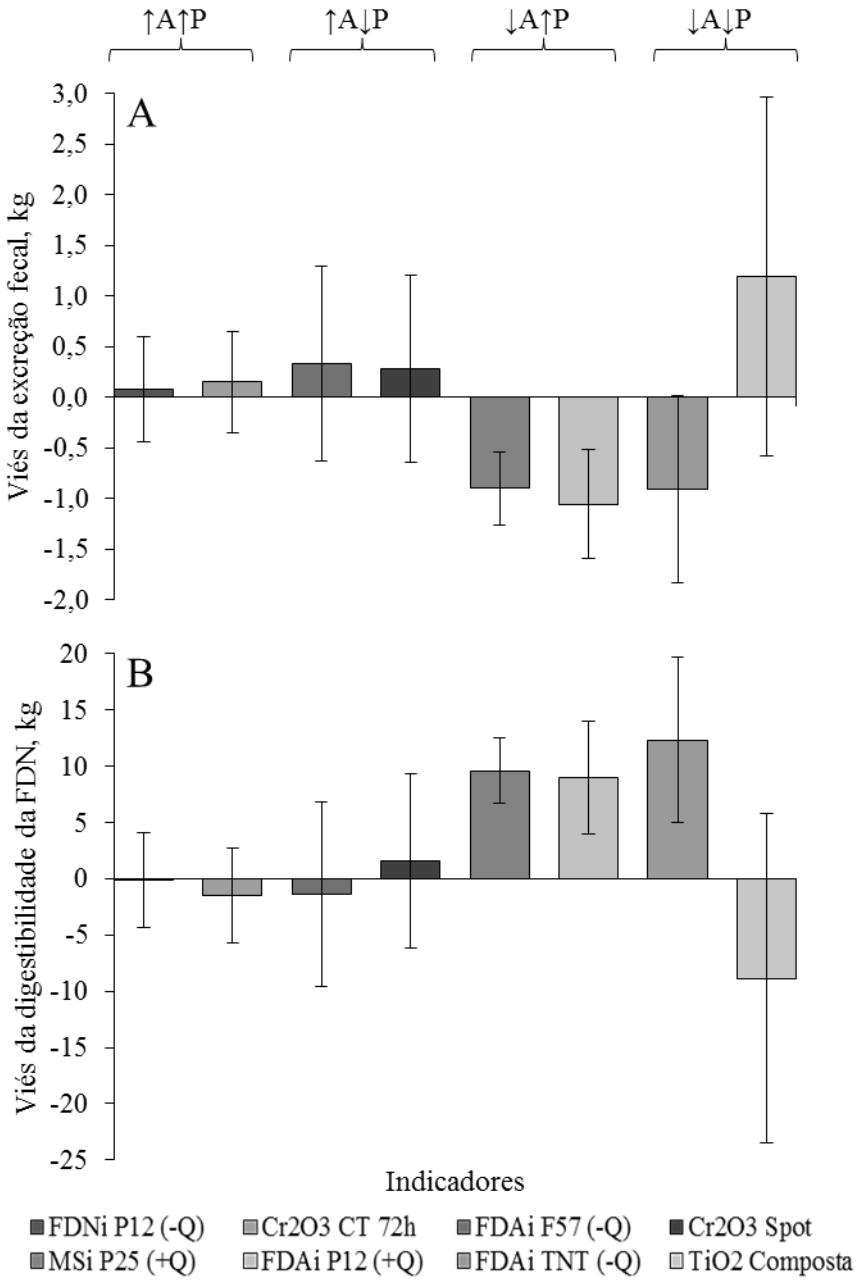
[1] N representa o número de observações utilizadas na análise estatística para cada indicador.
[2] Parâmetros de regressão da relação entre vieses médios e variáveis independentes selecionadas, cujo *P*-valor testa a hipótese do *slope* = 0.
[3] Amostras de fezes oriundas de 24, 48 e 72 h de coletas totais e amostras pontuais de 9 em 9 h por 72 h (Composta) e pontuais de um único horário ao longo do dia (*Spot*)

Tabela 3.11 – Impacto das avaliações de acurácia e precisão sobre as estimativas de digestibilidade aparente total dos nutrientes utilizando diferentes indicadores internos (MSi, FDNi e FDAi) e externos (Cr_2O_3 e TiO_2) de excreção fecal, classificados como acurados e/ou precisos (↑) e não acurados e/ou não precisos (↓), em estudo com vacas em lactação (indicadores internos, n = 128; indicadores externos, n = 96[1])

	↑Acurácia ↑Precisão					↑Acurácia ↓Precisão					↓Acurácia ↑Precisão					↓Acurácia ↓Precisão				
Item[2]	n	Obs[3]	Est[4]	Viés[5]	Erro[6]	n	Obs[3]	Est[4]	Viés[5]	Erro[6]	n	Obs[3]	Est[4]	Viés[5]	Erro[6]	n	Obs[3]	Est[4]	Viés[5]	Erro[6]
	FDNi P12 (-Q)[7]					FDAi F57 (-Q)[7]					MSi P25 (+Q)[7]					FDAi TNT (-Q)[7]				
EF	16	7,06	7,14	0,08	0,52	16	7,06	7,38	0,33	0,96	16	7,05	6,15	-0,90	0,36	16	7,05	5,66	-0,91	0,93
DMS	16	68,3	68,0	-0,33	2,40	16	68,3	66,7	-1,59	4,66	16	66,8	71,0	4,21	1,73	16	66,8	72,4	4,10	4,10
DMO	16	70,5	70,4	-0,10	2,20	16	70,5	69,7	-0,84	4,32	16	69,0	74,1	5,04	1,59	16	69,0	77,1	6,60	3,77
DPB	16	70,5	70,3	-0,17	2,09	16	70,5	69,4	-1,06	4,22	16	71,1	76,0	4,90	1,78	16	71,1	76,8	6,32	3,47
DEE	16	83,0	82,8	-0,19	1,27	16	83,0	82,2	-0,80	2,45	16	79,2	82,7	3,48	1,20	16	79,2	87,0	3,95	2,38
DFDN	16	44,7	44,6	-0,11	4,24	16	44,7	43,4	-1,35	8,18	16	41,7	51,3	9,62	2,91	16	41,7	57,1	12,4	7,30
	Cr_2O_3 CT 72h[8]					Cr_2O_3 *Spot*[8]					FDAi P12 (+Q)[7]					TiO_2 Composta[8]				
EF	32	7,05	7,20	0,15	0,50	32	7,05	7,33	0,28	0,93	16	7,05	6,00	-1,05	0,54	32	7,05	8,25	1,19	1,78
DMS	32	67,5	66,7	-0,80	2,40	32	67,5	66,3	-1,19	4,16	16	66,8	71,7	4,94	2,78	32	67,5	62,3	-5,22	8,59
DMO	32	69,8	69,0	-0,75	2,24	32	69,8	68,2	-1,57	4,05	16	69,0	73,7	4,69	2,57	32	69,8	64,3	-5,51	8,26
DPB	32	70,8	70,1	-0,62	2,25	32	70,8	68,0	-2,81	4,47	16	71,1	75,6	4,56	2,66	32	70,8	66,0	-4,74	7,33
DEE	32	81,1	80,8	-0,31	1,42	32	81,1	77,4	-3,75	6,53	16	79,2	82,5	3,23	1,70	32	81,1	74,7	-6,48	7,18
DFDN	32	43,2	41,7	-1,47	4,22	32	43,2	44,8	1,57	7,75	16	41,7	50,6	8,98	4,98	32	43,2	34,4	-8,84	14,7

[1] N representa o número de observações utilizadas na análise estatística para cada indicador.
[2] EF = excreção fecal; DMS, DMO, DPB, DEE e DFDN = digestibilidades da MS, MO, PB, EE e FDN, respectivamente.
[3] Valores observados.
[4] Valores estimados.
[5] Viés médio ou falta de acurácia.
[6] $RQMEP_{adj}$ ou erro de precisão.
[7] Indicadores internos (nome do indicador + tipo de saco de incubação + tipo de dieta).
[8] Indicadores externos (nome do indicador + tipo de amostragem de fezes).

Figura 3.4 – Avaliação dos vieses das estimativas de excreção fecal (A) e digestibilidade aparente total da FDN (B) de diferentes indicadores classificados com base na acurácia e precisão em estudo com vacas em lactação.



Fonte: Elaborado pelo autor. Colunas representam a acurácia. Barras de erros representam a precisão. Acurado e preciso (↑A↑P); acurado e não preciso (↑A↓P); não acurado e preciso (↓A↑P); e não acurado e não preciso (↓A↓P).

3.6 DISCUSSÃO

A principal preocupação de reduzir intervalos de duração para avaliações nutricionais em experimentação animal reside no nível de comprometimento dos resultados, principalmente sobre o grau de precisão das mensurações. Em ensaios de digestão, por exemplo, um período de coleta deve ser suficientemente longo para neutralizar em grande parte as flutuações do dia-a-dia sobre a excreção fecal e reduzir o erro ao final do período (HATTAN e OWEN, 1969). Embora não foi observado efeito significativo de tempo para excreção fecal e digestibilidade dos nutrientes avaliadas ao longo de 24, 48 e 72 horas de coletas totais de fezes, a interação entre quitosana e tempo sobre algumas das variáveis nutricionais demonstra que pode haver comprometimento na interpretação de resultados com ensaios de digestão super reduzidos (menos de três dias de avaliação). Essa constatação pode ter maior relevância para experimentos cujo objetivo é a comparação mais precisa da digestibilidade de tratamentos dietéticos, pois em termos de valores médios absolutos, de modo geral, houve similaridade entre os dias de avaliação, principalmente quando comparados resultados obtidos em 48 h com 72 h de coletas totais. A exceção foi para a variável digestibilidade da FDN, onde o efeito geral de tempo apresentou tendência de significância, no entanto, a comparação específica de médias revelou diferença significativa entre as estimativas de 24 h e 72 h de coletas totais (44,9% vs. 43,2%, respectivamente), havendo superestimativa da digestibilidade deste nutriente no menor período de avaliação.

Ao avaliar o efeito da duração do período de coletas de fezes sobre os coeficientes de digestibilidade dos nutrientes em bovinos da raça Nelore, Barbosa (2005) não encontrou diferenças significativas para nenhuma das variáveis nos tempos de um até seis dias de coletas totais, concluindo que valores de digestibilidade obtidos num período de 24 h são exatas, embora a precisão experimental melhorou com o aumento do número de dias de coleta total de fezes.

Apesar dos valores médios absolutos de digestibilidade aparente total não terem variado de forma significativa no presente estudo, complementarmente a avaliação da precisão desses resultados é de fundamental importância para se atestar sobre a eficiência da técnica de coleta total em ensaios de curta duração usando vacas em lactação. A precisão é uma medida da amplitude de dispersão dos dados e reflete a variabilidade dos resultados em relação ao valor médio, cujo erro padrão da média (EPM) é comumente utilizado nos estudos para esta avaliação. Maiores EPM foram observados para digestibilidades da FDN, PB e EE, e, de modo geral, os erros foram mais elevados em 24 h de coleta total para todas as variáveis,

sendo reduzidos à medida que aumentou a duração do período de avaliação. Embora o erro padrão, por si só, é um indicativo de precisão, esta é uma medida de dispersão cujos valores acompanham a escala da média, normalmente sendo maior quando a média também aumenta. Por isso quando expresso como proporção da respectiva média torna-se uma ferramenta mais segura, podendo ser utilizada como índice de precisão relativa.

A relação erro padrão da média/média revelou que a excreção fecal e as digestibilidades da FDN e PB, nesta ordem, obtiveram os maiores valores, portanto foram as variáveis menos precisas. Adicionalmente, houve uma modesta redução da relação com o aumento da duração do período de coleta total, melhorando a precisão. O aumento da duração do período de coleta é comumente relacionado com o aumento da precisão das avaliações em ensaios de digestibilidade (HATTAN e OWEN, 1969; BARBOSA et al., 2005; FARENZENA et al., 2016). No entanto, mesmo para a excreção fecal em 24 h de coletas totais, que foi a combinação entre variável resposta e tempo de coleta de menor precisão, o valor do índice ficou abaixo de 0,07, o que é considerado baixo (FARENZENA et al., 2016).

Farenzena et al. (2016) avaliaram o comprimento mínimo do período de coleta em estudo de digestibilidade com ovinos alimentados *ad libitum* para obtenção de valores com máxima precisão e observaram que as variáveis de excreção fecal, de modo geral, atingiram ponto de quebra (*break point* pela análise de *broken-line*) ou um patamar de estado estacionário do erro padrão da média em 3,5 dias. No entanto, os autores ressaltaram que a variável digestibilidade, avaliada através da fração MO, não apresentou ponto de quebra significativo, ou seja, teve alta precisão independentemente se o período de coleta foi de um ou até nove dias, período máximo avaliado. Esse resultado foi explicado em função de que a relação erro padrão da média/média obtida para variáveis de consumo e excreção fecal foram muito baixas, inferiores a 0,05, estando de acordo com os resultados obtidos no presente estudo.

Animais alimentados *ad libitum* apresentam maior variação de consumo diário e excreção. Portanto, em situações onde é observada maior regularidade no consumo é esperado menor variação diária na produção fecal. Adicionalmente, animais cujo nível de consumo é elevado, como vacas em lactação, oscilações sobre o mesmo são proporcionalmente menos impactantes sobre a excreção se comparado a animais de menor porte, como ovinos e caprinos. As vacas utilizadas no ensaio de digestibilidade apresentaram baixa variação de consumo ao longo do período de avaliação (dados não apresentados), fato que colabora com a alta precisão observada sobre as variáveis de excreção fecal e digestibilidade, mesmo com apenas 24 h de coletas totais.

Hattan e Owen (1969) observaram que a utilização de um período de avaliação da digestibilidade de curta duração para vacas leiteiras, com três dias de coletas totais de fezes, gerou resultados quase tão acurados e precisos quanto do período convencional com sete dias de avaliação, os quais não diferiram estatisticamente. Entretanto, esses autores afirmaram que períodos de um dia de coleta total não seriam satisfatórios para muitos tipos de pesquisas, pois apesar de resultados acurados e das economias de despesas, trabalho e tempo, foi observado maior variabilidade do erro, comprometendo a precisão das avaliações e a sensibilidade para detecção de diferenças nos coeficientes de digestão.

Com base no exposto e na análise dos resultados obtidos, torna-se seguro afirmar que as avaliações de excreção e digestibilidade dos nutrientes com duração de 72 h de coletas totais de fezes, para as condições experimentais desse estudo, implicaram em resultados precisos, podendo inclusive ser utilizados como referência para outras avaliações, como de acurácia e recuperação de indicadores de excreção fecal.

Os resultados de recuperação fecal dos indicadores internos e externos avaliados revelaram importantes limitações para serem atentadas sobre a utilização dos mesmos. A verificação das características ideais de indicadores deve centrar-se sobre as questões relacionadas à recuperação desses após passagem pelo trato gastrointestinal (OWENS e HANSON, 1992; DETMANN et al., 2007). A incapacidade de um indicador em ser recuperado totalmente nas fezes compromete sua utilização segura em estudos de digestão, pois suas estimativas são geradas da relação entre a quantidade presente na dieta e a respectiva concentração fecal. Foram observadas diferenças significativas sobre a RF dos indicadores internos dependendo das características da dieta e das condições metodológicas, como o tipo de saco de incubação *in situ*. Ainda, houve diferenças de RF entre os indicadores, além da interação entre saco de incubação e indicador.

A presença de quitosana nas dietas comprometeu a RF, que como média dos indicadores ficou acima de 110%. A quitosana recentemente foi proposta como aditivo antimicrobiano alternativo aos ionóforos para modulação da fermentação ruminal (GOIRI et al., 2009) e com isso vem sendo investigada. Embora ainda muito pouco se saiba sobre o exato mecanismo de ação desse composto no ambiente ruminal, os resultados até então obtidos atestam sobre seu potencial antimicrobiano, conforme relatam os trabalhos citados na Seção 2, além dos próprios resultados apresentados na mesma, em especial sobre as alterações na população microbiana. Sendo assim, umas das hipóteses para explicação da influência da quitosana sobre a RF dos indicadores internos é que de possa ter havido algum resíduo da mesma nas fezes das vacas que, ao serem incubadas para avaliação dos teores de componentes

indigestíveis, tenha exercido um efeito antimicrobiano que limitou a total degradação da amostra. Ou ainda, devido a capacidade da quitosana de complexação e formação de quelatos, é possível que esta reagiu com alguma fração potencialmente degradável do alimento que deixou o trato gastrointestinal (visto que o aditivo não comprometeu a digestibilidade dos nutrientes no ensaio *in vivo*), mas que ao incubar as amostras, parte dessa fração contida nas fezes tornou-se indigestível à ação microbiana ruminal.

O porquê de a quitosana ter comprometido a degradação das amostras de fezes em maior grau que as da dieta, resultando em maior excreção aparente dos indicadores internos em relação ao total consumido, não é claro. Há possibilidade do microambiente criado nos sacos *in situ* ter diferido entre ingredientes das dietas com relação ao das amostras de sobras e fezes. Essa suposição é baseada nos achados de Lee e Hristov (2013), que ao encontrar interação entre indicador interno (FDNi) e dieta em experimento com avaliação de digestibilidade em vacas leiteiras, resolveram investigar se o microambiente do saco de incubação poderia alterar a degradabilidade da fibra e, consequentemente, o teor de FDNi. Para tal, os autores incubaram *in situ* amostras de feno de alfafa e milho moído separadamente, além de misturas de ambos os alimentos variando-as em proporção, sendo a concentração real de FDNi das misturas obtida por cálculos de reconstituição com base nos teores de FDNi dos alimentos individuais. Foi observado que à medida que aumentou a substituição de milho por feno de alfafa nas misturas, houve superestimativa dos teores de FDNi, confirmando a hipótese de que o microambiente do saco de incubação alterou a degradabilidade da fibra e as estimativas de FDNi. No presente estudo, de modo similar, as amostras de alimentos, incluindo a quitosana, foram incubadas separadamente e as dietas foram posteriormente reconstituídas para os teores de MSi, FDNi e FDAi. Sendo assim, há hipótese de que nas amostras de sobras contendo quitosana, além de amostras de fezes das vacas que receberam o aditivo e que pode ter havido resíduo do mesmo, houve comprometimento da degradação pelos microorganismos ruminais, elevando os teores de componentes indigestíveis, o que justificaria os maiores valores de RF obtidos.

Curiosamente, para os diferentes sacos que foram testados e incubados com amostras de quitosana, ao serem removidos do rúmen no término da incubação, todos apresentaram aspecto peculiar, com uma aparência de que haviam sido “queimados” (Apêndice A), diferindo de todas as demais amostras. Os mesmos foram submetidos aos procedimentos analíticos sequenciais para avaliação dos teores de MSi, FDNi e FDAi, no entanto, os baixos resíduos obtidos não influenciaram os teores dos componentes indigestíveis das dietas, devido a baixa inclusão do aditivo nas mesmas.

Como o indicador não deve possuir a capacidade de afetar ou ser afetado pelo trato digestório ou sua população microbiana (OWENS e HANSON, 1992), o que parece ter acorrido nas amostras contendo quitosana, esse resultado implica em invalidação do uso de indicadores internos em estudos cujas dietas contêm esse aditivo ou potencialmente até outros antimicrobianos. Nestas situações, parte das diferenças entre os coeficientes de digestibilidade estimados para os tratamentos poder ser decorrente de influências dietéticas sobre a RF do indicador, confundindo de forma não contornável as estimativas obtidas. Por isso os resultados dos indicadores internos foram apresentados separados por dietas, sendo aqueles sem a presença de quitosana úteis e aplicáveis a posteriores estudos.

A interação entre indicador interno e saco de incubação para RF releva a importância da adequação dos aspectos metodológicos sobre a qualidade dos resultados, os quais mostraram ser dependentes dessa combinação. Para sacos F57 e TNT, as médias de RF aumentaram à medida que foram realizados os procedimentos sequenciais de análise de MSi, FDNi e FDAi, enquanto que utilizando sacos P12 e P25, os menores valores de RF foram observados para FDNi, seguido de MSi e FDAi. O indicador FDAi sempre resultou em valores superiores de RF, e à exceção do saco F57, tais valores foram maiores que 109% para os demais sacos. Este resultado indica que a quantidade de FDAi consumida foi inferior a excretada. Partindo do pressuposto de que não há transformação deste indicador ao longo do trato gastrointestinal, há possibilidade de que o tratamento dos resíduos de incubação com detergente ácido tenha solubilizado alguma fração de FDAi dos alimentos, que não ocorreu ou ocorreu em menor grau para as amostras de fezes. Ou ainda que a remoção de componentes solúveis em detergente ácido não foi completa nas amostras de fezes, as quais tem maior resíduo de incubação que amostras de alimentos. Similar a essa última hipótese, apesar do longo tempo de 288 h de incubação *in situ* das amostras, o qual é considerado assintótico (KRIZSAN e HUHTANEN, 2013), há possibilidade de que tenha havido alguma limitação temporal para completa remoção da celulose digestível das fezes, elevando os teores de FDAi. Contudo é difícil explicar porque esse comportamento não teria ocorrido nos sacos F57, visto que a porosidade é idêntica dos sacos P25.

Krizsan et al. (2015) utilizaram sacos de poliéster com porosidades de 6, 11, 12 e 17 µm para avaliação dos teores de FDNi *in situ* por 288 h, sendo os sacos de 6, 11 e 17 micra produzidos por uma empresa (07-6/5, 07-11/5 e 07-17/9 Sefar Petex, Sefar AG, Heiden, Suíça) e os de 12 micra adquiridos de outro fabricante (Saatifil PES 12/6, Saatitech S.p.A., Veniano, Itália), onde observaram as maiores concentrações de FDNi para os sacos de 12 µm, assumindo que não somente a porosidade, mas a procedência e demais características do

material têxtil influenciam as estimativas. Essa informação é condizente com os resultados dessa pesquisa, onde as RF dos sacos de poliéster dentro de cada indicador foram muitos similares entre si apesar das diferenças de porosidade, enquanto que sacos P25 e F57 que possuíam o mesmo tamanho de poros apresentaram comportamento distinto de RF.

Adicionalmente, o padrão de variação na RF dos sacos de incubação foi muito similar entre os indicadores FDNi e FDAi, no entanto esse mesmo padrão de comportamento não foi observado para MSi. É provável que as diferenças nas características têxteis dos sacos tenham implicado em diferentes graus de contaminação do material incubado com o material ruminal nos sacos de MSi. Contaminantes de resíduos microbianos são mais facilmente removidos por ação aniônica dos detergentes neutro e ácidos nos procedimentos analíticos de FDNi e FDAi, respectivamente, se comparados à MSi (VAN SOEST, 1994).

Apesar das variações na RF dos indicadores internos em função dos efeitos dissemelhantes para os sacos de incubação avaliados, resultados satisfatórios para dietas convencionais (sem quitosana) foram obtidos para o indicador FDNi determinado em sacos P12, P25 e TNT, além do FDAi utilizando sacos F57, todos atendendo a característica de completa RF.

Para os indicadores externos, novamente foi observado influência da dieta sobre o indicador, onde o grão de soja apresentou efeito sobre a RF do Cr_2O_3. Apesar do óxido crômico historicamente ser o indicador mais utilizado em estudo de digestão, sendo inclusive abordado em trabalhos de revisão (OWENS e HANSON, 1992; TITGEMEYER, 1997), esse resultado é aparentemente novo, pois não foram encontradas informações na literatura de estudos que avaliaram uma provável associação entre lipídios nas dietas e a RF deste indicador. A priori, esse resultado pareceu não ser uma relação de causa-efeito, e sim devido alguma modificação que ocorreu para as vacas que consumiam dietas com grão de soja e indiretamente afetaram a RF do Cr_2O_3. No entanto, pela análise de robustez, onde foi avaliada a relação entre vieses das estimativas dos indicadores em função de variáveis independentes selecionadas, a única relação significativa para o Cr_2O_3 foi justamente com o consumo de EE das vacas. Para cada kg de aumento no consumo de EE, o viés médio das estimativas de excreção fecal para amostras de Cr_2O_3 obtidas em 24 h de coletas totais foi de -1,17 kg de MS. Porém, não são encontradas hipóteses que justificariam esse efeito, necessitando de maiores estudos para averiguação.

O TiO_2 apresentou incompleta RF, resultado que compromete sua utilização. RF diferente de 100% já havia sido reportada por Titgemeyer et al. (2001), em um dos primeiros trabalhos que avaliaram o uso do dióxido de titânio em substituição ao óxido crômico. Cabe

ressaltar que o método analítico utilizado nesse estudo para determinação do TiO_2 nas amostras fecais foi um aspecto limitante, que incluiu dificuldades operacionais de completa transferência quantitativa da amostra digerida presente no tubo de digestão ao recipiente de filtragem e diluição, as quais em muitas ocasiões encontravam-se cristalizadas. Portanto, a incompleta RF observada para o TiO_2 pode, em partes, ser devido às limitações no método analítico do indicador e não somente às suas características inerentes.

Os resultados de recuperação fecal dos indicadores impactaram diretamente sobre os vieses das estimativas de excreção fecal. Indicadores que apresentaram completa RF foram capazes de gerar estimativas acuradas, sem diferença significativa entre valores estimados e observados. Contrariamente, indicadores cuja RF diferiu de 100%, o viés médio das estimativas também diferiu de zero, indicando que os mesmos não foram capazes de gerar valores médios de excreção fecal próximos dos valores reais observados com a coleta total. De acordo com Langlands et al. (1963), completa recuperação está intimamente associada com a acurácia ou baixo viés médio, o qual é também conhecido como vício de recuperação ou vício de longo prazo do indicador. Isso ressalta a importância da averiguação da RF do indicador em condições experimentais semelhantes as que serão aplicadas no estudo, de modo a assegurar a confiabilidade das estimativas que serão geradas.

Apesar de a acurácia ser uma boa ferramenta, essa, por si só, não é suficiente para avaliar a eficiência de um indicador como um todo. Um valor acurado pode ser reflexo de uma combinação de resultados estimados com alta variação (pouco precisos), mas que a média dos desvios negativos e positivos se assemelhou a zero, gerando um valor final próximo ao observado. Exemplo disso é o resultado obtido para Cr_2O_3 na amostra pontual *spot*, o qual teve baixa precisão, no entanto o valor médio estimado não diferiu do observado, o que indica que sua acurácia é "acidentalmente" oriunda do balanço de médias de excreções fecais superestimadas e subestimadas com alta variação. Em contraste, a boa precisão observada para as estimativas de excreção fecal do Cr_2O_3 na amostra pontual composta mostra que apesar de haver variação no perfil nictemeral de excreção desse indicador, evidenciada pela baixa precisão da amostra *spot*, a aplicação de um protocolo de coletas que compreenda essa variação diária é capaz de gerar estimativas acuradas e precisas.

Kozloski et al. (2006) observaram que estimativas de excreção fecal de bovinos em pastejo com uso de Cr_2O_3 e com apenas duas amostragens de fezes ao longo do dia foram acuradas, mas que a precisão das estimativas aumentou com várias amostragens em diferentes horários ao longo de um período de 24 horas. Sampaio et al. (2011b) avaliaram o perfil de excreção fecal de indicadores internos (MSi, FDNi e FDAi) e externos (Cr_2O_3 e TiO_2) em

ensaio de digestão com bovinos Nelore e observaram que indicadores externos apresentaram maior amplitude de oscilação diária na excreção, recomendando delineamentos de amostragem fecal com no mínimo quatro coletas, sendo distribuídas ao longo do dia ou somente no período diurno para obtenção de estimativas de excreção fecal isentas de erros associados ao delineamento de amostragem. Ambos estudos estão de acordo com os resultados obtidos nessa pesquisa, evidenciando que o adequado protocolo de amostragem fecal é determinante para obtenção de resultados precisos de excreção fecal, especialmente para indicadores externos.

Para o TiO_2, além da falta de acurácia em função da incompleta RF, foram observados problemas de falta de precisão das estimativas, mesmo nas amostras de coleta total de fezes, desqualificando seus resultados nas condições do presente estudo.

Para os indicadores internos, de modo geral, a FDAi apresentou menor precisão das estimativas em comparação com MSi e FDNi, o que pode ser atribuído à menor concentração deste indicador nas amostras, especialmente as de alimentos e sobras. Como a quantificação desses componentes envolve métodos gravimétricos, indicadores de menor massa residual acarretam em maior impacto do erro inerente à variação na pesagem de massa sobre a precisão dos resultados finais. Nesses casos, além do maior rigor laboratorial, o aumento da quantidade de amostra a ser incubada para geração de maior quantidade de resíduos pode ser uma estratégia para melhorar a precisão das estimativas do indicador. Menor precisão da FDAi quando comparada a outros indicadores internos e associação desta com problemas de quantificação de massa já havia sido reportado em outros estudos (DETMANN et al., 2007; SAMPAIO et al., 2011a).

Essa suposição levantada de que a quantidade do resíduo de incubação do indicador foi determinante para a precisão das suas estimativas explica os bons resultados observados para a MSi. Apesar de haver maior contaminação microbiana para MSi, sendo esse fator frequentemente relacionado à diminuição da precisão (VAN SOEST, 1994; CASALI et al., 2009), no presente estudo aparentemente os resíduos microbianos foram mais condicionados ao tipo de saco de incubação, com menor variação da contaminação entre replicatas do mesmo tipo de saco, não comprometendo expressivamente a precisão dos resultados de MSi. Sacos sem amostras, apenas selados (brancos) de cada tipo de material utilizado foram incubados juntamente com as amostras, os quais foram posteriormente submetidos aos procedimentos de análise de MSi, FDNi e FDAi. A diferença de peso antes da incubação e após cada procedimento relevou que a contaminação para MSi foi de 0,82%, 0,83%, 5,90% e

5,36%, para FDNi foi de 0,12%, 0,16%, 1,42% e 2,25% e para FDAi foi de 0,04%, 0,08%, 0,28% e 1,11% para os sacos P12, P25, F57 e TNT, respetivamente.

Em função da interação entre indicador e saco de incubação para RF, os dados não foram agrupados por tipo de indicador ou tipo de saco para comparação dos valores médios de acurácia e precisão, sendo tais parâmetros avaliados dentro das combinações geradas entre os dois fatores. Para as combinações, conforme já descrito, resultados acurados foram obtidos para alguns indicadores e precisos para outros. Dependendo o objetivo do estudo, a acurácia pode ser o fator de escolha determinante, como, por exemplo, quando há maior interesse na obtenção de valores absolutos exatos. Em outras situações, a precisão pode ser a ferramenta principal de escolha do indicador, como nos casos onde o principal objetivo é a comparação de tratamentos dietéticos. No entanto, para a maioria das situações, o indicador ideal seria aquele que atendesse ambas as características de acurácia e precisão satisfatoriamente. Levando isso em consideração, foi proposta a avaliação dos indicadores pelo denominado "índice composto de acurácia e precisão", de modo a elencar quais desses geraram estimativas de excreção fecal mais satisfatórias considerando essas duas informações conjuntamente. O índice revelou que os melhores indicadores foram FDNi quando analisada em sacos de P12 e P25 e o Cr_2O_3, cujo resultado do protocolo de amostragem fecal de 9 em 9 h foi idêntico aos observados com a coleta total de fezes.

No entanto, a avaliação dos vieses lineares comprometeu o uso do Cr_2O_3, pois à medida que aumentou a excreção fecal observada aumentaram os erros das estimativas deste indicador nas amostras de coleta total. Como o viés linear foi negativo, isso indica que a excreção fecal foi subestimada, logo, a concentração do indicador aumentou nas fezes à medida que aumentou a excreção observada. Segundo Titgemeyer (1997) umas das limitações do Cr_2O_3 é sua incompleta mixagem com a digesta, indicando que o mesmo não é capaz de se associar especificamente com nenhuma fase da mesma, podendo fluir paralelamente. Também há informações de que o Cr_2O_3 tem uma taxa de passagem mais rápida pelo rúmen que o material fibroso (VAN SOEST, 1994). Com base nessas informações, é possível que nas vacas com maior taxa de passagem e nível de excreção fecal, o Cr_2O_3 fluiu e foi excretado mais rapidamente, resultando em aumento do viés das estimativas. No entanto, Rodrigues et al. (2010) não observaram viés linear significativo sobre as estimativas de digestibilidade da MS pelo uso do Cr_2O_3 em estudo de digestão com ovinos.

Para o TiO_2, além de não ter atendido as características de acurácia e precisão, o viés linear foi positivo e significativo nas amostras *spot*, indicando que no momento da amostragem pontual única de fezes a concentração do indicador é menor, superestimando a

excreção fecal. Os indicadores internos avaliados nas dietas sem a presença de quitosana não apresentaram viés linear diferente de zero, ou seja, as estimativas de excreção fecal não foram influenciadas pela excreção fecal observada, logo, são robustas.

Quando os vieses médios das estimativas dos indicadores foram relacionados ao nível de consumo de FDN e EE das vacas, bem como a variação de PV, novamente os indicadores internos não apresentaram relação linear entre o erro das estimavas e as características avaliadas. Portanto, os indicadores internos são robustos para estimar as excreções fecais, não influenciando a acurácia das estimativas quando há variação de peso e consumo entre as vacas utilizadas no ensaio de digestibilidade. Vale inclusive ressaltar que os *slope* e coeficientes de determinação da reta ajustada entre viés médio e peso vivo foram extremamente próximos de zero, assim como os *P*-valores foram muito próximo de 1, indicando a ausência de relação entre ambos e a independência dos erros, características desejadas para um bom indicador.

O Cr_2O_3 não foi robusto para estimar a excreção fecal das vacas quando houve variação no consumo de EE das mesmas, conforme já apresentado anteriormente, estando intimamente relacionado à RF do indicador, que foi influenciada pelo grão de soja. Novamente é difícil explicar como o consumo de EE compromete a acurácia das estimativas do Cr_2O_3, mas devido à relevância da informação, estudos posteriores poderão indicar se há algum tipo de associação do indicador aos lipídios da dieta ou se estes influenciam no método analítico de quantificação do Cr_2O_3, entre outras possibilidades que possa haver. As estimativas de excreção fecal do TiO_2 também não foram robustas a partir das amostras *spot* quando o consumo de FDN das vacas variou, bem como houve ausência de robustez para estimativas oriundas de amostras de 24 h de coleta total com a variação de PV das vacas.

Por fim, para avaliar o impacto da acurácia e precisão das estimativas de excreção fecal dos indicadores utilizados no presente estudo, foram feitos agrupamentos pela combinação de resultados de baixa ou alta acurácia com baixa ou alta precisão. O indicador FDAi analisado em sacos de TNT, por exemplo, foi considerado de baixa acurácia e baixa precisão, e embora o impacto sobre a excreção fecal foi de -0,91 kg de MS para o viés médio e 0,93 kg de MS para o erro de precisão, sobre a digestibilidade da FDN isso representou um erro de 12,4 unidades de digestibilidade para viés médio, com uma variação de 7,30 unidades. Ou seja, se este indicador tivesse sido utilizado como referência no estudo, teria superestimado consideravelmente a digestibilidade da FDN e comprometido as comparações entre dietas devido à alta variabilidade do erro.

3.7 CONCLUSÕES

Embora períodos de 24 h de coleta total de fezes geram resultados precisos, valores de digestibilidade aparente total mais acurados e sem confundimento dos efeitos dietéticos podem ser obtidos em ensaios de digestão de 72 h para vacas leiteiras. O indicador externo Cr_2O_3 gerou estimativas de excreção fecal acuradas e precisas, no entanto a recuperação fecal e a robustez foram afetadas pelo consumo de extrato etéreo das vacas, além de apresentar erro sistemático de predição. Nas condições do estudo, o indicador externo TiO_2 apresentou incompleta recuperação fecal, com estimativas de baixa acurácia, precisão, além da ausência de robustez com a mudança de peso vivo das vacas. Os indicadores internos MSi, FDNi e FDAi apresentaram recuperação fecal dependente da presença de quitosana na dieta e da combinação entre saco de incubação e indicador. Dentre as combinações avaliadas sem a presença de quitosana, a FDNi em sacos de poliéster de 12 ou 25 µ teve completa recuperação e gerou as estimativas mais acuradas e precisas, com robustez e sem erro sistemático de predição. A falta de acurácia e precisão dos indicadores têm grande impacto final sobre as estimativas de digestibilidade aparente total dos nutrientes.

3.8 LITERATURA CITADA

ÅKERLIND, M.; WEISBJERG, M.; ERIKSSO, T.; TØGERSEN, R.; UDÉN, P.; ÓLAFSSON, B. L.; HARSTAD, O. M.; VOLDEN, H. Feed analyses and digestion methods. In:Volden, H. (Ed.), **NorFor – The Nordic Feed Evaluation System**, Wageningen Acad. Publ.,Wageningen, The Netherlands, p. 41–54, 2011.

AOAC. **Official Methods of Analysis**. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA. 2000.

BARBOSA, A. M. **Período de coleta de urina e de fezes para avaliação da excreção de creatinina, produção microbiana e digestibilidade aparente dos nutrientes em Nelore**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 63p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, 2005.

BERCHIELLI, T. T.; ANDRADE, P.; FURLAN, C. L. Avaliação de indicadores internos em ensaios de digestibilidade. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 29, n. 3, p. 830-833, 2000.

BERCHIELLI, T. T.; OLIVEIRA, S. G.; CARRILHO, E. N. V. M. et al. Comparação de indicadores para estimativas de produção fecal e de fluxo de digesta em bovinos. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 34, n. 3, p. 987-996, 2005.

CASALI, A. O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Estimação de teores de componentes fibrosos em alimentos para ruminantes em sacos de diferentes tecidos. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 38, n. 1, p. 130-138, 2009.

DETMANN, E.; SOUZA, R.; GARCIA, S.C. et al. Avaliação do vício de "tempo longo" de indicadores internos em ensaio de digestão com ruminantes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 182-188, 2007.

FARENZENA, R.; KOZLOSKI, G. V.; GINDRI, M.; STEFANELLO, S. Minimum length of the adaptation and collection period indigestibility trials with sheep fed *ad libitum* only forage or forageplus concentrate. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 10, p. 01-10, 2016.

FERREIRA, M. A.; VALADARES FILHO, S. C.; MARCONDES, M. I.; PAIXÃO, M. L.; PAULINO, M. F.; VALADARES, R. F. D. Avaliação de indicadores em estudos com ruminantes: digestibilidade. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 38, n. 8, p. 1568-1573, 2009.

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, 2009.

HATTAN, G. L.; OWEN, F. G. Efficiency of total collection and chromic oxide techniques in short-term digestion trials. **Journal of Dairy Science**, v. 53, p. 325–329, 1969.

HUHTANEN, P.; KAUSTELL, K.; JAAKKOLA, S.The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets.**Animal Feed Science Technology**, v. 48, p. 211-227, 1994.

HUHTANEN, P.; VANHATALO, A.; VARVIKKO, T.. Enzyme activities of rumen particles and feed samples incubated *in situ* with differing types of cloth. **British Journal of Nutrition**, v. 79, p. 161-168, 1998.

KIMURA, F. T.; MILLER, V. L. Improved determination of chromic oxide in cal feed and feces. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**., v. 5(2), p. 216, 1957.

KOHN, R. A.; KALSCHEUR, K. F.; HANIGAN, M. Evaluation of models for balancing the protein requirements of dairy cows.**Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 12, p. 3401-3414, 1998.

KOZLOSKI, G. V.; NETTO, D. P.; OLIVEIRA, L.; MAIXNER, A. R.; LEITE, D. T.; MACCARI, M.; BRONDANI, I. L.; BONNECARRÈRE SANCHEZ, L.M.; QUADROS, F. L. F. Uso de óxido de cromo como indicador da excreção fecal de bovinos em pastejo: variação das estimativas em função do horário de amostragem. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 599-603, 2006.

KOZLOSKI, G.V.; MESQUITA, F.R.; ALVES, T. P.; CASTAGNINO, D. S.; STEFANELLO, C.M.; BONNECARRÈRE SANCHEZ, L.M. Avaliação do uso de frações indigestíveis do alimento como indicadores internos de digestibilidade em ovinos. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.38, p. 1819-1823, 2009.

KRIZSAN, S. J.; NYHOLM, L.; NOUSIAINEN, J.; SUDEKUM, K. H.; HUHTANEN, P. Comparison of in vitro and in situ methods in evaluation of forage digestibility in ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 3162-3173, 2012.

KRIZSAN, S. J.; HUHTANEN, P. Effect of diet composition and incubation time on feed indigestible neutral detergent fiber concentration in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 1715-1726, 2013.

KRIZSAN, S. J; RINNE, M.; NYHOLM, L.; HUHTANEN, P.New recommendations for the ruminal *in situ* determinationof indigestible neutral detergent fibre. **Animal Feed Science and Technology**, v. 205, p. 31-41, 2015.

LEE, C.; HRISTOV, A. N. Short communication: Evaluation of acid-insoluble ash and indigestible neutral detergent fiber as total-tract digestibility markers in dairy cows fed corn silage-based diets **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 5295-5299, 2013.

MAYER, D. G.; STUART, M. A.; SWAIN, A. J. Regression of real-world data on model output: an appropriate overall test of validity. **Agricultural Systems**, v. 45, p. 93-104, 1994.

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.

MYERS, W. D.; LUDDEN, P. A.; NAYIGIHUGU, V.; HESS, B. W. Thecnical Note: a procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 1, p. 179-183, 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.

OTT, R. L. **An introduction to statistical methods and data analysis**.Wadsworth, 1983. 354p.

OWENS, F. N.; HANSON, C. F. External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 75(9), p. 2605-2617, 1992.

RODRIGUES, P. H. M.; GOMES, R. C.; SIQUEIRA, R. F.; MEYER, P. M. RODRIGUES, R. R. Acurácia, precisão e robustez das estimativas da digestibilidade aparente da matéria seca determinada com o uso de indicadores em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 5, p. 1118-1126, 2010.

SAMPAIO, C. B.; DETMANN, E.; VALENTE, T. N. P.; SOUZA, M. A.; VALADARES FILHO, S. C.; PAULINO, M. F. Evaluationoffecal recovering and long term bias of internal and external markers in a digestion assay with cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 1, p. 174-182, 2011a.

SAMPAIO, C. B.; DETMANN, E.; VALENTE, T. N. P.; COSTA, V. A. C.; VALADARES FILHO, S. C.; QUEIROZ, A. C.Fecal excretion patterns and short term bias of internal and external markers in a digestion assay with cattle. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 40, n. 3, p. 657-665, 2011b.

St-PIERRE, N. R. Reassessment of biases in predicted nitrogenflows to the duodenum by NRC 2001. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 344–350, 2003.

TITGEMEYER, E. C. Design and interpretation of nutrient digestion studies**. Journal of Animal Science**, v. 75, n. 8, p. 2235-2247, 1997.

TITGEMEYER, E. C.; ARMENDARIZ, C. K.; BINDEL, D. J. Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 1059-1063, 2001.

VALENTE, T. N. P.; DETMANN, E.; QUEIROZ, A. C.; VALADARES FILHO, S. C.; GOMES, D. I; FIGUEIRAS, J. F. Evaluation of ruminaldegradation profiles of forages using bags made from different textiles. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 11, p. 2565-2573, 2011.

VALENTE, T. N. P.; DETMANN, E.; SAMPAIO, C. B. Review: Recent advances in evaluation of bagsmade from different textiles used *in situ* ruminaldegradation. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 95(4), p. 493-498, 2015.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**, 2.ed. Ithaca: Cornell University, 1994. 476p.

4 USO DA CREATININA COMO INDICADOR DO VOLUME URINÁRIO PARA ESTIMATIVAS DA EXCREÇÃO TOTAL DE DERIVADOS DE PURINAS COMO TÉCNICA DE AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO MICROBIANA RUMINAL EM VACAS LEITEIRAS

4.1 RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o uso da creatinina como indicador do volume urinário para estimativas de excreção total de derivados de purinas como técnica de avaliação da produção microbiana ruminal em vacas leiteiras alimentadas com diferentes dietas. Foram utilizadas oito vacas canuladas no rúmen (144 ± 39,7 DEL, 34,3 ± 5,1 kg de leite/dia e 592 ± 57,9 kg de PV) distribuídas em quadrado latino 4×4 replicado, alimentadas com quatro dietas obtidas por esquema fatorial 2×2 pela combinação de quitosana (0 e 4 g/kg de MS da dieta) e grão de soja integral (0 e 140 g/kg de MS da dieta). Foram realizadas coletas totais de urina ao longo de 24, 48 e 72 horas. Adicionalmente, coletas pontuais de urina foram realizadas a partir de dois protocolos, um com coletas a cada 9 h em 72 h (pontual composta) e outro com uma única coleta, 4 horas após a alimentação da manhã (pontual *spot*). Foi observado que a excreção de creatinina por unidade de peso vivo foi afetada pelas condições experimentais do estudo, incluindo efeito de dieta e variação entre períodos experimentais e animais. Consequentemente, as estimativas de volume urinário foram enviesadas. Coletas pontais compostas subestimaram o volume urinário, enquanto que coletas pontuais *spot* apresentaram grande variação nas estimativas entre os tratamentos. Ambas também não foram capazes de apontar os reais efeitos dietéticos sobre a produção urinária e excreção de derivados de purinas. À medida que aumentou a duração do período de coletas totais, aumentou a precisão das avaliações, no entanto, a excreção de derivados de purinas não atingiu constância. Como conclusões, apesar da relação significativa entre excreção de derivados de purinas observada e estimada com coletas pontuais compostas, essa deve ser vista com cautela, em razão de que o volume urinário foi subestimado e que este protocolo de coleta não foi preciso para apontar corretas diferenças entre os tratamentos, comprometendo assim as avaliações sobre a produção microbiana ruminal.

Palavras-chave: Creatinina. Coleta *spot*. Derivados de purinas. Síntese de proteína microbiana. Vacas em lactação.

CREATININE USE AS INDICATOR OF URINARY PRODUCTION FOR ESTIMATES OF PURINE DERIVATIVES TOTAL EXCRETION AS MICROBIAL PROTEIN SYNTHESIS EVALUATION TECHNIQUE IN DAIRY COWS

4.2 ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the use of creatinine as an indicator of urinary volume. It would be possible by estimating the total purine derivatives excretion to evaluate ruminal microbial production in dairy cows fed with different diets. Eight ruminal cannulated cows (144 ± 39.7 DIM, 34.3 ± 5.1 kg of milk / day and 592 ± 57.9 kg of BW) were allocated in a replicated 4 × 4 Latin square, and fed with diets supplemented with chitosan (0 and 4 g / kg of dietary DM basis) and whole raw soybean (0 and 140 g / kg of dietary DM basis) arranged in a 2 × 2 factorial design. Total urine collection were performed over 24, 48 and 72 hours. Additionally, collection of spot urine were made from two protocols, the first one performed every 9 hours for a period of 72 hours (composite) and the other with a single collection 4 hrs after the morning feeding (single spot). It was observed that the creatinine excretion per BW was affected by the experimental conditions of the study, including the diet effect and the variation between periods and animals; thus, the urinary volume estimates were skewed. The composite spot collections underestimated the urinary volume, while the single spot showed a large variation in the estimates between treatments. Also, both spot collections were unable to explain the dietary effects on urinary output and purine derivatives excretion. With the increase of the total collection time, the accuracy of the evaluations increased, however, the results of purine derivatives excretion were inconsistent. Therefore, the significant relationship between purine derivatives excretion observed and estimated with composite spot collections should be viewed with care. The urinary volume was underestimated and this type of protocol was not reliable to show differences between treatments, and it can compromise the evaluation of microbial ruminal production.

Keywords: Creatinine. Spot collection. Purines derivatives. Microbial protein synthesis. Dairy cows.

4.3 INTRODUÇÃO

Das altas exigências em energia e proteínas de vacas leiteiras, mais da metade são atendidas pela atividade dos microrganismos ruminais, com a respectiva produção de ácidos graxos voláteis e proteína microbiana. A proteína microbiana sintetizada no rúmen, além de contribuir com a maioria dos aminoácidos totais que fluem para o intestino delgado, possui elevada qualidade, cujo seu perfil aminoacítico é muito semelhante àqueles do leite (CLARK et al., 1992). Portanto, o fluxo de proteína microbiana para o duodeno pode ser considerado o indicador mais importante e sensível da otimização do metabolismo ruminal em vacas leiteiras de alta produção (TAS e SUSENBETH, 2007).

No entanto, a avaliação *in vivo* da síntese proteica ruminal utilizando métodos tradicionais com marcadores microbianos é trabalhosa, onerosa e necessita de animais canulados pós-ruminalmente. Quando esses métodos são incluídos nos estudos, além de contarem com um limitado número de animais, também dependem de estimativas confiáveis do fluxo de digesta, por isso normalmente geram resultados com alto erro padrão das estimativas, devendo ser utilizados com cautela (GONZÁLEZ-RONQUILLO et al., 2004). Adicionalmente, tais técnicas consideradas invasivas têm sido constantemente questionadas quanto ao atendimento das premissas de saúde e bem estar animal, exigindo esforços para obtenção de métodos mais simples e aplicáveis, mas capazes de gerar estimativas confiáveis. Até então, como principal método alternativo, não invasivo, é comumente utilizado a excreção de derivados de purinas (DP) na urina e no leite de ruminantes, os quais são um indicador indireto da síntese microbiana ruminal (CHEN e GOMES, 1992). Apesar de mais simples e menos oneroso, esse método requer a quantificação do volume urinário (VU) para estimativa da excreção diária total de DP.

O procedimento de coleta total de urina é relativamente simples quando realizado em animais machos, confinados e mantidos em gaiolas metabólicas. No entanto, em muitas situações esse procedimento torna-se inviável, como é o caso de animais em pastejo, ou consideravelmente complexo quando são utilizadas fêmeas. O cateterismo vesical é a técnica mais comumente utilizada para coleta total de urina em fêmeas. Contudo, cateteres urinários apresentam problemas específicos, tais como as consideráveis dificuldades operacionais e de inserção, infecções secundárias na bexiga, muitas vezes substanciais perdas de urina, além de possíveis alterações comportamentais devidas ao desconforto animal (KURIEN et al., 2004). A ocorrência de tais inconvenientes aumenta quanto mais longa for a duração do período de coletas totais, embora maiores tempos de avaliação diminuam a variação nos resultados de

produção urinária e excreção de DP. Além dos inconvenientes específicos da técnica de cateterização, a excreção de grandes volumes urinários em vacas leiteiras de alta produção torna a coleta total uma atividade bastante laboriosa.

Com base nessas dificuldades, a creatinina tem sido utilizada como indicador para estimativas do VU alternativamente à coleta total de urina. A creatinina é um metabólito formado no tecido muscular pela remoção não enzimática e irreversível de água do fosfato de creatina, a qual se origina do metabolismo celular (HARPER et al., 1982). Pelo fato da creatinina ser produzida diariamente e ser excretada de forma relativamente constante por quilograma de massa muscular do animal, este tem sido o indicador mais utilizado para estimativas da excreção diária de urina a partir da sua concentração em amostras pontuais (KOZLOSKI et al., 2005). A facilidade de realização desse tipo de amostragem, até mesmo em condições de campo, certamente tem contribuído para disseminação desta técnica.

No entanto, embora comum, a técnica de amostragem pontual de urina tem gerado controvérsias, cuja divergência principal refere-se à constância de excreção da molécula de creatinina. Enquanto alguns estudos com bovinos demonstraram que a excreção de creatinina como proporção do peso vivo foi constante e semelhante entre os animais (VALADARES et al., 1999; RENNÓ et al., 2000; CHIZZOTTI et al., 2008; SILVA et al., 2012), outros afirmaram haver significativas variações (CHEN et al., 1995; SHINGFIEL e OFFER, 1998; WHITTET et al., 2004; POSADA et al., 2011). Diferenças nas características fisiológicas dos animais normalmente são atribuídas como a principal causa de variação, embora também possa haver influência da dieta e nível de consumo dos animais sobre a excreção de creatinina (LIU e McMENIMAN, 2006; TAS e SUSENBETH, 2007).

Caso ocorra variação na excreção urinária de creatinina, ao se assumir uma constância e utilizar um único valor médio de excreção, é possível que o mesmo não represente a real condição de todos os animais, havendo substanciais erros de predição sobre a excreção de DP e incorretas inferências sobre a síntese proteica ruminal. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar o uso da creatinina como indicador do volume urinário para estimativas de excreção total de derivados de purinas como técnica de avaliação da produção microbiana ruminal em vacas leiteiras alimentadas com diferentes dietas.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais aplicados neste estudo seguiram os "Princípios Éticos na Experimentação Animal", recomendados pela Comissão de Ética no Uso de

Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), de acordo com o protocolo de nº 3059/2013.

4.4.1 Local, instalações e animais

O experimento foi conduzido nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da FMVZ-USP, em Pirassununga - SP, no período de 14 de setembro a 14 de dezembro de 2013.

Foram utilizadas oito vacas da raça Holandesa canuladas no rúmen, multíparas, com 144 ± 39,7 dias em lactação, 34,3 ± 5,1 kg de leite/dia e 592 ± 57,9 kg de PV ao início do experimento. Essas vacas pertenciam a um grupo total de 24 vacas, que foram submetidas a um experimento de avaliação nutricional de dietas, conforme descrito na Seção 2. As vacas foram alojadas em estábulo tipo *free-stall* com ventilação forçada, porém adaptado com baias individuais de 17,5m^2 de área e providas de camas de areia, sendo ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia, as 6 h e as 16 h.

4.4.2 Delineamento experimental e dietas

Foi utilizado delineamento em duplo quadrado latino 4×4, balanceados para efeitos de *carryover*, com períodos de 23 dias de duração, sendo 20 dias de adaptação e 3 dias de coletas totais de urina. As vacas foram blocadas e distribuídas aos quadrados com base na produção de leite, dias em lactação e peso vivo ao início do experimento.

Para composição das dietas, inicialmente foram formuladas duas dietas basais, isonitrogenadas, com diferentes teores de extrato etéreo a partir da adição de dois níveis de grão de soja integral (0 e 140 g/kg de MS da dieta). Sobre essas dietas basais (*top-dressed*), foram adicionados dois níveis de quitosana (0 e 4 g/kg de MS da dieta; Polymar Ciência e Nutrição, Fortaleza, CE, Brasil), um aditivo antimicrobiano, de modo que as quatro dietas experimentais foram obtidas por um esquema fatorial 2×2, como segue: CO-Q) Controle, composta por uma dieta sem suplementação lipídica e sem adição de quitosana; CO+Q) Quitosana, composta por dieta sem suplementação lipídica e com adição de quitosana; GS-Q) Grão de soja, composta por dieta contendo suplementação lipídica e sem adição de quitosana; e GS+Q) Grão de soja e Quitosana, composta por dieta contendo suplementação lipídica e com adição de quitosana. A proporção volumoso:concentrado das dietas foi 50:50, cuja fonte de volumoso era silagem de milho (Tabelas 2.1 e 2.2).

As vacas foram alimentadas *ad libitum*, sendo arraçoadas duas vezes ao dia, às 8 h e às 13 h, de acordo com o consumo de MS do dia anterior, onde os alimentos eram misturados no cocho e fornecidos na forma de dieta completa.

4.4.3 Coletas totais e pontuais de urina

Coletas totais de urina foram realizadas nos últimos 3 dias de cada período, durante 72 h (AHVENJÄRVI et al., 2002; GONZÁLEZ-RONQUILLO et al., 2003). A urina foi coletada utilizando sondas de Foley (28 French, 75 mL; Rüch Amber, Malásia, África), implantadas com auxílio de espéculo vaginal e guia de sonda, via uretra até a bexiga urinária, 12 h antes do início da coleta. Ao início da coleta, a extremidade livre da sonda foi ligada a um tubo conector de PVC atóxico e transparente (1,2 cm de diâmetro), conectado a uma bolsa coletora de urina (Free-Bac, 2 L, sistema fechado; Changshu Senlin Medical Appliance Ltda., Changshu, China). A bolsa coletora foi presa a uma cinta elástica (80 mm de largura) costurada com velcro, envolta na região anterior dos animais, da cernelha à região ventral das costelas anteriores. Com o uso deste aparato de coleta urinária de metodologia própria, as vacas tinham livre movimentação nas baias, não necessitando estarem presas a coleiras, como comumente ocorre nos procedimentos de coleta total de urina.

Após cada micção espontânea, as bolsas coletoras eram esvaziadas e a urina transferida para galões plásticos contendo 500 mL de H_2SO_4 40%, adicionados para manter o pH da urina abaixo de 3, prevenindo a degradação microbiana dos derivados de purina (CHEN e GOMES, 1992) e a perda da amônia por volatilização (PLAIZIER et al., 2000). Ao final de cada período de 24 h, a produção urinária foi pesada, homogeneizada e coletada uma amostra para processamento. Uma alíquota de 20 mL de urina foi diluída em 80 mL de água destilada, para evitar a precipitação e formação de cristais de ácido úrico na amostra. Depois de diluídas, as amostras foram armazenadas a -20ºC para posteriores análises.

Concomitantemente às coletas totais, foram realizadas coletas pontuais de urina utilizando dois protocolos. No primeiro, amostras pontuais de urina foram coletadas por micção estimulada por massagem da vulva a cada 9 h, totalizando oito amostragens ao longo de 72 h. Imediatamente após cada intervalo de coleta, 20 mL de urina foram diluídos em 80 mL de H_2SO_4 0,036 N e transferidos para um único recipiente, obtendo ao final de cada período uma amostra por vaca, denominada “composta”. Adicionalmente, foi obtida uma única amostra de urina por vaca e por período, denominada “*spot”*, que foi coletada às 12 h do 21º dia, aproximadamente 4 h após a alimentação da manhã (VALADARES et al., 1999;

CHIZZOTTI et al., 2008), a qual foi processada igualmente às amostras compostas. Ambas as amostras foram armazenadas a -20ºC até o momento da análise.

4.4.4 Análises químicas

As concentrações de creatinina nas amostras de coletas totais e pontuais de urina foram analisadas por meio de kit comercial (cód. K067; Bioclin, Belo Horizonte, Brasil) em espectrofotômetro semiautomático (SBA 200, CELM, São Caetano do Sul, Brasil). Adicionalmente, foram analisadas as concentrações de creatinina no sangue para calcular a taxa de depuração deste metabólito. Para tal, no 18º dia de cada período foram coletadas amostras de sangue (0 e 4 h após a alimentação da manhã) por punção da artéria ou veia coccígea, utilizando tubos vacuolizados e sem anticoagulante, os quais foram centrifugados (3000 × g por 15 min a 20ºC) e o soro obtido foi armazenado a -20ºC até o momento da análise. A concentração de creatinina nas amostras de soro foi analisada seguindo o mesmo procedimento utilizado nas amostras de urina.

Para avaliação da síntese de N microbiano ruminal, foi utilizada a excreção de DP como indicador metabólico da síntese, excretados na urina e no leite (CHEN e GOMES, 1992). No entanto, como o objetivo do estudo foi avaliar a variação entre a concentração de DP observado com coleta total de urina e estimado com uso da creatinina, a secreção de alantoína no leite não foi considerada para análise. As amostras de urina foram descongeladas em temperatura ambiente, filtradas em papel filtro Whatman nº 1 e analisados os DP, sendo alantoína e ácido úrico. As concentrações de alantoína foram determinadas segundo Fujihara et al. (1987), descrito por Chen e Gomes (1992), utilizando um leitor de ELISA (Expert Plus, Asys Hitech GMBH, Eugenorf, Áustria), e as concentrações de ácido úrico por meio de kit comercial (cód. K139, Bioclin, Belo Horizonte, Brasil), utilizando um espectrofotômetro semiautomático (SBA 200, CELM).

4.4.5 Cálculos

A taxa de depuração da creatinina (mL/min/ kg de PV) foi calculada como [VU observado (L/dia) × concentração de creatinina na urina (mg/L)]/[concentração de creatinina no soro (mg/L) × PV (kg) × 1440 (min/dia)]. As concentrações de creatinina nas amostras de coleta total de urina foram utilizadas para determinar a excreção média diária de creatinina do experimento, em mg/kg de PV, calculada como [VU observado (L/dia) × creatinina na urina

(mg/L)]/PV (kg). As concentrações de creatinina nas amostras pontuais de urina foram utilizadas para estimar o VU, a partir do valor médio diário obtido para excreção de creatinina (com 72 h de coleta total de urina), onde VU estimado (L/dia) = [PV (kg) × constante de excreção média de creatinina (mg/kg de PV)]/creatinina na urina (mg/L). Os VU estimados foram posteriormente comparados aos VU observados, sendo que ambos foram utilizados para quantificar a excreção total de DP. A excreção total diária de DP foi calculada pela soma das quantidades de alantoína e ácido úrico excretados da urina, expressos em mmol/dia.

4.4.6 Análises estatísticas

Os dados foram inicialmente submetidos aos testes de normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (teste de Hartley), segundo Ott (1983), usando os procedimentos UNIVARIATE e GLM, respectivamente, do SAS (version 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA).

Para análise de variância, os dados de VU observado e estimado, bem como os DP, avaliados ao longo de 24, 48 e 72 h de coletas totais de urina foram analisados como duplo quadrado latino com medidas repetidas no tempo usando o procedimento MIXED do SAS (version 9.2), de acordo com o modelo a seguir:

$$Y_{ijklmn} = \mu + Q_i + GS_j + Q_i \times GS_j + P_k + S_l + V_m(S_l) + T_n + T_n \times Q_i + T_n \times GS_j + T_n \times Q_i \times GS_j + e_{ijklmn} \quad (8)$$

em que: Y_{ijklm} = variável dependente; μ = média geral; Q_i = efeito fixo de quitosana; GS_j = efeito fixo de grão de soja; $Q_i \times GS_j$ = efeito fixo da interação entre quitosana e grão de soja; P_k = efeito fixo de período; S_l = efeito fixo de quadrado; $V_m(S_l)$ = efeito aleatório de vaca dentro do quadrado; T_n = efeito fixo de tempo; $T_n \times Q_i$ = efeito fixo da interação entre tempo e quitosana; $T_n \times GS_j$ = efeito fixo da interação entre tempo e grão de soja; $T_n \times Q_i \times GS_j$ = efeito fixo da interação entre tempo, quitosana e grão de soja; e e_{ijklmn} = erro residual. A interação entre período × vaca dentro de quadrado foi o erro termo.

Foram comparadas 10 estruturas de covariância para os resíduos (CS, CSH, UN, UN(1), AR(1), ARH(1), HF, TOEP, TOEPH e VC), cuja melhor estrutura para cada variável resposta foi definida pelo menor valor de AICC como critério de escolha, conforme metodologia de Akaike. As médias foram ajustadas pela opção LSMEANS e o teste F para efeito de tratamento em cada tempo foi conduzido usando a opção SLICE. Foram construídos

intervalos de confiança ($1 - \alpha = 0,95$) para médias gerais dos tempos, as quais foram também comparadas usando o teste de Dunnett ajustado, considerando o valor obtido em 72 h de coleta total como referência, além do teste Tukey ajustado. Adicionalmente, a proporção dos erros padrões em relação às respectivas médias gerais obtidas para cada variável em 24, 48 e 72 h de coleta total, foi utilizada como índice de precisão relativa para identificar quais variáveis nutricionais foram mais ou menos sensíveis e quanto elas variaram ao longo do período de coleta.

Os dados de excreção urinária de creatinina como proporção do peso vivo ao longo de 24, 48 e 72 h de coleta total também foram analisados utilizando o modelo descrito em (8), porém com algumas modificações: todos os efeitos descritos no modelo foram considerados fixos, visto a hipótese de que a creatinina apresenta comportamento de indicador, ou seja, não afetada por nenhuma das variáveis presentes no modelo; foram incluídas as interações entre tempo × período e tempo × vaca no modelo; e foi considerada a probabilidade de erro tipo I.

Os dados de concentração sanguínea e taxa de depuração da creatinina foram analisados como duplo quadrado latino usando o procedimento MIXED do SAS (version 9.2), de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijklm} = \mu + Q_i + GS_j + Q_i \times GS_j + P_k + S_l + V_m(S_l) + e_{ijklm} \quad (9)$$

em que: Y_{ijklm} = variável dependente; μ = média geral; Q_i = efeito fixo de quitosana; GS_j = efeito fixo de grão de soja; $Q_i \times GS_j$ = efeito fixo da interação entre quitosana e grão de soja; P_k = efeito fixo de período; S_l = efeito fixo de quadrado; $V_m(S_l)$ = efeito fixo de vaca dentro do quadrado; e e_{ijklm} = erro residual. Novamente todos os efeitos do modelo foram classificados como fixos e considerada a probabilidade de erro tipo I.

Para a comparação dos VU e da concentração de DP obtidos a partir dos diferentes protocolos de amostragem pontual com os valores observados em 72 h de coleta total, os dados foram analisados em parcelas subdivididas e com modelos mistos, usando o procedimento MIXED do SAS (version 9.2), de acordo com modelo descrito em (8), onde o efeito fixo de tempo foi chamado de efeito fixo de tipo de protocolo (T_n). As médias foram ajustadas pela opção LSMEANS e o teste F para efeito de tratamento em cada tipo de protocolo foi conduzido usando a opção SLICE. Foram construídos intervalos de confiança ($1 - \alpha = 0,95$) para médias gerais dos VU em diferentes tipos de protocolos, as quais foram também comparadas usando o teste de Dunnett ajustado, considerando o valor obtido em 72 h de coleta total como referência, além do teste Tukey ajustado.

Os dados de VU observados em 72 h de coleta total e os estimados pela concentração de creatinina, tanto nas amostras representativas da coleta total como nas amostras de coletas pontuais compostas e *spot*, foram avaliados por regressão linear, usando o procedimento GLM do SAS (version 9.2). A análise de regressão linear também foi utilizada para avaliar a relação entre valores de excreção urinária de DP observados em 72 h de coleta total com os valores estimados em amostras de coletas pontuais, composta e *spot*. Para ambos os tipos de variáveis, os valores observados (Y) foram plotados contra os valores estimados (X) e foi ajustada uma equação de regressão. A reta ajustada foi avaliada segundo as hipóteses de que o coeficiente angular (*slope*) não difere de 1 e o coeficiente linear (intercepto) é igual a 0 (MAYER et al., 1994). A raiz quadrada média do erro de predição das equações (RQMEP; precisão), bem como a RQMEP corrigida para falta de acurácia dos dados ($RQMEP_{adj}$; precisão corrigida para acurácia), foram calculadas conforme as equações (4) e (5), respectivamente, descritas no Capítulo 3.

Para todos os procedimentos estatísticos conduzidos, significância foi declarada a $P \leq 0,05$. Diferenças entre $0,05 < P \leq 0,10$ foram consideradas tendências de significância.

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Excreção de creatinina e estimativas de volume urinário

Foi observado que a excreção de creatinina na urina como proporção do peso vivo foi afetada pelas condições experimentais do estudo, incluindo efeito significativo de dieta e variações conforme o período experimental e entre os animais (P<0,05; Tabela 4.1). Vacas consumindo dietas com grão de soja tiveram maior excreção urinária de creatinina, independentemente da duração do período de avaliação. O mesmo comportamento foi observado para concentração de creatinina no sangue, havendo significativo aumento (P<0,05), além da tendência de maior taxa de depuração da creatinina nas vacas da dieta contendo grão de soja (P=0,10). Variações entre os períodos experimentais e entre as vacas também foram significativas para concentração sanguínea de creatinina (P<0,05), além da tendência de efeito de período sobre a taxa de depuração desse metabólito (P=0,06).

Apesar dos efeitos significativos sobre a variação na excreção de creatinina, foi utilizado o valor médio diário de 20,33 mg/kg de PV obtido em 72 h de coletas totais como a constante para as estimativas de VU, de acordo com o princípio da técnica.

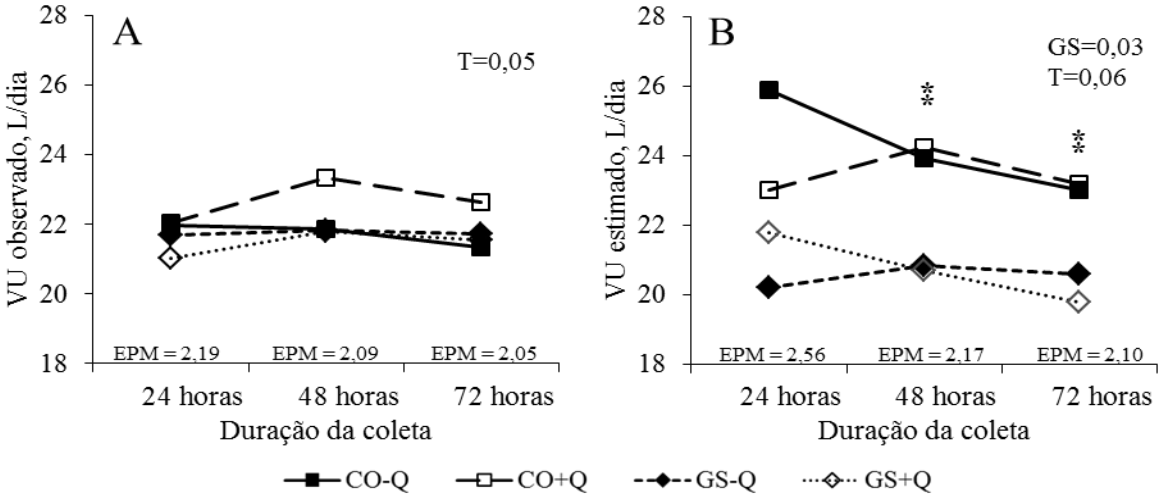
Tabela 4.1 – Efeito dos fatores experimentais sobre a excreção urinária de creatinina em 24, 48 e 72 h de coletas totais, concentração sanguínea e taxa de depuração da creatinina de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral (LSM; excreção de creatinina, n = 96; demais variáveis, n = 32[1])

	Controle[2]		Grão de soja[2]			*P*-valor[3]				
Item	- Q	+ Q	- Q	+ Q	EPM	Q	GS	Q×GS	P	V
Creat ur[4], mg/kg PV						0,49	0,01	0,77	<0,01	0,02
24 horas	17,1	18,6	20,7	20,5	1,22	0,59	0,03	0,59	0,03	0,18
48 horas	18,3	18,6	20,7	21,0	0,80	0,72	0,01	1,00	<0,01	0,02
72 horas	19,2	19,7	20,8	21,6	0,63	0,31	0,01	0,76	<0,01	<0,01
Creat sg[5], mg/dL	1,22	1,25	1,28	1,27	0,02	0,58	0,04	0,20	<0,01	<0,01
TD[6], mL/min/kg	1,12	1,11	1,17	1,23	0,05	0,62	0,10	0,55	0,06	0,20

[1] Médias expressas como *least squares means* (LSM), onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística.
[2] Dietas controle e grão de soja, sem (-Q) ou com (+Q) adição de quitosana.
[3] Q = efeito de quitosana; GS = efeito de grão de soja; Q×GS = efeito de interação entre quitosana e grão de soja; P = efeito de período; V = efeito de vaca. Probabilidades de erro tipo I.
[4] Excreção de creatinina na urina.
[5] Concentração de creatinina no sangue.
[6] Taxa de depuração da creatinina.

Não houve variação significativa no VU observado ao longo de 24, 48 e 72 h de coleta total entre as vacas em função das dietas experimentais recebidas (P>0,05; Figura 4.1). No entanto, devido a maior excreção de creatinina paras as vacas da dieta com grão de soja, consequentemente as estimativas apontaram para uma redução do VU nessas dietas, sendo significativa nos tempos de 48 e 72 h de duração (P<0,05; Figura 4.1).

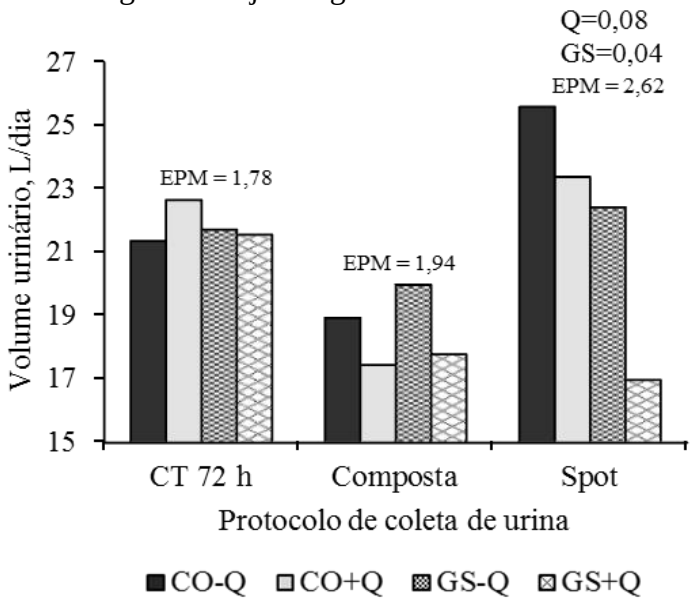
Figura 4.1 – Volumes urinários observados (A) e estimados (B) em 24, 48 e 72 h de coleta total de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral.



Fonte: Elaborado pelo autor. Médias expressas como *least squares means* (LSM) e n = 96, onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística. Dietas controle (CO) e grão de soja (GS), sem (-Q) ou com (+Q) adição de quitosana. Q = efeito de quitosana (∗); GS = efeito de grão de soja (⁑); Q×GS = efeito de interação entre quitosana e grão de soja (⁂); T = efeito de tempo de coleta. Apresentados *P*-valor ≤ 0,10.

Também houve mudanças no padrão de resposta de produção urinária para as diferentes dietas pelas estimativas das coletas pontuais de urina, composta ou *spot*, quando comparadas ao VU observado em 72 h de coleta total (Figura 4.2). Embora o VU estimado pelas coletas pontuais compostas não resultaram em diferenças entre as dietas (P>0,05), estando de acordo com os resultados observados na coleta total, houve significativa redução nas estimativas de VU para vacas consumindo dietas com grão de soja quando realizadas coletas pontuais *spot* (P<0,05). Adicionalmente, as coletas *spot* resultaram em grande variação no VU estimado entre os tratamentos, destacando a superestimativa para as vacas da dieta CO-Q e subestimativa para as da dieta GS+Q quando comparados aos valores reais.

Figura 4.2 – Efeito do tipo de protocolo de coleta de urina sobre os valores observados e estimados de volume urinário de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral.



Fonte: Elaborado pelo autor. n = 32, onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística. Dietas controle (CO) e grão de soja (GS), sem (-Q) ou com (+Q) adição de quitosana. Protocolos de coleta de urina com 72 h de coleta total (CT 72 h), coleta pontual a cada 9 h por 72 h (composta) e coleta pontual única (*spot*). Q = efeito de quitosana; GS = efeito de grão de soja; Q×GS = efeito de interação entre quitosana e grão de soja. Apresentados *P*-valor ≤ 0,10.

O aumento na duração do período de coleta total tendeu a aumentar a excreção de creatinina (P=0,06, Tabela 4.2). Do mesmo modo, o VU observado variou ao longo do tempo (P<0,05), no entanto as diferenças entre 24, 48 e 72 h de coleta total não foram apontadas pelos testes de comparação de médias utilizados (P>0,05). Nota-se maior amplitude de diferença entre valores de VU observado em 24 h com 48 h de coleta total. Em relação ao VU

estimado em amostras representativas da coleta total, houve tendência de efeito de tempo, com redução das estimativas à medida que aumentou o tempo de coleta de urina (P=0,06).

As diferenças ou vieses médios entre VU observado em 72 h de coleta total e estimados em coletas pontuais foram significativos somente para o protocolo de coleta pontual composta. Neste, apesar de não ter havido "falsas" diferenças de VU entre as dietas, o valor médio de VU foi subestimado (viés -3,23 L/dia; P<0,05). Contrariamente, apesar da coleta *spot* de urina ter apontado efeito de dieta quando o mesmo não ocorreu, o valor médio de VU estimado foi acurado em relação ao observado (viés 0,29 L/dia; P>0,05; Tabela 4.2).

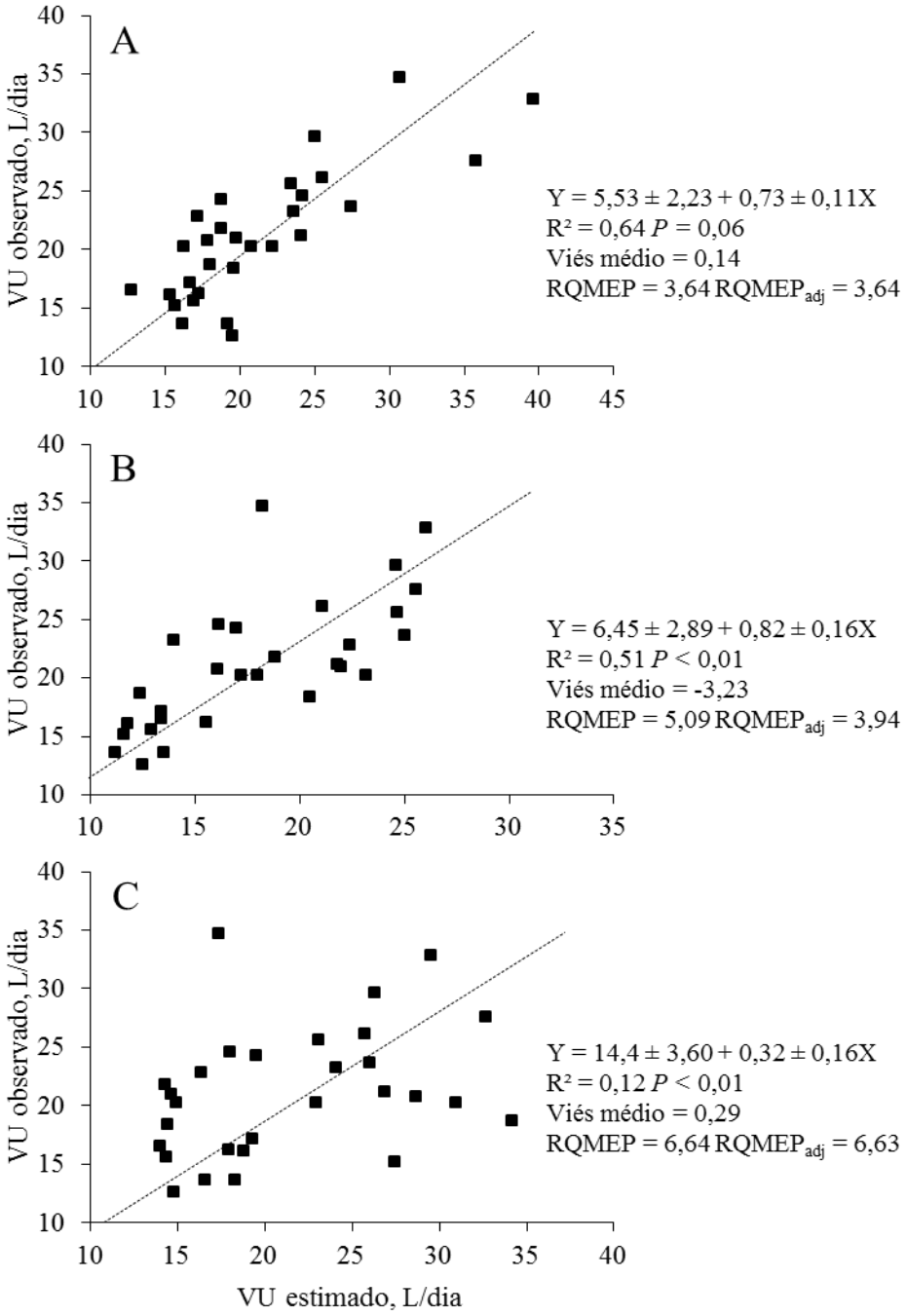
Tabela 4.2 – Efeitos da duração do período de coleta total de urina sobre a excreção de creatinina e volume urinário (VU) observado e estimado, e do tipo de protocolo de coleta sobre os valores observados e as estimativas de VU de vacas em lactação (LSM; n = 96[1])

				IC[3]	
Item	Média	EPM	*P*-valor[2]	<95%	>95%
Creatinina*, mg/kg de PV			0,06		
24 horas	19,2	0,58		18,0	20,4
48 horas	19,7	0,40		18,8	20,5
72 horas	20,3	0,32		19,7	21,0
24h vs. 72h[4]	-1,13	0,52	0,07	-2,35	0,09
48h vs. 72h[4]	-0,67	0,30	0,06	-1,36	0,02
VU observado, L/dia			0,05		
24 horas	21,7	2,19		17,0	26,4
48 horas	22,2	2,09		17,5	26,9
72 horas	21,8	2,05		17,1	26,5
24h vs. 72h[4]	-0,12	0,47	0,79	-1,02	0,95
48h vs. 72h[4]	0,40	0,26	0,13	-0,19	1,00
VU estimado, L/dia			0,06		
24 horas	23,0	2,56		18,5	27,5
48 horas	22,7	2,17		18,3	27,1
72 horas	21,9	2,10		17,5	26,3
24h vs. 72h[4]	1,08	0,77	0,17	-0,72	2,89
48h vs. 72h[4]	0,78	0,30	0,07	-0,02	1,47
VU protocolos, L/dia			<0,01		
Coleta total 72 h	21.8[A]	1,78		17,8	25,4
Coleta pontual composta	18.6[B]	1,94		14,4	22,1
Coleta pontual *spot*	22.1[A]	2,62		17,8	25,9
Composta vs. 72h[4]	-3,23	0,75	<0,01	-5,01	-1,55
Spot vs. 72h[4]	0,29	1,14	0,81	-2,38	2,91

[1] Médias expressas como *least squares means* (LSM), onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística.
[2] Efeito de tempo para duração do período de coletas totais de urina (24, 48 e 72 h) ou efeito de tipo de protocolo de coleta de urina (coleta total 72 h e coletas pontuais composta e *spot*).
[3] Intervalo de confiança (1 – α = 0,95), com os respectivos limites inferiores e superiores.
* Considerada a probabilidade de erro tipo I (para demais variáveis, erro tipo III).
[4] Comparações de médias pelo teste de Dunnett, considerando os valores de 72 h de coleta total como referência.
[A-B] Valores na mesma coluna com diferentes sobrescritos diferem (P<0,05) pelo teste de Tukey.

Os parâmetros de regressão entre VU observado e estimados se ajustaram as hipóteses estatísticas (β_0 = 0 e β_1 = 1) somente para amostras de coleta total (P>0,05), enquanto que para estimativas de coletas pontais foi rejeitada a hipótese de nulidade (P<0,05; Figura 4.3).

Figura 4.3 – Relação entre volume urinário (VU) observado em 72 h de coleta total e VU estimado com uso da creatinina em amostras de 72 de coleta total (A), amostras pontuais compostas (B) e pontuais *spot* (C) de vacas em lactação.

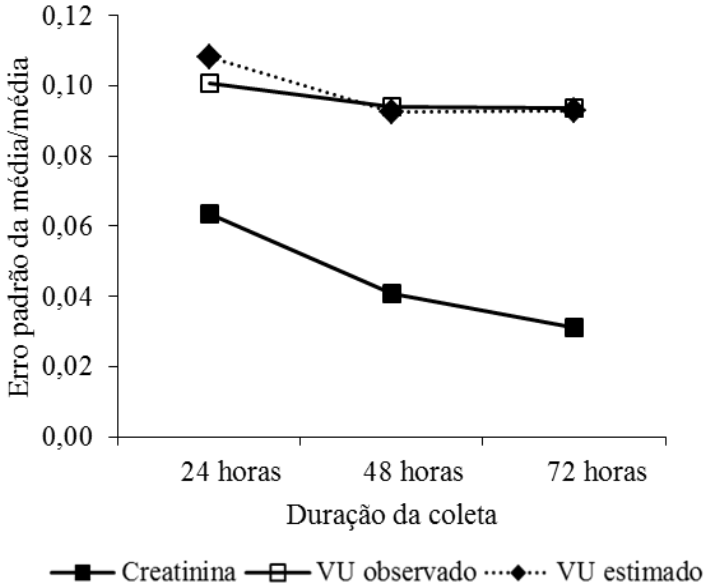


Fonte: Elaborado pelo autor. Y = X representa a equação de regressão ajustada; R^2 o coeficiente de determinação da equação; *P*-valor testa a hipótese de *slope* = 1 e intercepto = 0; RQMEP o erro de precisão da equação (raiz quadrada média do erro de predição); RQMEPadj o valor de RQMEP corrigido para falta de acurácia. n = 32, onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística.

Foram observadas relações moderadas entre VU observado e estimado em amostras de 72 h de coleta total (R^2 = 0,64) ou em amostras de coleta pontual composta (R^2 = 0,51), cujos erros de precisão da reta ajustada foram de 3,64 L/dia e 3,94 L/dia, respectivamente. No entanto, apesar de resultar em baixo viés médio, houve muito baixa relação entre VU observado e estimado em amostras de coleta pontual *spot* (R^2 = 0,12) devido à elevada variação das estimativas, evidenciada pelo valor de 6,63 L/dia para $RQMEP_{adj}$, que representa o erro residual ou a precisão da equação de predição.

À medida que aumentou a duração do período de coletas totais, de modo geral, aumentou a precisão das avaliações, principalmente para excreção de creatinina. Entretanto, essa variável foi a que apresentou menor erro como proporção da respectiva média comparativamente às demais avaliadas, mesmo no período de 24 h de coleta total, indicando ser menos sensível que os VU observado e estimado (Figura 4.4).

Figura 4.4 – Erro padrão da média como proporção da respectiva média para excreção de creatinina, volume urinário (VU) observado e estimado ao longo de 24, 48 e 72 h de coletas totais de urina de vacas em lactação.



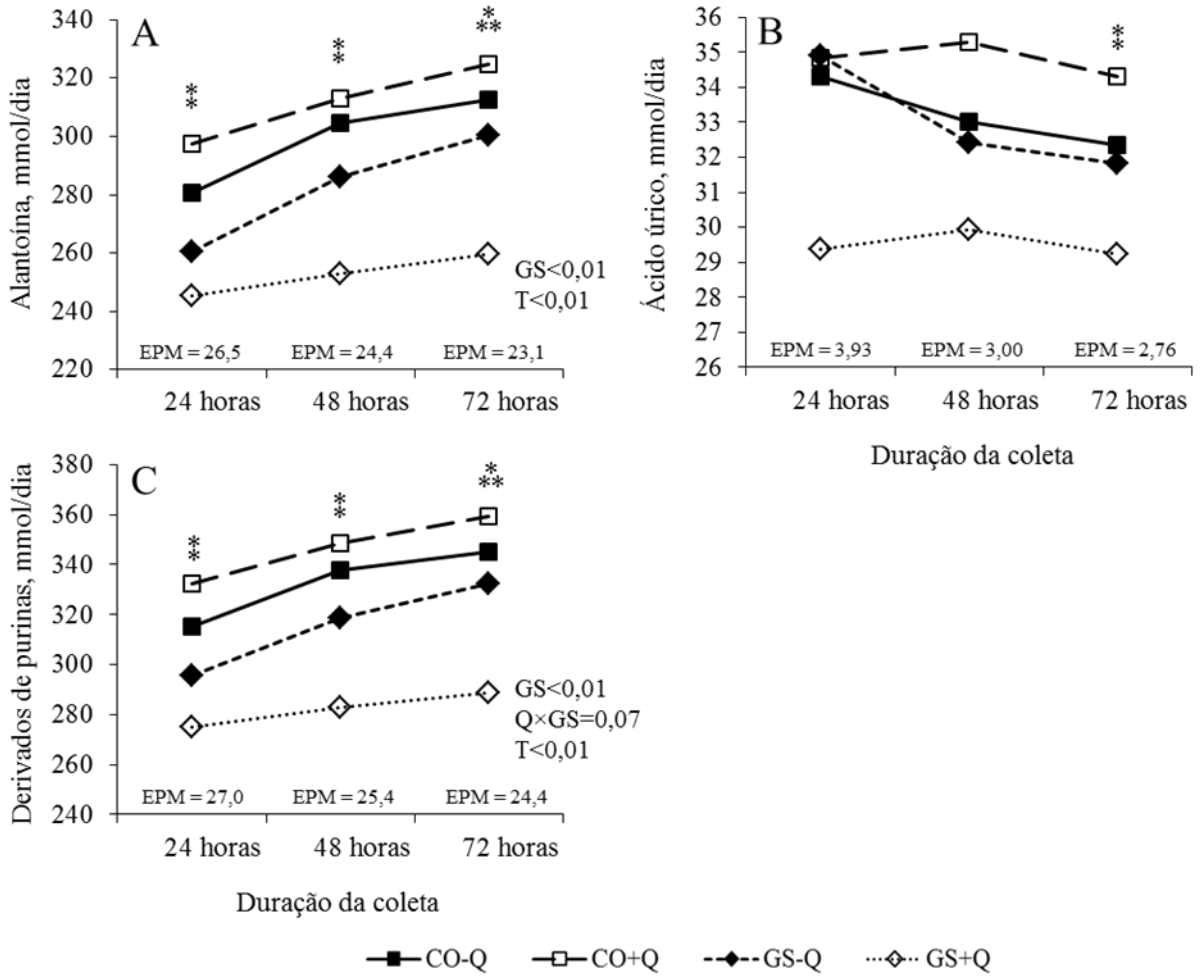
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.2 Estimativas de derivados de purinas

Embora não houve interação entre tempo e tratamentos dietéticos (P>0,05), a decomposição dos efeitos de dieta em cada tempo relevou mudanças para os valores observados de alantoína, ácido úrico e de somatório de ambos (derivados de purinas, DP) para

os tratamentos ao longo de 24, 48 e 72 h de coletas totais (Figura 4.5). Para excreção de alantoína e DP nos tempos de 24 e 48 h de coletas totais, foi observado efeito de grão de soja, com diminuição na concentração diária (P<0,05). No entanto, quando as coletas totais de urina tiveram duração de 72 h, foi observado que a redução de alantoína e DP foi significativa para as vacas do tratamento contendo a combinação entre quitosana e grão de soja (interação, P<0,05). De modo similar, a excreção de ácido úrico não foi alterada pelos tratamentos ao longo de 24 e 48 h de coletas totais (P>0,05), mas reduziu para as vacas consumindo dietas com grão de soja em 72 h (P<0,05).

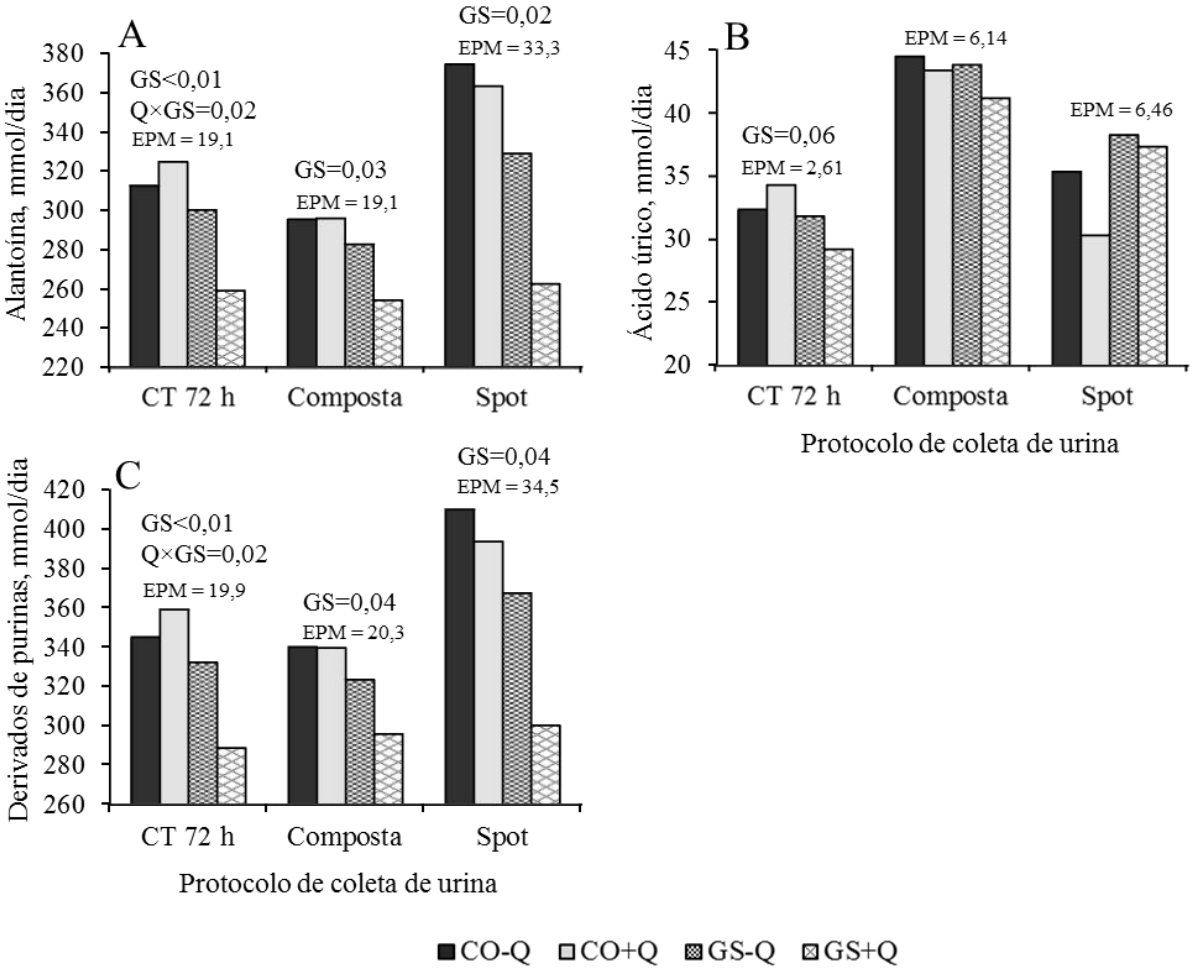
Figura 4.5 – Excreção de alantoína (A), ácido úrico (B) e derivados de purinas (C) em 24, 48 e 72 h de coletas totais de urina de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral.



Fonte: Elaborado pelo autor. Médias expressas como *least squares means* (LSM) e n = 96, onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística. Dietas controle (CO) e grão de soja (GS), sem (-Q) ou com (+Q) adição de quitosana. Q = efeito de quitosana (∗); GS = efeito de grão de soja (⁑); Q×GS = efeito de interação entre quitosana e grão de soja (⁂); T = efeito de tempo de coleta. Apresentados *P*-valor ≤ 0,10.

Com relação aos efeitos de dieta nos diferentes protocolos de coleta pontual de urina sobre as excreções de alantoína, ácido úrico e DP total, foi observada diferença no padrão de resposta quando comparados aos resultados de 72 h de coleta total (Figura 4.6). As estimativas de excreção de alantoína e DP foram menores nas vacas das dietas com grão de soja para ambos os protocolos de coleta pontual (P<0,05), enquanto que efeito de interação foi observado nas amostras de coleta total, com diminuição para o tratamento contendo quitosana e grão de soja (P<0,05). Não houve efeito de dieta para as estimativas de ácido úrico quando utilizadas coletas pontuais (P>0,05), porém os valores observados em 72 h de coleta total apresentaram tendência de redução para as vacas das dietas com grão de soja (P=0,06).

Figura 4.6 – Efeito do tipo de protocolo de coleta de urina sobre a excreção de alantoína (A), ácido úrico (B) e derivados de purinas (C) de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e grão de soja integral.



Fonte: Elaborado pelo autor. n = 32, onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística. Dietas controle (CO) e grão de soja (GS), sem (-Q) ou com (+Q) adição de quitosana. Protocolos de coleta de urina com 72 h de coleta total (CT 72 h), coleta pontual a cada 9 h por 72 h (composta) e coleta pontual única (*spot*). Q = efeito de quitosana; GS = efeito de grão de soja; Q×GS = efeito de interação entre quitosana e grão de soja. Apresentados *P*-valor ≤ 0,10.

Houve aumento na excreção média de alantoína e DP na urina com o aumento da duração do período de coletas totais, cujas médias gerais dos tratamentos observadas em 24, 48 e 72 h de coleta diferiram entre si (P<0,05; Tabela 4.3). Já para excreção de ácido úrico, a duração do período de coleta total de urina não influenciou os valores médios gerais observados (P>0,05).

Médias gerais das estimativas de excreção de alantoína, ácido úrico e DP diferiram entre os protocolos de coleta pontual de urina com relação às médias observadas em 72 h de coleta total (Tabela 4.3). Para alantoína, coletas pontuais compostas subestimaram a excreção (P<0,05), enquanto que coletas pontuais *spot* superestimaram o valor médio de alantoína (P<0,05). Para ácido úrico, coletas pontuais compostas superestimaram o valor médio excretado (P<0,05), contrário à estimativa de alantoína, e sem diferenças sobre a estimativa de ácido úrico em coletas pontuais *spot* com relação à coleta total (P>0,05). Como resultado do somatório de subestimativa de excreção média de alantoína e superestimativa de excreção média de ácido úrico, o protocolo de coleta pontual composta apresentou valor geral de DP semelhante ao observado nas amostras de coleta total de urina (P>0,05). Já a excreção média diária de DP obtida com coletas pontuais *spot* foi superestimada (P<0,05).

A relação entre as excreções urinárias de DP de coleta total e de coleta pontual composta, além de resultar em baixo viés médio (-6,58 mmol/dia), quando avaliada através da reta de regressão ajustada, foi observado que esta atendeu as hipóteses estatísticas testadas, com intercepto igual a 0 (β_0 = 0) e *slope* igual a 1 (β_1 = 1), ou seja, há relação linear significativa entre valores de DP observados com a coleta total e estimados com a coleta pontual composta (P>0,05; Figura 4.7). O coeficiente de determinação do modelo também indicou uma boa relação entre as variáveis (R^2 = 0,75), com erro de predição de 49,6 mmol/dia.

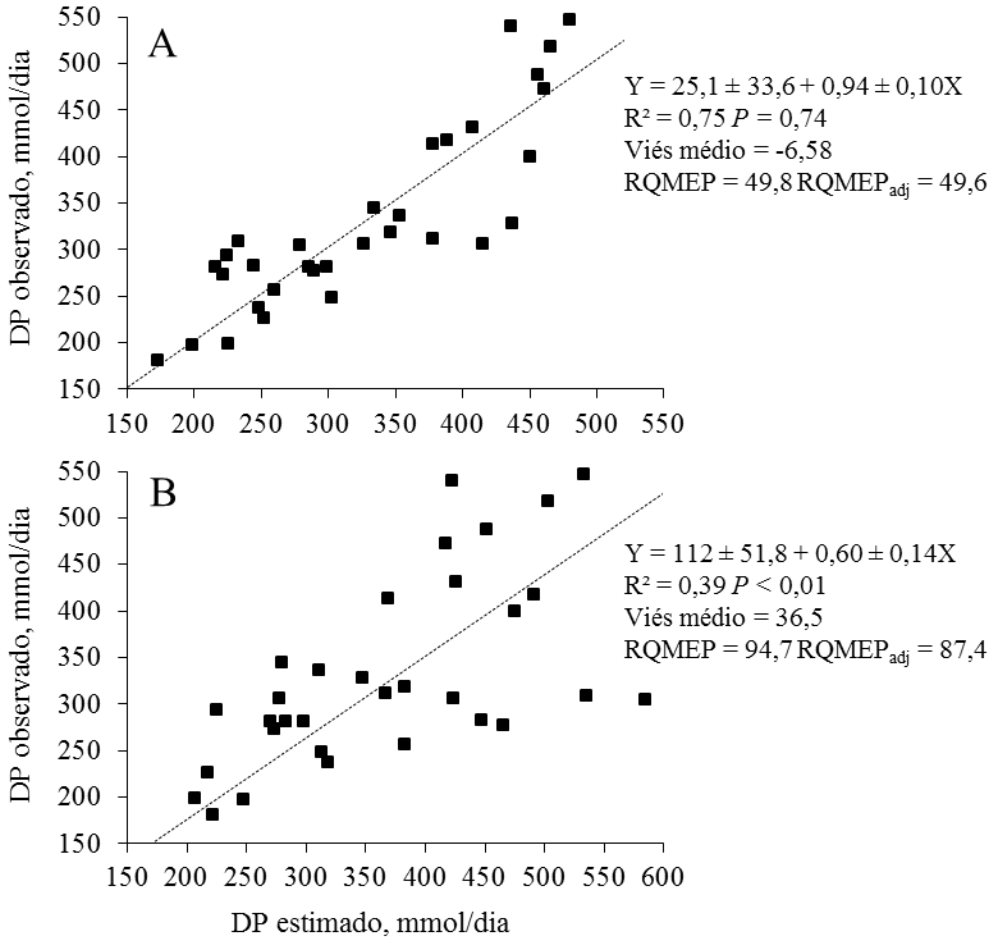
Já os parâmetros de regressão da reta ajustada entre DP da coleta total e da coleta pontual *spot* não atenderam a hipótese de nulidade (P<0,05). Do mesmo modo, o erro de predição foi elevado ($RQMEP_{adj}$ = 87,4 mmol/dia), o que resultou em um baixo valor de R^2 para a relação (0,39).

Tabela 4.3 – Efeitos da duração do período de coleta total e do tipo de protocolo de coleta de urina sobre a excreção de alantoína, ácido úrico e derivados de purinas totais de vacas em lactação (LSM; n = 96[1])

				IC[3]	
Item	Média	EPM	*P*-valor[2]	<95%	>95%
Alantoína, mmol/dia			<0,01		
24 horas	271[C]	22,0		217	325
48 horas	289[B]	21,4		235	344
72 horas	299[A]	21,0		245	353
24h vs. 72h[4]	-28,3	6,89	<0,01	-44,3	-12,3
48h vs. 72h[4]	-10,1	2,71	<0,01	-16,3	-3,77
Ácido úrico, mmol/dia			0,31		
24 horas	33,4	2,95		26,8	40,0
48 horas	32,7	2,67		26,3	39,0
72 horas	31,9	2,60		25,6	38,3
24h vs. 72h[4]	1,43	1,27	0,38	-1,44	4,31
48h vs. 72h[4]	0,74	0,47	0,19	-0,32	1,79
Derivados de purinas, mmol/dia			<0,01		
24 horas	304[C]	23,2		247	362
48 horas	322[B]	22,7		265	379
72 horas	331[A]	22,4		275	388
24h vs. 72h[4]	-26,9	6,74	<0,01	-42,5	-11,2
48h vs. 72h[4]	-9,32	2,65	<0,01	-15,5	-3,15
Alantoína, mmol/dia			<0,01		
Coleta total 72 h	299[B]	16,4		260	339
Coleta pontual composta	282[C]	16,4		243	322
Coleta pontual *spot*	332[A]	21,3		287	378
Composta vs. 72h[4]	-17,0	7,64	0,06	-34,7	0,71
Spot vs. 72h[4]	33,1	15,2	0,07	-2,16	68,3
Ácido úrico, mmol/dia			0,01		
Coleta total 72 h	31,9[B]	1,83		27,9	36,0
Coleta pontual composta	43,2[A]	3,33		36,5	49,9
Coleta pontual *spot*	35,3[B]	3,48		28,3	42,3
Composta vs. 72h[4]	11,3	3,80	0,01	2,65	19,9
Spot vs. 72h[4]	3,38	3,80	0,58	-5,24	12,0
Derivados de purinas, mmol/dia			0,05		
Coleta total 72 h	331[B]	16,6		292	371
Coleta pontual composta	325[B]	16,7		284	365
Coleta pontual *spot*	368[A]	21,7		322	414
Composta vs. 72h[4]	-6,58	9,39	0,73	-28,3	15,1
Spot vs. 72h[4]	36,5	16,7	0,07	-2,16	75,1

[1] Médias expressas como *least squares means* (LSM), onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística.
[2] Efeito de tempo para duração do período de coletas totais de urina (24, 48 e 72 h) ou efeito de tipo de protocolo de coleta de urina (coleta total 72 h e coletas pontuais composta e *spot*).
[3] Intervalo de confiança ($1 - \alpha = 0,95$), com os respectivos limites inferiores e superiores.
[4] Comparações de médias pelo teste de Dunnett, considerando os valores de 72 h de coleta total como referência.
[A-C] Valores na mesma coluna com diferentes sobrescritos diferem (P<0,05) pelo teste de Tukey.

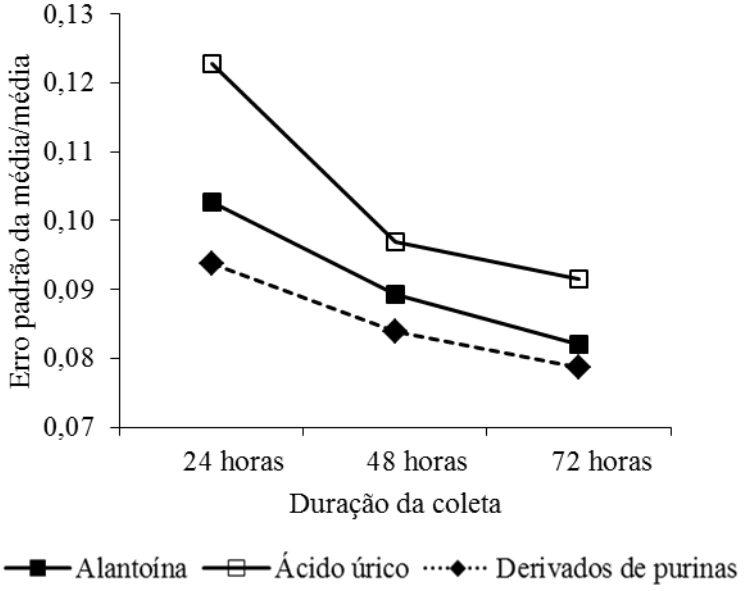
Figura 4.7 – Relação entre excreção urinária de derivados de purinas (DP) observados em 72 h de coleta total e estimados com uso da creatinina como indicador do volume urinário em amostras de coletas pontuais, composta (A) e *spot* (B), de vacas em lactação.



Fonte: Elaborado pelo autor. Y = X representa a equação de regressão ajustada; R^2 o coeficiente de determinação da equação; *P*-valor testa a hipótese de *slope* = 1 e intercepto = 0; RQMEP o erro de precisão da equação (raiz quadrada média do erro de predição); RQMEPadj o valor de RQMEP corrigido para falta de acurácia. n = 32, onde n representa o número de observações utilizadas na análise estatística.

A precisão das avaliações de excreção urinária de alantoína, ácido úrico e DP foi aumentada à medida que aumentou a duração do período de coletas totais, pois foi observada menor razão entre erro padrão da média/média para as variáveis (Figura 4.8). O aumento foi mais expressivo quando a duração das coletas totais passou de 24 h para 48 h, se comparada à melhoria da precisão entre 48 h e 72 h, especialmente para excreção de ácido úrico. Essa mesma variável foi a que apresentou uma maior variação ao longo dos tempos.

Figura 4.8 – Erro padrão da média como proporção da respectiva média para excreção de alantoína, ácido úrico e derivados de purinas ao longo de 24, 48 e 72 h de coletas totais de urina de vacas em lactação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 DISCUSSÃO

O uso da creatinina como indicador interno da produção urinária baseia-se no pressuposto de que sua excreção na urina não é afetada pela dieta, nem pelo estado fisiológico dos animais, sendo constante como proporção do peso corporal (CHEN et al., 1995). No entanto, diferenças entre dietas, períodos experimentais e vacas foram encontradas no presente estudo, contrariando o princípio da técnica. Variações na excreção urinária de creatinina, proporcional ao peso ou em g/dia, de acordo com a dieta ou nível de consumo em bovinos já haviam sido reportadas anteriormente (ØRSKOV e McLEOD; 1982; GONDA et al., 1996; VALADARES et al., 1999; WHITTET et al., 2004; GEHMAN e KONONOFF, 2010). Em alguns desses estudos, a influência da dieta sobre a excreção de creatinina foi relacionada ao metabolismo proteico.

A creatinina é um resíduo orgânico formado da reação de desidratação da creatina e fosfato de creatina (creatina fosforilada) corporal a partir do metabolismo muscular, cujo tecido representa mais de 94% do estoque desses compostos no organismo (WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000). Sendo assim, a produção de creatinina é correlacionada às concentrações celulares de creatina e fosfato de creatina, além da massa muscular total (BORSOOK e DUBNOFF, 1947).

Arginina, glicina e metionina são os aminoácidos precursores da síntese de creatina, cuja principal rota de biossíntese e amplamente aceita em mamíferos envolve reações catalisadas no fígado, rins e pâncreas, embora haja informações de que também ocorra síntese no músculo esquelético (WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000). Atividade de enzimas responsáveis pela síntese de creatina foram detectadas no tecido muscular de ovinos (XUE et al., 1988), o que evidencia a possibilidade de outros tecidos corporais não comumente relacionados à síntese terem participação nesse processo, incluindo consideráveis diferenças entre espécies (WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000). Entretanto, independentemente de onde ocorra a síntese de creatina, como este processo é dependente, dentre outros fatores, da disponibilidade de aminoácidos precursores, o menor aporte dos mesmos no organismo pode resultar em diminuição da síntese de creatina. Uma vez que a formação de creatinina a partir de creatina é um processo não enzimático, espontâneo, irreversível e ocorre em uma taxa relativamente constante, em torno de 1,7%/dia em relação ao *pool* total de creatina (WALKER, 1979), a diminuição da síntese de creatina implicaria em diminuição da excreção de creatinina. Partindo desse pressuposto, um inadequado suprimento de N dietético aos animais também poderia resultar na concomitante redução da excreção de creatinina urinária.

Apesar de alguns estudos já terem avaliado diferentes níveis proteicos nas dietas de vacas leiteiras sobre a excreção de creatinina (ØRSKOV e McLEOD; 1982; GONDA e LINDBERG, 1994; SILVA et al., 2001), estudos relacionando a excreção da mesma com a inclusão lipídica não foram encontrados, até mesmo em outras espécies de ruminantes. Também não são encontradas evidências de que os lipídios alteram diretamente as rotas metabólicas de síntese de creatina e excreção de creatinina. Sendo assim, é provável que o uso de grão de soja nas dietas tenha afetado indiretamente o metabolismo da creatinina.

Aumento do *turnover* proteico muscular já foi relacionado ao aumento da excreção de creatinina em estudo com vacas em lactação (LAMP et al., 2015) e caprinos em crescimento (TURNER et al., 2005). Conforme resultados apresentados no Capítulo 2, vacas alimentadas com dietas contendo grão de soja apresentaram diminuição na digestibilidade aparente total da PB, com menores níveis de N amoniacal no rúmen e N ureico no sangue. Adicionalmente, essas vacas tiveram redução da glicemia e houve tendência de redução dos níveis de proteínas totais circulantes, o qual foi hipoteticamente associado à possível demanda de aminoácidos extradietéticos para manutenção da gliconeogênese hepática e síntese de proteínas do leite. Deste modo, é possível que a renovação da proteína corporal pelos processos de síntese e degradação tenha sido maior nas vacas consumindo grão de soja, o que poderia explicar o aumento da excreção de creatinina urinária.

Também há possibilidade de que as dietas sem inclusão de grão de soja tenham reduzido a disponibilidade dos aminoácidos essenciais arginina e metionina para a síntese de creatina e posterior conversão em creatinina, em função do aumento da demanda destes para outros processos metabólicos. Dentre os processos que tem a capacidade de reduzir a concentração plasmática de aminoácidos essenciais, destacam-se o ciclo da ureia e a gliconeogênese hepática, além da síntese de proteínas no leite (KOZLOSKI, 2011). Novamente, como as vacas das dietas sem grão de soja apresentaram maiores concentrações de N ureico e glicose no sangue, é provável que houve maior utilização de aminoácidos essenciais precursores de creatina no ciclo da ureia e na gliconeogênese.

No entanto, essas suposições carecem de mais estudos para melhor compreensão de como as dietas e seus nutrientes, além de diferenças nas condições fisiológicas dos animais, podem influenciar o metabolismo da creatina e creatinina. Em detalhada revisão sobre o assunto, Wyss e Kaddurah-Daouk (2000) destacaram que a creatinina em mamíferos ainda é amplamente considerada como sendo uma substância inerte que é excretada como tal na urina, sendo que existem evidências que contradizem este ponto de vista. Tais evidências envolvem alterações na síntese e degradação da creatinina, as quais incluem: a reversibilidade da reação de ciclização da creatina em creatinina (LEMPERT, 1959); aumento da conversão de fosfato de creatina em creatinina por hidrólise mediada pelas condições de temperatura, pH e concentração de molibdênio no organismo (MORRISON e ENNOR, 1960); e significativa conversão enzimática de fosfato de creatina em creatinina pela enzima fosforilcreatininase (IYENGAR et al., 1985). Adicionalmente, outros processos fisiológicos mais comuns podem estar associados às mudanças na excreção final de creatinina urinária, como: aumento da síntese e deposição muscular de creatina e fosfocreatina (GREEN et al., 1996); variações na taxa de filtração glomerular e excreção urinária (CHEN et al., 2004); aumento da mobilização de tecido muscular e *turnover* proteico (TURNER et al., 2005); patologias específicas (WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000; CHEN et al., 2004); e variação nas características genéticas e fisiológicas individuais (BARR et al., 2005; TAS e SUSENBETH, 2007).

Kozloski et al. (2005) não observaram efeito de dieta ao analisar dados de quatro experimentos com ovinos sobre a excreção de creatinina como proporção do peso vivo, mas observaram significativa variação entre os experimentos. Embora a condição corporal dos animais não foi avaliada, os autores ressaltam que é pouco provável que as dietas tenham determinado mudanças nessa variável dentro de cada experimento devido a curta duração dos períodos experimentais. Por outro lado, variações no consumo e na qualidade média das dietas entre os experimentos pode ter influenciado significativamente esta variável.

Rennó et al. (2000) avaliaram resultados de quatro experimentos com novilhos e observaram que a excreção de creatinina não foi afetada pelo teor de proteína bruta das dietas e foi semelhante entre animais de um mesmo experimento, no entanto, a excreção entre experimentos variou consideravelmente de 17 até 37 mg/kg de PV.

Variações significativas sobre a excreção de creatinina entre animais de um mesmo experimento já foram reportadas (CHEN et al., 1995; SHINGFIEL e OFFER, 1998; DAPOZA et al., 1999; LIU e McMENIMAN, 2006), corroborando com os resultados observados no presente estudo. Segundo revisão de Tas e Susenbeth (2007), a variação entre animais é responsável pela maior parte da variação total observada para excreção de creatinina nos estudos, estando associada às diferenças nas condições fisiológicas individuais.

Níveis de 20 a 30 mg/kg de PV são comumente encontrados para excreção de creatinina em vacas leiteiras, cuja variação é dependente da composição corporal (ØRSKOV e McLEOD; 1982), uma vez que animais com diferentes proporções de músculo e gordura podem excretar diferentes quantidades de creatinina por unidade de peso vivo (CHEN et al., 2004). Normalmente animais jovens e em crescimento excretam mais creatinina por unidade de peso do que vacas adultas e em lactação, as quais tem menor proporção de músculo (CHIZZOTTI et al., 2008). No entanto, no caso de vacas leiteiras, consideráveis variações podem ocorrer ao longo do ciclo produtivo devido suas drásticas alterações, destacando os eventos fisiológicos associados ao terço inicial da lactação, como balanço energético negativo e mobilização de reservas corporais. A menor quantidade de massa muscular foi associada à menor excreção de creatinina em vacas (SUSMEL et al., 1995) e ovelhas (DAPOZA et al., 1999) no início da lactação.

No presente estudo, as vacas apresentavam 144 ± 39,7 dias em lactação de média ao início do experimento, ou seja, já haviam passado do terço inicial. Porém o valor médio diário de excreção de creatinina foi de 20,3 mg/kg de PV, que embora está dentro da margem de variação normal, ficou abaixo dos valores encontrados para vacas em lactação por Valadares et al. (1999), Silva et al (2001), Whittet (2004) e Chizzotti et al. (2008), sendo de 29,0, 23,6, 27,5 e 24,1 mg/kg de PV, respectivamente. A condição corporal das vacas foi avaliada ao início e término de cada período experimental, cujos animais eram classificados numa escala de 1 a 5, segundo metodologia proposta por Edmonson et al. (1989). Não foram observadas variações significativas entre dietas e períodos para condição corporal (dados não apresentados) e a média de escore ao longo do experimento foi de 2,41 ± 0,12, evidenciando a baixa proporção muscular das vacas, o que justifica os menores valores obtidos para excreção média de creatinina.

Conforme relatado, não houve significativa variação na condição corporal das vacas entre os períodos experimentais, visto que estes tinham intervalos de duração de 23 dias, relativamente curtos para detectar diferenças para esse tipo de variável. No entanto, o efeito de período foi significativo para excreção urinária de creatinina. Dentre as variáveis nutricionais avaliadas e que sofreram mudanças ao longo dos períodos, a produção de leite diminuiu linearmente em função da curva de lactação, o que pode estar relacionado à mudança na excreção de creatinina. Contudo Chizzotti et al. (2008) não observaram efeito do nível de produção de leite das vacas sobre a excreção de creatinina como proporção do peso.

Como resultado do somatório de efeitos das condições experimentais sobre a variação na excreção da creatinina, consequentemente houve mudanças nas estimativas de VU. Enquanto que a produção urinária observada entre os tratamentos dietéticos não diferiu ao longo dos períodos de duração de coleta total, enviesadas estimativas com uso da creatinina em amostras representativas apontaram “falso” efeito do grão de soja para diminuição do VU. Ao ser adotado um único valor médio de excreção, este não representou a real condição de todas as vacas, subestimando o VU para aquelas consumindo dietas com grão de soja e superestimando o VU das vacas alimentadas com dietas controle. Essa mesma limitação foi relatada por Tas e Susenbeth (2007), que ao analisarem dados de literatura sobre o comportamento da creatinina concluíram que a mesma não apresentou constância de excreção na maioria dos estudos, com substancial variação entre animais, resultando em erros sobre as predições de VU e excreção total de DP ou alantoína em ruminantes.

Apesar da mudança na resposta dos tratamentos, foi observado que a variação das estimativas ficou em torno dos reais valores observados, cujo somatório de vieses positivos e negativos resultou em uma média geral de VU estimado bastante acurada (viés médio = 0,14 L/dia). Em termos práticos, a creatinina foi capaz de predizer com exatidão o VU médio das vacas do experimento, mas sua predição foi falha em demonstrar a real ausência de efeitos dietéticos sobre essa variável em virtude da variação das estimativas. Isso pode ser demonstrado através do erro de precisão da equação, com valor de 3,64 L/dia, um valor elevado se comparado ao viés médio que foi muito próximo de zero. Do mesmo modo, o coeficiente de determinação da regressão ajustada ficou abaixo do esperado, indicando que da variação total do VU observado, somente 64% foi explicada pela variação do VU estimado.

Quando as estimativas de VU foram geradas a partir de coletas pontuais de urina, houve diferenças de resultados entre ambas e também destas com os valores reais obtidos com a coleta total. Coletas pontuais compostas, que foram realizadas a cada 9 h de um total de 72 h, resultaram em ausência de efeito de dieta sobre as estimativas de VU, sendo semelhante à

coleta total, no entanto os valores foram subestimados, evidenciando a falta de acurácia dos resultados com uso desse tipo de protocolo. Coletas pontuais *spot*, realizadas em um único dia e horário de cada período experimental, apesar de apresentarem estimativas exatas, as mesmas foram muito pouco precisas, com grande variação entre tratamentos e indicando que o resultado acurado é devido ao somatório de grandes desvios que se equivaleu à zero. Adicionalmente, ambas as estimativas de VU dos protocolos de coletas pontuais não tiveram relação linear com os valores reais da coleta total.

Como os protocolos de coleta pontual de urina diferiam entre si, é possível que a excreção e creatinina variou ao longo do dia. Escobar et al., (2010) realizaram coletas totais de urina em vacas leiteiras por um período de sete dias e obtiveram subamostras em cinco intervalos diários, que foram analisadas quanto às concentrações de creatinina. Não foi observado efeito de duração de dias de coleta de urina, no entanto houve efeito de tempo ao longo do dia sobre a excreção de creatinina urinária, com maior excreção durante a noite. Significativas variações para excreção de creatinina ao longo do dia também foram observadas em outros estudos com bovinos (GONDA e LINDBERG, 1994; SHINGFIEL e OFFER, 1998) e ovinos (KOZLOSKI et al., 2005; LIU e McMENIMAN, 2006).

Uma vez que as taxas de filtração glomerular e de produção de urina variam (CHEN et al., 2004; BARR et al., 2005), pode haver variação nas concentrações de creatinina na urina ao longo do dia. Conforme observado no presente estudo, a taxa de depuração da creatinina apresentou tendência de variação entre período e dietas, cuja variação pode ter ocorrido também ao longo do dia. Essa hipótese explicaria as diferenças nas estimativas das coletas pontuais em relação aos resultados reais ou estimados a partir de amostras representativas da coleta total. Partindo do mesmo pressuposto de que a taxa de filtração glomerular não é constante em um período de 24 h, Kozloski et al. (2005) ressaltaram a necessidade das amostras pontuais de urina serem coletadas em diferentes horários para constituir uma amostra composta representativa. Porém, mesmo com a utilização de um protocolo de coletas pontuais a cada 9 horas por 72 h, que num período de 24 h representaria coletas a cada 3 h e possivelmente abrangeria a variação diária na excreção de creatinina, as estimativas não se aproximaram dos valores observados para VU.

Além da possível variação diária na excreção de creatinina, foi observada tendência de aumento na excreção à medida que aumentou a duração do período de coleta total. De modo similar, a produção urinária foi variável ao longo de 24, 48 e 72 h de coletas totais. Quando quantificada a excreção de alantoína na urina ou o total de derivados de purinas, foi observado que estes também não atingiram constância de excreção. Adicionalmente, os efeitos de dieta

sobre a excreção de alantoína e ácido úrico diferiram dependendo da duração do período de avaliação. Tais resultados evidenciam que variáveis de excreção urinária são mais susceptíveis a erros de avaliação em ensaios de curta duração. E embora a precisão dessas avaliações, medidas através da razão entre erro padrão da média pela respectiva média das variáveis, melhorou com o aumento do período de coleta total, ainda assim os valores para volume urinário e os derivados de purinas foram consideravelmente superiores aos obtidos para variáveis de excreção fecal, conforme resultados apresentados na Seção 3.

Resultados semelhantes foram observados por Farenzena et al. (2016) ao avaliarem o comprimento mínimo do período de coleta para obtenção de valores com máxima precisão para variáveis de excreção fecal e urinária em ovinos alimentados *ad libitum*. Em geral, os valores mais altos foram obtidos para variáveis de excreção urinária, cujo erro atingiu um platô somente após sete dias de coletas. Os autores ainda destacam que mesmo em ensaios de nove dias de coletas totais de urina, variáveis como alantoína e excreção de N não apresentaram adequada precisão se comparados às variáveis de excreção fecal.

Contraponto os resultados obtidos de variação na excreção de DP ao longo do período de coleta total, Barbosa et al. (2006) não observaram diferenças em bovinos de corte de diferentes categorias ao longo de seis dias de avaliação. Além disso, a produção microbiana ruminal estimada pela amostra *spot* de urina não diferiu daquela obtida pela coleta total, concluindo que períodos de coleta de urina de 24 h são suficientes para experimentos utilizando novilhas, machos castrados ou não castrados, ou vacas da raça Nelore, e que a coleta de amostra *spot* de urina também pode ser usada para estimar a produção de Nmic. Da mesma forma, Valadares et al. (1999) e Chizzotti et al. (2008) observaram similaridade entre valores observados e estimados de excreção diária total de DP com uso de amostragem *spot*, coletada 4 horas após a alimentação em vacas leiteiras.

Vale ressaltar que nesses estudos a excreção de creatinina apresentou constância ao longo do período de avaliação e não foi afetada pelas características experimentais, diferente do observado no presente trabalho. Neste, os parâmetros de regressão entre DP observados com a coleta total e DP estimados com a coleta pontual *spot* não se ajustaram as hipóteses estatísticas avaliadas, logo a relação entre ambos não foi significativa. Já para a reta ajustada entre DP observado e DP estimado com coleta pontual composta, a hipótese de nulidade foi aceita, ou seja, intercepto = 0 e *slope* = 1, indicando relação de variáveis. Entretanto, as médias estimadas de excreção total de DP para as dietas diferiram dos resultados observados em 72 h de coletas totais para ambos os protocolos de coleta pontual, o que implica em mudanças na interpretação dos efeitos de tratamento.

Apesar de que o somatório da concentração total de alantoína e ácido úrico foi similar entre amostra pontual composta e coleta total, individualmente foi observado que a alantoína foi subestimada e o ácido úrico superestimado se comparado aos valores reais. Ainda, considerando que o VU para coletas pontuais compostas também havia sido subestimado, e que a excreção de DP nesse protocolo foi calculada a partir desse menor valor, significa que a concentração de DP das amostras de coleta pontual foi superior às amostras de coleta total.

Para animais alimentados *ad libitum* o fornecimento de proteína microbiana no duodeno tem períodos de pico que são dependentes dos períodos de refeição, cujo tamanho de cada pico é proporcional ao tamanho da refeição (NSAHLAI et al., 2000). Consequentemente, a excreção de DP na urina sofre variação ao longo do dia. Embora o protocolo de coleta pontual composta compreendeu vários intervalos de amostragem, é possível que a maioria desses coincidiu com os horários de pico de excreção de DP urinário, que por consequência igualou as estimativas aos valores reais observados.

Deficiências nas estimativas de excreção total de DP a partir do uso de coletas pontuais de urina também foram observadas em outros estudos com bovinos de corte (GEORGE et al., 2006) e cabras em lactação (PEREIRA et al., 2010). Para George et al. (2006), a técnica de amostragem pontual de urina não foi adequada para detectar pequenas diferenças no suprimento de Nmic e assim concluem que a coleta total de urina é necessária para a predição precisa dessa variável nos estudos (GEORGE et al., 2006). Pereira et al. (2010) observaram que além de diferenças nas estimativas de excreção de DP para médias gerais e médias de tratamentos com uso de coletas pontuais, as proporções de alantoína, ácido úrico e xantina-hipoxantina excretadas diferiram com relação à coleta total. Este mesmo comportamento foi observado no presente estudo.

4.7 CONCLUSÕES

A creatinina não se comportou como um bom indicador do volume urinário, cuja excreção por unidade de peso vivo foi influenciada pela dieta e variável entre períodos experimentais e animais. Apesar da relação significativa entre excreção total de derivados de purinas observada e estimada com coletas pontuais de urina a cada 9 h por 72 h, essa deve ser vista com cautela, em razão de que o volume urinário foi subestimado e que este protocolo de coleta não foi preciso para apontar corretas diferenças entre os tratamentos, comprometendo assim as avaliações sobre a produção microbiana ruminal.

4.8 LITERATURA CITADA

AHVENJÄRVI, S.; VANHATALO, A.; HUHTANEN, P. Supplementing barley or rapeseed meal to dairy cows fed grass-red clover silage: I. Rumen degradability and microbial flow. **Journal of Animal Science**., v. 80, p. 2176-2187, 2002.

BARBOSA, A. M.; VALADARES, R. F. D.; VALADARES FILHO, S. C.; VÉRAS, R. M. L.; LEÃO, M. I.; DETMANN, E.; PAULINO, M. F.; MARCONDES, M. I.; SOUZA, M. A. Efeito do período de coleta de urina, dos níveis de concentrado e de fontes proteicas sobre a excreção de creatinina, de ureia e de derivados de purinas e a produção microbiana em bovinos Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 3, p. 870-877, 2006.

BARR, D. B.; WILDER, L. C.; CAUDILL, S. P. et al. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements, **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 2, p. 192-200, 2005.

BORSOOK, H.; DUBNOFF, J. W.The hydrolysis of phosphocreatine and the origin of urinary creatinine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 168, p. 493-510, 1947.

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of technical details. (Occasional publication) **International Feed Research Unit**, Bucksburnd, Aberdeen: Rowett Research Institute. 21p. 1992.

CHEN, X. B.; JAYASURIYA, M. C. N.; MAKKAR, H. P. S. **Measurement and application of purine derivatives:creatinine ratio in spot urine samples of ruminants**. In: Makkar, H.P.S., Chen, X.B. (Eds.), Estimation of Microbial Protein Supply in Ruminants Using Urinary Purine Derivatives. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, p. 167–179, 2004.

CHEN, X. B.; SUSMEL, P.; STEFANON, B.; ØRSKOV, E. R. On the use of purine derivatives in spot urine, plasma and milk samples as indicators of microbial protein supply in sheep and cattle. **Proceedings of the VII symposium on protein metabolism and nutrition**, p. 325-329, 1995.

CHIZZOTTI, M. L.; VALADARES FILHO, S. C.; VALADARES, R. F. D.; CHIZZOTTI, F. H. M.; TEDESCHI, L. O. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. **Livestock Production Science**, v. 113.p. 218-225, 2008.

CLARK, J. H.; KLUSMEYER, T. H.; CAMERON, M. R. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions of the duodenum of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2304-2323, 1992.

DAPOZA, C.; CASTRILLO, C.; BALCELLS, J.; MARTIN-ORUE, S.; GUADA, J.A.On the variation of urinary excretion of creatinine and purine derivatives in pregnant and lactating ewes given diets with different protein contents. **The Journal of Agricultural Science**, v.68(3), p. 555-556, 1999.

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

ESCOBAR, L. P.; BOLÍVAR, D. M. V.; ESPINOZA, D. G. Uso de laexcreción de creatinina como método alternativo a lacolecta total de orinaen vacas Holstein. **Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín**, v. 63 p. 5567-5576, 2010.

FARENZENA, R.; KOZLOSKI, G. V.; GINDRI, M.; STEFANELLO, S. Minimum length of the adaptation and collection period in digestibility trials with sheep fed *ad libitum* only forage or forage plus concentrate. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 10, p. 01-10, 2016.

FUJIHARA, T.; ØRSKOV, E. R.; REEDS, P. J.The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. **The Journal of Agricultural Science**, v. 109, p. 7-12, 1987.

GEHMAN, A. M.; KONONOFF, P. J. Nitrogen utilization, nutrient digestibility, and excretion of purine derivatives in dairy cattle consuming rations containing corn milling co-products. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 3641-3651, 2010.

GEORGE, S. K.; DIPU, M. T.; MEHRA, H. R.; VERMA, A. K. SINGH, P. Influence of level of feed intake on concentration of purine derivatives in urinary *spot* samples and microbial nitrogen supply in crossbred bulls. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 19, n. 9, p. 1291-1297, 2006.

GONDA, H. L.; EMANUELSON, M.; MURPHY, M.The effect of roughage to concentrate ratio in the diet on nitrogen and purine metabolism in dairy cows. **Animal Feed Science Technology**, v. 64, p. 27-42, 1996.

GONDA, H. L.; LINDBERG, J. E. Evaluation of dietary nitrogen utilization in dairy cows based on urea concentrations in blood, urine and milk, and on urinary concentrations of purine derivatives. **Acta Agricultae Scandinavia**, Section A, Animal Science, v. 44, p. 236-245, 1994.

GONZÁLEZ-RONQUILLO, M.; BALCELLS, J.; BELENGUER, A.; CASTRILLO, C.; MOTA, M.A comparison of purine derivatives excretion with conventional methods as indices of microbial yield in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 2211–2221, 2004.

GONZÁLEZ-RONQUILLO, M.; BALCELLS, J.; GUADA, J.A.; VICENTE, F. Purine derivative excretion in dairy cows: endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic acid supply. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1282–1291, 2003.

GREEN, A. L.; SIMPSON, E.; LITTLEWOOD, J; McDONALD, I; GREENHAFF, P. L. Carbohydrate ingestion augments skeletal muscle creatine accumulation during creatine supplementation in man. **American Journal of Physiology**, v. 271, p. E821-E826, 1996.

HARPER, H. A.; RODWELL, V. W.; MAYES, P. A. **Manual de Química Fisiológica**, 5th ed. São Paulo, Brasil. 1982.

IYENGAR, M. R.; COLEMAN, D. W.; BUTLER, T. M. Phosphocreatinine, a high-energy phosphate in muscle, spontaneously forms phosphocreatine and creatinine under physiological conditions. **The Journal of Biological Chemistry**, v.260, p. 7562-7567, 1985.

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes**. 3.ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2011. 214p.

KOZLOSKI, G.V.; FIORENTINI, G.; HÄRTER, C. J.; BONNECARRÈRE SANCHEZ, L. M. Uso de creatinina como indicador da excreção urinária em ovinos. **Ciência Rural**, v. 35, p. 98-102, 2005.

KURIEN, B. T; EVERDS, N. E.; SCOFIELD, R. H. Experimental animal urine collection: a review. **Laboratory Animals**, v.38, p. 333-361, 2004.

LAMP, O.; DERNO, M.; OTTEN, W.; MIELENZ, M.; NÜRNBERG, G.; KUHLA, B. Metabolic heat stress adaption in transition cows: Differences in macronutrient oxidation between late-gestating and early-lactating German Holstein dairy cows. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 01-24, 2015.

LEMPERT, C. The chemistry of the glycocyamidines. **Chemical Reviews**, v.59, p. 667-736, 1959.

LIU, Z. J.; McMENIMAN, N. P. Effect of nutrition level and diets on creatinine excretion by sheep. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 265-273, 2006.

MAYER, D. G.; STUART, M. A.; SWAIN, A. J. Regression of real-world data on model output: an appropriate overall test of validity. **Agricultural Systems**, v. 45, p. 93-104, 1994.

MORRISON, J. F.; ENNOR, A. H. N-phosphorylated guanidines. In: **The Enzymes** (2ed.), ed. BOYER, P.D.; LARDY, H; MYRBA, K. New York: Academic, p. 89-109, 1960.

NSAHLAI, I.V. et al. Effect of form and of quality of feed on the concentrations of purine derivatives in urinary spot samples, daily microbial N supply and predictability of intake. **Animal Feed Science and Technology**, v. 85, n. 3-4, p. 223-238, 2000.

ØRSKOV, E. R; McLEOD, N. A.The determination of minimal nitrogen excretion in steers and dairy cows and its physiological and practical implications. **Brish Journal of Nutrition**, v. 47, p. 625-636, 1982.

OTT, R. L. **An introduction to statistical methods and data analysis**. Wadsworth, 1983. 354p.

PEREIRA, T. C. J.; PEREIRA, M. L. A.; SANTOS, A. B.; ALMEIDA, P. J. P.; OILVEIRA, C. A. S.; ARGOLO, L. S.; SILVA, T. V. B. S. Excreção de derivados de purinas na urina de cabras em lactação. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 12, n. 2, p. 200-203, 2010.

PLAIZIER, J. C.; MARTIN, A.; DUFFIELD, T.; BAGG, R.; DICK, P.; McBRIDE, B.W. Effect of a prepartum administration of monensin in a controlled-release capsule on apparent digestibilities and nitrogen utilization in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 2918-2925, 2000.

POSADA, S. L; NOGUERA, R. R; RODRÍGUEZ, N. M.; BORGES, A. L. Creatinine used as an indicator of urinary excretion in Nelore cattle. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 25, n. 1, 2012.

RENNÓ, L. N.; VALADARES, R. F. D.; VALADARES FILHO, S. C.; LEÃO, M. I.; DA SILVA, J. F. C.; CECON, P. R.; GONÇALVES, L. C.;7, DIAS, H. L. C.; LINHARES, R. S. Concentração plasmática de ureia e excreções de ureia e creatinina em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 1235-1243, 2000.

SHINGFIELD, K. J.; OFFER, N. W. Evaluation of milk allantoin excretion as an index of microbial protein supply in lactting dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 67, p. 371-385, 1998.

SILVA, L. F. C.; VALADARES FILHO, S. C.; CHIZZOTTI, M. L. et al. Creatinine excretion and relationship with body weight of Nellore cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 3, p. 807-810, 2012.

SILVA, R. M. N. et al. Ureia para vacas em lactação. 2. Estimativas do volume urinário, da produção microbiana e da excreção de ureia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 6, p. 1948-1957, 2001.

SUSMEL, P.; SPANGHERO, M.; STEFANON, B.; MILLS, C. R. Nitrogen balance and partitioning of some nitrogen catabolites in milk and urine of lactating cows. **Livestock Production Science**, v. 44, p. 207-219, 1995.

TAS, B.M., SUSENBETH, A. Urinary purine derivates excretion as an indicator of in vivo microbial N flow in cattle: A review. **Livestock Production Science**, v.111, p.181-192, 2007.

TURNER, K. E.; WILDEUS, S.; COLLINS, J. R. Intake, performance, and blood parameters in young goats offered high forage diets of lespedeza or alfalfa hay. **Small Ruminant Research**, v. 59, p. 15-23, 2005.

VALADARES, R. F. D.; BRODERICK, G. A.; VALADARES FILHO, S. C. et al. Effect of replacing alfafa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivates. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2686-2696, 1999.

WALKER, J. B. Creatine: biosynthesis, regulation, and function. **Advances in Enzymology**, v. 50, p. 177–242, 1979.

WHITTET, K. M. **Factors affecting variability in urinary creatinine and purine derivative excretion in cattle**. MS Thesis. Univ. of Nebraska, Lincoln, 2004.

WYSS, M.; R. KADDURAH-DAOUK. Creatine and creatinine metabolism. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 3, p. 1107-1213, 2000.

XUE, G. P.; SNOSWELL, A. M.; FISHLOCK, R. C. Quantitative study on creatine metabolism in sheep tissues. **International Journal of Biochemistry**, v. 16, p. 623–628, 1988.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tanto a inclusão de quitosana como de grão de soja nas dietas de vacas leiteiras alteram a fermentação e a população microbiana ruminal, tendo como consequência incompleta biohidrogenação de lipídios, com aumento de ácidos graxos insaturados no leite. Porém, como a interação de ambos causa diminuição do consumo, digestibilidade e síntese de proteína microbiana nos níveis utilizados no presente estudo, são necessários ajustes na inclusão às dietas se usados de forma combinada para não haver comprometimento do desempenho produtivo de vacas leiteiras. Alternativamente, o uso de quitosana ou grão de soja de forma isolada nas dietas pode trazer benefícios peculiares, sendo que a escolha entre um ou outro vai depender da estratégia nutricional e dos objetivos desejados.

Os resultados dessa pesquisa demonstram a grande variabilidade de condições e resultados que um estudo de indicadores de excreção fecal é sujeito. Por isso, no momento da escolha de um indicador mais adequado, deve-se considerar não apenas a acurácia e precisão dos resultados, mas também o modo e a extensão em que o viés ou erros são influenciados pela variação de fatores relacionados às condições experimentais. Por exemplo, apesar de resultados acurados e precisos, o uso do óxido crômico em estudos com inclusão de lipídios nas dietas pode comprometer as estimativas, visto o efeito observado dos mesmos sobre a recuperação fecal do indicador e a ausência de robustez quando os vieses foram relacionados ao consumo de extrato etéreo das vacas.

Ainda, o uso de quitosana ou potencialmente até outros aditivos antimicrobianos em dietas parece comprometer a aplicação da técnica de indicadores internos em estudos de digestão, visto que os resíduos de incubação foram incrementados, havendo evidências de que este aditivo diminuiu a degradação completa dos componentes digestíveis das amostras.

Apesar do indicador FDNi analisado em sacos de poliéster de 12 ou 25 μ ter melhor atendido os requisitos avaliados para geração de estimativas acuradas, precisas e robustas de excreção fecal, outras combinações, como FDNi em sacos de TNT, apresentam bom desempenho preditivo, cuja as diferenças de custo entre os sacos de incubação podem ser consideradas conjuntamente aos demais critérios de escolha do melhor indicador.

As variações observadas na excreção da molécula de creatinina como proporção do peso vivo representam limitações para aplicação da técnica de amostragem pontual de urina e estimativa do volume urinário, visto que um único valor médio de excreção não representou a real condição de todas as vacas do estudo, havendo substanciais erros de predição sobre a excreção de derivados de purinas e incorretas inferências sobre a síntese proteica ruminal.

REFERÊNCIAS GERAIS

ÅKERLIND, M.; WEISBJERG, M.; ERIKSSO, T.; TØGERSEN, R.; UDÉN, P.; ÓLAFSSON, B. L.; HARSTAD, O. M.; VOLDEN, H. Feed analyses and digestion methods. In: Volden, H. (Ed.), **NorFor – The Nordic Feed Evaluation System**, Wageningen Academic Publish ,Wageningen, The Netherlands, p. 41–54, 2011.

ARAÚJO, A. P. C.; VENTURELLI, B. C.; SANTOS M. C. B.; GARDINAL R.; CÔNSOLO N. R. B.; CALOMENI G. D.; FREITAS J. E.; BARLETTA R. V.; GANDRA J. R.; PAIVA P. G.; RENNÓ F. P. Chitosan affects total nutrients digestion and ruminal fermentation in Nellore steers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 206, p. 114-118, 2015.

BERCHIELLI, T. T.; OLIVEIRA, S. G.; CARRILHO, E. N. V. M. et al. Comparação de indicadores para estimativas de produção fecal e de fluxo de digesta em bovinos. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 34, n. 3, p. 987-996, 2005.

CAPPER, J. L.; CADY, R. A.; BAUMAN, D.E. The environmental impact of dairy production: 1944 compared with 2007. **Journal of Animal Science**, v.87, p.2160-2167, 2009.

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of technical details. (Occasional publication) **International Feed Research Unit**. Bucksburnd, Aberdeen: Rowett Research Institute. 21p. 1992.

CONNOR, E. E. Invited review: Improving feed efficiency in dairy production: Challenges and possibilities. **Animal**, v. 9, p. 395–408, 2015.

EUROPEAN COMMISSION. **Regulation (EC) No. 1831/2003** of the European parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. Off. J. L268: 229-243. 2003.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - **FAO 2013**. Statistics, FAOSTAT. Acesso em: 2 out. 2014. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>

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, 2009.

GOIRI, I.; INDURAIN, G.; INSAUSTI, K.; SARRIES, V.; GARCIA-RODRIGUES, A. Ruminal biohydrogenation of unsaturated fatty acids in vitro as affected by chitosan.**Animal Feed Science and Technology**, v. 159, p. 35–40, 2010b.

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

HE, M.; PERFIELD, K. L.; GREEN, H. B.; ARMENTANO, L. E. Effect of dietary fat blend enriched in oleic or linoleic acid and monensin supplementation on dairy cattle performance,

milk fatty acid profiles, and milk fat depression. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 1447-1461, 2012.

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.

KLIEM, K. E., K. J. SHINGFIELD. Manipulation of milk fattyacid composition in lactating cows: Opportunities and challenges. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, p. 1661–1683, 2016.

KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 51-63, 2010.

KOZLOSKI, G. V.; NETTO, D. P.; OLIVEIRA, L.; MAIXNER, A. R.; LEITE, D. T.; MACCARI, M.; BRONDANI, I. L.; SANCHEZ, L. M. B.; QUADROS, F. L. F. Uso de óxido de cromo como indicador da excreção fecal de bovinos em pastejo: variação das estimativas em função do horário de amostragem. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 599-603, 2006.

KRIZSAN, S. J; RINNE, M.; NYHOLM, L.; HUHTANEN, P. New recommendations for the ruminal *in situ* determination of indigestible neutral detergent fibre. **Animal Feed Science and Technology**, v. 205, p. 31-41, 2015.

KURIEN, B. T; EVERDS, N. E.; SCOFIELD, R. H. Experimental animal urine collection: a review. **Laboratory Animals**, v.38, p. 333-361, 2004.

LIU, Z. J.; McMENIMAN, N. P. Effect of nutrition level and diets on creatinine excretion by sheep. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 265-273, 2006.

MAIA, M. R. G.; CHAUDHARY, L. C.; BESTWICK, C. S.; RICHARDSON, A. J; MCKAIN, N.; LARSON, T. R.; GRAHAM, I. A.; WALLACE, R. J. Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibriofibrisolvens*. **BMC Microbiology**, v. 52.p. 1-10, 2010.

MAIA, M.R.G.; CHAUDHARY, L.C.; FIGERES, L.; WALLACE, R.J. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 91, p. 303–314, 2007.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**,7.ed. Washington, D.C.: Academic Press, 2001. 381 p.

OWENS, F. N.; HANSON, C. F. External and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 75(9), p. 2605-2617, 1992.

PAIVA, P. G.; JESUS, E. F.; DEL VALLE, T. A.; ALMEIDA, G. F.; COSTA, A. G. B. V. B.; CONSENTINI, C. E. C.; ZANFERARI, F.; TAKIYA, C. S.; BUENO, I. C. S.; RENNÓ, F. P. Effects of chitosan on ruminal fermentation, nutrient digestibility, and milk yield and composition of dairy cows. **Animal Production Science**, v. 57, p. 301-307, 2016.

RABIEE, A. R.; K. BREINHILD, W. SCOTT, H. M. GOLDER, E. BLOCK, AND I. J. LEAN. Effect of fat additions to diets of dairy cattle on milk production and components: A meta-analysis and metaregression. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 3225–3247, 2012.

RUSSEL, J. B.; STROBEL, H. L. Mini-review: the effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 1, p. 1-6, 1989.

SENEL, S.; MCCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine, **Adv Drug Deliver Reviews**, v. 56, p. 1467-1480, 2004.

SHINGFIELD, K. J.; OFFER, N. W. Evaluation of milk allantoin excretion as an index of microbial protein supply in lactting dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 67,p. 371-385, 1998.

SILVA, D. C.; SANTOS, G. T.; BRANCO, A. F.; DAMASCENO, J. C.; KAZAMA, R.; MATSUSHITA, M.; HORST, J. A.; 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.

SILVA, L. F. C.; VALADARES FILHO, S. C.; CHIZZOTTI, M. L. et al. Creatinine excretion and relationship with body weight of Nellore cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 3, p. 807-810, 2012.

TAS, B. M., SUSENBETH, A. Urinary purine derivatives excretion as an indicator of in vivo microbial N flow in cattle: A review. **Livestock**, v. 111, p. 181-192, 2007.

TITGEMEYER, E. C. Design and interpretation of nutrient digestion studies. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 8, p. 2235-2247, 1997.

TITGEMEYER, E. C.; ARMENDARIZ, C. K.; BINDEL, D.J. Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 1059-1063, 2001.

VALADARES, R. F. D.; BRODERICK, G. A.; VALADARES FILHO, S. C. et al. Effect of replacing alfafa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivates. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2686-2696, 1999.

VANDEHAAR, M. J.; ARMENTANO, L. E.; WEIGEL, K.; SPURLOCK, D. M.; TEMPELMAN, R. J.; VEERKAMP, R. Harnessing the genetics of the modern dairy cow to continue improvements in feed efficiency. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 4941-4954, 2016.

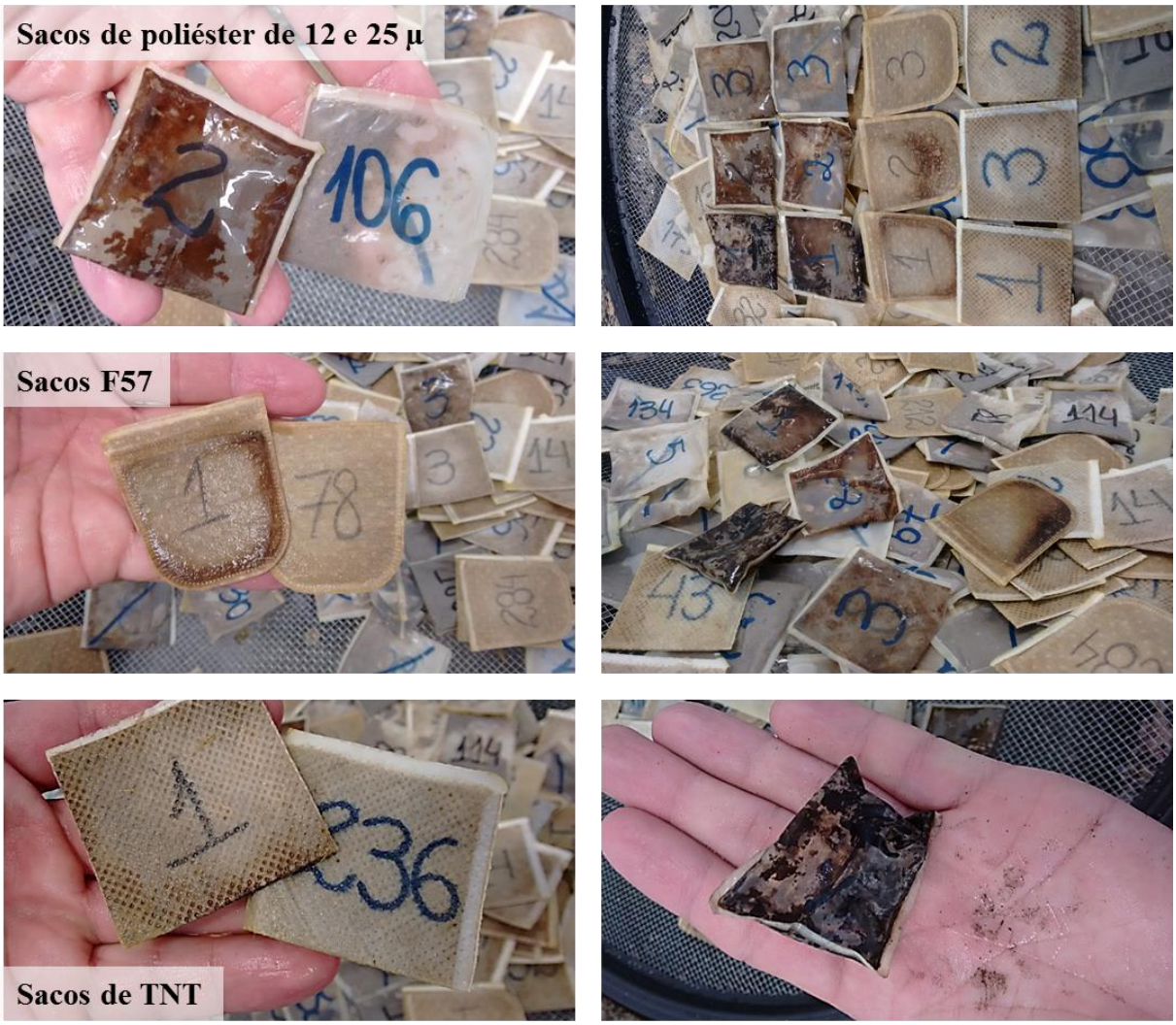
VANDEHAAR, M. J.; ST-PIERRE, N2006. Major Advances in Nutrition:Relevance to the sustainability of the dairy industry. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1280-1291, 2006.

WEISS, W. P.; PINOS-RODRÍGUEZ, J. M. Production responses of dairy cows when fed supplemental fat in low- and high-forage diets. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 6144-6155, 2009.

WHITTET, K. M. **Factors affecting variability in urinary creatinine and purine derivative excretion in cattle**. MS Thesis. Univ. of Nebraska, Lincoln, 2004.

APÊNDICE

APÊNDICE A – FOTOS INDICATIVAS DO ASPECTO PECULIAR DAS AMOSTRAS DE QUITOSANA INCUBADAS *IN SITU* EM DIFERENTES SACOS (NUMERAÇÕES 1, 2 E 3) COMPARATIVAMENTE ÀS DEMAIS AMOSTRAS APÓS REMOÇÃO DO RÚMEN E LAVAGENS COM ÁGUA CORRENTE.



Fonte: Arquivo pessoal. Amostras de quitosana incubadas nos sacos P12, P25, F57 e TNT que resultaram nos respectivos teores de componentes indigestíveis *in situ*: 7,35, 6,90, 6,88 e 4,77% para MSi; 3,46, 3,29, 2,79 e 4,77% para FDNi; e 1,44, 1,53, 1,28 e 1,17% para FDAi (todos expressos em % da MS).