ANA PAULA CHAVES DE ARAÚJO

Efeito de diferentes concentrações de quitosana na dieta de novilhos Nelore

---

Pirassununga

2011

ANA PAULA CHAVES DE ARAÚJO

Efeito de diferentes concentrações de quitosana na dieta de novilhos Nelore

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

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de Concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Francisco Palma Rennó

Pirassununga

2011

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

Conferido Semente Ficha
Catalográfica

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

21/11/11

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2520
FMVZ

Araújo, Ana Paula Chaves de
Efeito de diferentes concentrações de quitosana na dieta de novilhos Nelore / Ana
Paula Chaves de Araújo. -- 2011.
90 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal,
Pirassununga, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.
Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Palma Rennó.

1. Consumo. 2. Fermentação ruminal. 3. Nelore. 4. Quitosana. 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 "Desempenho produtivo, digestão e metabolismo em bovinos alimentados com diferentes concentrações de quitosana nas dietas", protocolado sob o nº 2222/2011, utilizando 88 (oitenta e oito) bovinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, 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 e foi aprovado em reunião de 04/5/2011.

We certify that the Research "Productive performance, digestion and metabolism in cattle fed with different levels of chitosan in the diets", protocol number 2222/2011, utilizing 88 (eighty-eight) cattle, under the responsibility Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, 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 and was approved in the meeting of day 05/04/2011.

São Paulo, 12 de maio de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ARAÚJO, Ana Paula Chaves de

Título: Efeito de diferentes concentrações de quitosana na dieta de novilhos Nelore

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos. Se sigo sempre em frente é em razão da força e da confiança deles por trás de tudo. Amo vocês.

Dedico também às pessoas que tornam essa jornada mais fácil em muitos momentos: Samir,
Beatriz e Wolfger.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer antes de tudo à Deus, que é a motivação intrínseca das minhas conquistas, o qual me guia e fortalece.

Agradeço ao meu pai, Adenias, por confiar de olhos fechados nas minhas decisões, por ser amigo, fiel e, sobretudo, pela educação exemplar, pois foi ele quem formou o caráter da pessoa que sou hoje, a qual orgulho ser.

Agradeço à minha mãe, Maria, sábia e paciente, a pessoa mais otimista que conheço, a qual me passa toda confiança e serenidade necessária para minhas realizações.

Agradeço ao meu irmão, Wellington, meu amigo querido que nada faz em troca de retribuições, sempre prestes a ajudar, seja com risadas ou com o carinho.

Agradeço ao meu irmão, Wendel. Nossos vínculos com certeza foram formados para ambos os crescimentos. Obrigada pela sua preocupação e pelo seu orgulho.

Agradeço ao meu orientador, Francisco Palma Rennó. Sempre há anos luz na frente, faz questão do nosso crescimento junto ao dele. Nesses quase 5 anos de trabalho, devo agradecer meu crescimento pessoal e técnico, a disciplina, o gosto pelo trabalho, a teoria e a prática. Obrigada pela confiança e ensinamentos, por fazer parte da minha formação.

Agradeço ao Samir, meu amigo, irmão, pai, parceiro para todos os momentos... Com certeza, precisarei nascer de novo para começar a tentar agradecer tudo que fizeste por mim. Essencial, minha válvula de escape muitas vezes. É maravilhoso saber que existem pessoas tão bonitas e inteligentes que possam acrescentar coisas boas em nossas vidas.

Agradeço à Beatriz (Bixuka). Se todos possuem um anjo da guarda, provavelmente o meu está materializado nessa pessoa. Obrigada por estar comigo em todos os momentos, risos e penas. Pelo carinho e ajuda incondicional! Pela amizade sincera e pela confiança. Sem dúvida nenhuma, Pirassununga me deu um grande presente ao te trazer comigo.

Agradeço à Mayara, amiga para tantas coisas! Devagarzinho fomos conquistando uma à outra e hoje posso dizer que tudo foi muito intenso, porém, o mais importante, verdadeiro. Quero te levar para sempre na minha vida. Obrigada por tudo!

Agradeço ao Wolfger, pessoa mais que especial, acompanhou meu mestrado a 10.000 km, porém sempre esteve tão perto que me passou muita força e alegria. Obrigada pela paciência, pelo carinho, puxões de orelha, pelas palavras de apoio e conforto, pelas brincadeiras, por me conhecer tão bem e me compreender. Obrigada pela amizade e amor.

Agradeço à Giovanna, amiga que ganhei para a vida! Tanto carinho, tanta confiança, tantos desabafos e alegrias que vivemos. Sempre acompanhando meus passos e sempre está lá para o que der e vier. Obrigada por tudo!

Agradeço à Maru: minha sempre parceira! Sempre confiou e apoiou tudo que inventei fazer. Obrigada pela amizade.

Agradeço ao meu amigo Carlos (MP), pelas conversas e conselhos ao longo do meu mestrado, por atender minhas ligações a qualquer hora e por escutar minhas reclamações com bom humor.

Aos meninos: Maurício (Xibungo), Eduardo (Frodo), Perna (Flávio) e Caio. Obrigada por sempre me acolherem, pela amizade, jantares, almoços e risadas.

Às meninas: Esther e Babi. Obrigada por fazerem parte desse meu momento e guardo a amizade de vocês para sempre!

Ao pessoal do VRA: Milton, Milena, Kleber, Henrique, Arroz, Gaúchinho, Jú Naves. Em especial à Dani e a Moana. Obrigada pelo carinho e amizade.

Aos professores do VRA: Rubens, Ed Hoffman, Annelise e Mário.

Aos companheiros, parceiros, amigos e colegas da Pós-graduação : Camila, Carol, Nara (corte), Nara (leite), Juliano, Suzana, Iaçanã, Juliana Barreiro, Jú Diniz, Érika, Larissa, Dani (corte), Dani (leite), Henrique, Cris, Marina (corte), Marina (leite), Maria Fernanda, Fernanda, Francine, Nayara, Rafa, Rinaldo, Novilha, Bereba, Lara, Tássia, Pedro, Zé Alípio, Marília, Tarley, João Guilherme, Paula, Andréia, Fred, Laurinha, Claudinha e Débora. Com certeza cada um de vocês fez parte de algum ou vários momentos especiais.

Em especial aos amigos: Rui, Xacrete, Dannylo, Alejandro, Gaúcho, Marinho e Carolina (Dorf).

Aos funcionários do VNP: Alessandra, João Paulo, Simi, Everson, Ari, Gilson, Lucinéia, Dona Lurdes, Fábila, Zequinha, Paula, Marcão, Bigode, Cebolinha e Alex.

À todos os funcionários da Higilimp.

Ao funcionário da FMVZ, Antônio Carlos Bueno da Silva (Carlinhos). Obrigada pelo apoio e amizade.

Aos funcionários do LPBL: Tio Carlão, João (Jota), Lenon, Paulo. Obrigada por todo o suporte, carinho e companhia. São detalhes e pessoas que tornam nosso dia a dia melhor.

Aos funcionários do CCPS : Valmir, Coelho, Joãozinho, Tio Zé, Bala, Tadeu e Schimdt (Estábulo leiteiro); Cláudio, Israel, José e Sebastião (Fábrica de ração) ; Tânia e profa. Catarina (Assistência social e Moradia); Amélia e Edil (Zeladoria);

Aos estagiários e estudantes de Iniciação científica: Pernilongo, Karen, Gorfo, Vivi, Catimbó, Wagy, Bumba, Begônia, Alemão, Finfa e Baranga.

Aos companheiros e amigos de equipe: Bizão, Lenita, Vítor, Mineirinho, Cibeles, Badá, Flávio, Taíssa.

Aos mais bem humorados companheiros de equipe: Gustavo e Rodrigo, obrigada pelas manhãs felizes de trabalho, pela amizade e momentos agradáveis.

Aos doutorandos e amigos: José Esler e Jefferson. Gostaria de agradecer-los em especial, pelos anos de convivência e por compartilharem a experiência e conhecimento de vocês.

Aos professores do VNP: Gobesso, Aníbal, Maria de Fátima, Messias, Marcos Veiga, Paulo Mazza, Ricardo, Romualdo, Gameiro, Cristiane. Gostaria de agradecer-los desde a minha formação acadêmica como veterinária até a conquista de hoje.

Aos professores: Angélica e Luís Felipe que colaboraram de alguma forma mais direta com a realização desse projeto.

Aos alunos da turma 75.

Às minhas companheiras de quarto: Mirelli e Paola. Obrigada meninas pela agradável companhia e amizade.

“Se Deus tivesse liberado o homem do trabalho físico, seus membros seriam atrofiados; se o livrasse do trabalho intelectual, seu espírito permaneceria na infância, nas condições instintivas do animal. Eis porque ele fez do trabalho uma necessidade, e lhe disse: Busca e acharás; trabalhas e produzirás; e dessa forma será o filho de tuas obras, terás o mérito de sua realização, e serás recompensado segundo o que tiveres feito”.

Deus lhe deu a mais do que ao animal, o desejo constante de melhorar, ou seja, essa aspiração de melhorar a sua situação, levando-os às descobertas, às invenções, ao aperfeiçoamento da ciência, pois é a ciência que lhe proporciona o que lhe faz falta.

RESUMO

ARAÚJO, A. P. C. **Efeito de diferentes concentrações de quitosana na dieta de novilhos Nelore**. [Effect of different levels of chitosan in Nelore steers diet]. 2011. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de quitosana nas dietas de novilhos Nelore canulados no rúmen sobre o consumo e digestibilidade aparente total da matéria seca e nutrientes, fermentação e síntese de proteína microbiana ruminal, concentrações de parâmetros sanguíneos, e os balanços de energia e de nitrogênio. Foram utilizados 8 novilhos canulados da raça Nelore. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 quadrados latinos 4 x 4 balanceados e contemporâneos, para receber as seguintes rações experimentais: 1) Controle (Q0), composta por ração sem a inclusão de quitosana; 2) Q50, com a inclusão de 50 mg/kg de peso corporal de quitosana; 3) Q100, com a inclusão de 100 mg/kg de peso corporal de quitosana; e 4) Q150, com a inclusão de 150 mg/kg de peso corporal de quitosana. Diariamente foram realizadas pesagens das quantidades dos volumosos e concentrados fornecidos e das sobras de cada animal, para estimativa do consumo. As amostras de sobras, silagem e fezes foram coletadas do 15º ao 18º dias de cada período experimental, armazenadas em sacos plásticos em freezer à -20°C, e posteriormente submetidas a análises químico-bromatológicas dos principais nutrientes. Na determinação da digestibilidade aparente total dos nutrientes a quantidade total de matéria seca fecal excretada foi estimada pela concentração de fibra em detergente ácido indigestível (FDAi). As amostras de líquido ruminal foram coletadas no último dia de cada período, sendo uma coleta realizada antes da alimentação (0 hora), e seis coletas com intervalos de 2 horas após a alimentação (2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas). Foram determinados no líquido ruminal o pH, as concentrações de nitrogênio amoniacal e as concentrações dos ácidos graxos de cadeia curta. As amostras spot de urina foram obtidas de no 16º dia de cada período experimental, quatro horas após a alimentação matinal, durante micção espontânea. As amostras de sangue foram coletadas em tubos vacuolizados (vacutainer) por punção da veia jugular. Houve efeito quadrático com menores valores sobre o consumo de FDN, expressos em kg/dia e porcentagem de peso vivo (PV) para o tratamento Q150 ($P<0,05$). A inclusão de quitosana na dieta proporcionou aumento linear crescente ($P<0,05$) da digestibilidade da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), carboidratos totais (CT), FDN e nutrientes digestíveis totais

(NDT). Houve efeito quadrático ($P < 0,05$) sobre a concentração de N-NH_3 com redução no tratamento Q150. A inclusão de quitosana na dieta não causou diferenças nas concentrações totais de AGCC ($P > 0,05$), porém alterou as proporções molares de AGCC individualmente. Houve efeito linear crescente ($P > 0,05$) das concentrações e porcentagens molares de propionato (mmol/L) à medida que se elevou as concentrações de quitosana na dieta. Houve diminuição ($P > 0,05$) da relação acetato: propionato, principalmente para o tratamento Q150. Foi observado efeito linear decrescente para as proporções molares de acetato e butirato com a inclusão de quitosana. Houve efeito linear crescente sobre as concentrações plasmáticas de glicose com os tratamentos. As concentrações de quitosana utilizadas não influenciaram a síntese de proteína microbiana. O balanço de energia não foi influenciado pelos tratamentos. Não houve efeito dos tratamentos sobre o balanço de nitrogênio, porém ocorreu decréscimo na excreção do nitrogênio total (NT) nas fezes em porcentagem de NT. A quitosana quando utilizada como aditivo modulador da fermentação ruminal, resultou em alterações que possibilitam sua utilização como alternativa ao uso de ionóforos para bovinos.

Palavras-chave: Consumo. Fermentação ruminal. Nelore. Quitosana

ABSTRACT

ARAÚJO, A. P. C. **Effect of different levels of chitosan in Nellore steers diet.** [Efeito de diferentes concentrações de quitosana na dieta de novilhos Nelore]. 2011. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

The aim of this study was to evaluate the effect of different levels of chitosan on intake, digestibility, ruminal fermentation, ruminal microbial protein, balance of energy and nitrogen and blood parameters. Eight Nellore steers cannulated in the rumen were divided into two 4 x 4 balanced Latin squares. The daily doses of chitosan were 0, 50, 100 and 150 mg/kg BW respectively the treatments Q0 (Control), Q50, Q100 and Q150. The diets consisted of corn silage and concentrate in ratio 60:40 and the chitosan were inserted directly through the ruminal cannula, twice a day before feeding. Daily weights of the amounts of corn silage and concentrated supplied, and the orts refused of each animal, were recorded for estimate the nutrient intake. Samples of orts and feedstuffs were analyzed for composition and subsequent nutrient intake calculation. For determination of total apparent digestibility of nutrients, the total amount of fecal dry matter excreted was estimate by indigestible detergent acid fiber (ADFi). The feces were collected in the 15th until the 18th day of each experimental period, and frozen in freezer at -20°C. In the end of the collection period it was made composed sample by animal with base in the dry matter, and analyzed. Samples of ruminal fluid were collected at 0 (before feeding) and 2, 4, 6, 8, 10 and 12 hours after feeding. Spot urine samples were collected on day 16 of the experimental period. The estimation of microbial protein synthesis was performed by the method of total excretion of purine derivatives. Blood samples were collected by puncture of jugular vein. Intakes (kg/d) of DM, OM, CP, ether extract, total carbohydrates, non-fiber carbohydrates and TDN were not different, however, NDF intake decreased quadratically ($P < 0.05$) when expressed as kg/d and percent of BW. Digestibility in the total digestive tract increased linearly to NDF, DM, OM as well as improved the digestibility of CP and TC, accordingly there was a positive effect on TDN with the inclusion of chitosan. All the ruminal fermentation parameters were influenced by the time after feeding. The $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration decreased quadratically with Q150 treatment and there were no difference in total VFA concentration, however the individual VFA proportions were affected. Propionate concentration was higher with Q150 and similarly

increasing linearly the proportion of propionate ($P < 0,05$) which means an increase of 7.47% (Q0 vs. Q150). Chitosan decreased linearly the molar proportion of acetate and butyrate. Was observed linear and quadratic decrease effect on acetate: propionate ratio. The plasmatic metabolites and enzymes had no effect by the treatments, nevertheless the glucose concentration was markedly superior with the supplementation corresponding to an increase of 18.58%, 26.35%, 23.68% for Q0 versus Q50, Q100 e Q150 respectively. The energy and nitrogen balance had no effect with the treatments, however there was a decrease of fecal total nitrogen (%) excretion. Chitosan when used as modulator of ruminal fermentation resulted in changes that allow its use as an alternative to the use of ionophores for cattle without showing damage to the health of the animal.

Keywords: Chitosan. Intake. Nellore. Ruminal fermentation.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AG	Ácidos Graxos
AST	Aspartato Aminotranferase
BE	Balanço de Energia
BN	Balanço de Nitrogênio
CD	Coeficiente de Digestibilidade
CED	Consumo de Energia Digestível
CEL	Consumo de Energia Líquida
CMS	Consumo de Matéria Seca
CT	Carboidratos Totais
DP	Derivados de Purina
ED	Energia Digestível
EE	Extrato Etéreo
ELg	Energia Líquida de Ganho
EM	Energia Metabolizável
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
FS	Farelo de Soja
GGT	Gama Glutamiltransferase
MN	Matéria Natural
MO	Materia Orgânica
MPCV	Mudança de Peso de Corpo Vazio
MS	Matéria Seca
Nmic	Nitrogênio Microbiano
N-NH ₃	Nitrogênio Amoniacal
Pabs	Purinas Absorvíveis
PB	Proteína Bruta

PBmic	Proteína bruta microbiana
PDR	Proteína Degradável no Rúmen
pH	Potencial Hidrogeniônico
Pmic	Proteína microbiana
PNDR	Proteína Não Degradável no Rúmen
PV	Peso Vivo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proporção dos ingredientes no concentrado e na ração expressos na matéria seca (%MS)	44
Tabela 2 - Composição bromatológica dos ingredientes do concentrado experimental	45
Tabela 3- Composição bromatológica do concentrado e da ração	45
Tabela 4- Média e erro padrão da média (EPM) dos consumos de matéria seca e nutrientes em função dos tratamentos	54
Tabela 5- Média e erro padrão da média (EPM) para os coeficientes de digestibilidade aparentes totais da matéria seca e nutrientes em função dos tratamentos	55
Tabela 6- Efeito das diferentes concentrações de quitosana nos perfil da fermentação ruminal	57
Tabela 7- Média e Erro padrão da média (EPM) da síntese de proteína microbiana em função dos tratamentos	60
Tabela 8- Efeito das concentrações de quitosana sobre a eficiência de utilização de energia e o balanço energético	63
Tabela 9- Médias e erro padrão da média (EPM) para balanço de nitrogênio em função dos tratamentos	64
Tabela 10- Efeito das diferentes concentrações de quitosana nos metabólitos e enzimas plasmáticas	67

Sumário

1.1 HIPÓTESE.....	21
1.2 OBJETIVO.....	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 MODULADORES DE FERMENTAÇÃO RUMINAL	22
2.2 QUITOSANA: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES.....	24
2.2.1 Quitosana como antimicrobiano.....	28
2.2.2 Utilização da quitosana na Medicina Veterinária.....	30
2.3 Utilização da quitosana na alimentação de ruminantes.....	32
2.3.1 Consumo e Digestibilidade da Matéria Seca.....	34
2.3.2 Fermentação Ruminal	35
2.3.3 Síntese de Proteína Microbiana.....	37
2.3.4 Parâmetros Sanguíneos	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 LOCAL, INSTALAÇÃO E ANIMAIS.....	42
3.2 RAÇÕES EXPERIMENTAIS	43
3.3 ANÁLISE DE ALIMENTOS	43
3.4 DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL.....	46
3.5 FERMENTAÇÃO RUMINAL	47
3.6 SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA	48
3.7 BALANÇOS DE ENERGIA E DE NITROGÊNIO	49
3.8 PARÂMETROS SANGUÍNEOS	51
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICAS	52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1 CONSUMO E DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL	53
4.2 FERMENTAÇÃO RUMINAL	57
4.3 SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA	60
4.4 BALANÇOS DE ENERGIA E DE NITROGÊNIO	62
4.5 PARÂMETROS SANGUÍNEOS	66
5 CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas diferentes promotores de crescimento têm sido utilizados em sistemas de produção com animais, especialmente em bovinos, ovinos, caprinos, suínos e aves. Entre os diferentes tipos de promotores de crescimento, destaca-se a utilização de antibióticos, que promovem efeitos benéficos como a prevenção de alterações de saúde nos animais e melhoria no aproveitamento dos nutrientes contidos nos alimentos.

Em meados da década de 70, o uso de ionóforos foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos. Diversos países como o Brasil, Austrália, Nova Zelândia, Canadá, Estados Unidos e vários países da Europa liberaram a utilização deste produto para bovinos (NRC, 2001).

Vários estudos tem demonstrado melhorias no desempenho animal com o uso desses produtos em dietas de animais em crescimento (GOODRICH et al., 1984; MEINERT et al., 1992), bovinos de corte (NRC, 1996) e, mais recentemente, em vacas leiteiras no pré-parto (DUFFIELD; SANDEAL; LESLIE, 1998a, 1998b) e durante a lactação (VAN DER WERF et al., 1998).

Entretanto, após 30 anos, a união européia banuiu a utilização de antibióticos e promotores de crescimento (REGULAMENTAÇÃO 1831/2003/EC), baseados no conceito de que a resistência de humanos aos antibióticos poderia ser influenciada pelo seu uso rotineiro na alimentação animal (GUSTAFSON; BOWEN, 1997). A legislação regulatória em questão deve controlar ou limitar, o comércio de importações de carne de países cujo uso de promotores de crescimento prosseguem na nutrição animal (CARRO; RANILLA, 2002).

Porém, considerando o efeito benéfico da utilização deste aditivo não somente sob o ponto de vista das vantagens sanitárias e nutricionais, mas também conseqüentemente sob o ponto de vista econômico, diferentes aditivos e componentes de rações alternativos foram e têm sido desenvolvidos pela comunidade acadêmica e pela indústria relacionada à alimentação animal para promover efeitos similares a ionóforos, notadamente a monensina sódica.

Dentre estes aditivos, é importante mencionar para ruminantes a utilização de leveduras (DESNOYERS et al., 2009; ROBINSON; ERASMUS, 2009), com maior parte dos estudos sendo composto pelo microrganismo *Saccharomyces cerevisiae*, de diferentes cepas, que foi e são atualmente objeto de diversos estudos.

Apesar de menor número de estudos e resultados ainda pouco conclusivos quando comparado com a utilização de ionóforos e leveduras, destaca-se a utilização de óleos essenciais na alimentação de ruminantes. Contudo, estudos com evidência científica dos efeitos de óleos essenciais na fermentação microbiana ruminal são limitados a apenas algumas pesquisas em condições limitadas de utilização e poucos tipos de óleos, sendo necessário maior número de estudos que avaliem o potencial de diferentes tipos de óleos essenciais na alimentação animal.

Recentemente, foi proposto por Goiri et al. (2009a) a utilização de quitosana para modular a fermentação e digestão ruminal, com resultados promissores. A quitosana (polímero N-acetil-D-glicosamina) é um biopolímero natural derivado da deacetilação da quitina (GOIRI et al., 2009a). A quitina é o biopolímero mais abundante da natureza após a celulose, sendo polissacarídeo mundialmente distribuído como componente principal do exoesqueleto de crustáceos e insetos, assim como da parede celular de algumas bactérias e fungos (SENEL et al., 2004).

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

A quitosana tem sido empregada ainda na medicina veterinária com finalidade biomédica e terapêutica pelas suas propriedades antimicrobiana, cicatrizantes, homeostáticas e imunoestimulantes (SENEL et al., 2004), tal como na produção de vacinas como adjuvante na veiculação de DNA e antígenos.

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

A utilização de quitosana como aditivo na alimentação de animais é pouco estudada até o presente, estando mais desenvolvidos estudos em monogástricos com o intuito de melhorar a retenção de nitrogênio, eficiência alimentar e crescimentos de frangos de corte (SUK, 2004; HUANG et al., 2005; SHI et al., 2005) e leitões recém desmamados (HUANG et al., 2005). Em ruminantes, a quitosana foi estudada como uma nova alternativa de fonte de nitrogênio

(EL-SEED et al., 2003) e recentemente como possível moduladora da fermentação ruminal a fim de otimizar a eficiência alimentar em ovinos (GOIRI et al., 2009a).

Considerando os resultados obtidos com a utilização da quitosana, resultando em melhor padrão de fermentação e maior eficiência de utilização de energia no ecossistema ruminal, a utilização de tal composto na alimentação de bovinos deve ser explorada e melhor avaliada para que sejam estabelecidas as recomendações de sua utilização.

1.1 HIPÓTESE

A hipótese científica a ser avaliada neste estudo sugere que a concentração adequada de quitosana influencia positivamente a fermentação ruminal em novilhos Nelore canulados no rúmen, sem, no entanto, influenciar negativamente o consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes.

1.2 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de quitosana nas dietas de novilhos Nelore canulados no rúmen sobre o consumo e digestibilidade aparente total da matéria seca e nutrientes, fermentação e síntese de proteína microbiana ruminal, concentrações de parâmetros sanguíneos, e os balanços de energia e de nitrogênio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MODULADORES DE FERMENTAÇÃO RUMINAL

Existem mecanismos que permitem otimizar o desempenho dos ruminantes através da manipulação dos padrões da fermentação ruminal, de modo que, alterações na composição da flora do rúmen potencializem a síntese de produtos provenientes da digestão dos alimentos, tornando-a mais eficaz e menos dispendiosa em termos de energia (SEGABINAZZI, 2008).

A adição de promotores de crescimento é uma estratégia amplamente empregada nas dietas de confinamentos em razão de ambos os efeitos em melhorar a conversão alimentar (MORRIS et al., 1990; OWENS et al., 1991) e pela sua praticidade no fornecimento da ração diária.

São vários os ionóforos que podem ser usados em dietas de ruminantes, sendo que no Brasil, apenas três são registrados no Ministério da Agricultura e Abastecimento, são eles: Lasalocida, Monensina Sódica e a Salinomicina Sódica.

Os ionóforos comerciais apontam melhorias de 6% na conversão alimentar como resultado da redução do consumo de matéria seca e sem influenciar o ganho de peso diário em gado de corte (DICOSTANZO et al., 1996). Em condições de pastagem, a monensina tem sido reportada por aumentar em até 17% o ganho diário (CHALUPA, 1980; DICOSTANZO et al., 1996).

Corroborando com outros autores, Goodrich et al. (1984) relataram a partir de um estudo proveniente de 228 ensaios que animais em confinamento recebendo grandes quantidades de cereais aumentaram a eficiência alimentar em 6,4%, em bovinos sob pastejo, houve um aumento no ganho de peso de 13,5% a mais que os animais controle.

Alguns dos efeitos benéficos dos ionóforos incluem: aumento da produção de propionato ruminal causado pela modificação dos padrões de fermentação (PERRY et al., 1976), principalmente pela maximização da ação de bactérias gram negativas; redução nas perdas de energia devido à diminuição da produção de metano (RUSSELL; STROBEL, 1989)

e prevenção de desordens digestivas como a acidose (OWENS et al., 1998), devido à manutenção do equilíbrio do pH ruminal.

No metabolismo protéico, Bergen et al. (1984) demonstraram em seus estudos redução da proteólise ruminal e concluíram aumento de 22% a 55% na quantidade de proteína “bypass” observada. Em decorrência da menor taxa de degradação protéica, Chalupa et al. (1980) também relataram diminuição da desaminação de aminoácidos no rúmen.

No tocante à utilização de probióticos, os microrganismos mais habitualmente utilizados incluem várias espécies de Bacteriodes, Bifidobacterium, Lactobacillus, Enterococcus, Pediococcus e Propionibacterium, assim como leveduras do gênero *Saccharomyces* (CUARÓN, 2006). Atualmente cerca de 40 microrganismos diferentes são reconhecidos como seguros para serem utilizados nos alimentos (REGULAMENTAÇÃO 1831/2003/EC).

De acordo com Wallace (1994), o uso de *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae*, ou seus extratos, pode melhorar o ganho de peso e a produção de leite com intensidade semelhante aos ionóforos, em decorrência da resposta ao aumento na ingestão de matéria seca.

Martin e Nisbet (1992) relataram que as culturas de leveduras podem atuar modificando a fermentação ruminal basicamente de duas formas: fornecendo fatores estimulatórios para as bactérias do rúmen e absorvendo o oxigênio que entra no ambiente ruminal. Kamalamma et al. (1996) reportaram que a utilização de leveduras implica em alterações na razão acetato/propionato a partir do crescimento das bactérias ruminais, principalmente as celulolíticas. Esse fato pode gerar aumento da utilização da amônia ruminal e fluxo de proteína microbiana para o duodeno (NEWBOLD et al., 1996).

No entanto, Gattas et al. (2008) não observaram diferenças no padrão de fermentação ruminal com a utilização de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* e citaram inconstância de resultados obtidos na literatura, além do elevado valor econômico dos produtos comerciais disponíveis, o que de fato, inviabilizam sua utilização na pecuária de corte.

Os óleos essenciais também parecem ser alternativa natural como aditivo para o uso de promotores de crescimento em rações destinadas a alimentação animal. Nos últimos sete anos, resgatou-se o interesse que começou a cerca de 50 anos na utilização de tais compostos, o qual foi desestimulado com o uso dos ionóforos (CRANE, 1957).

Pesquisas têm sido conduzidas para avaliar os efeitos de mais de 15 diferentes óleos de plantas na fermentação microbiana ruminal *in vitro* (CARDOZO et al., 2004). Alguns tipos

de óleos essenciais estimularam a fermentação ruminal, enquanto que outros inibem a metanogênese (BROUDISCOU et al., 2002). Já outros tipos de óleos de plantas modificaram a produção e o perfil de ácidos graxos voláteis, o metabolismo de nitrogênio ou ambos (BUSQUET et al., 2006). Araújo (2010) observou resultados promissores ao utilizar óleos essenciais das plantas brasileiras, aroeira vermelha, guaco e arnica, relatando haver aumento nas concentrações de propionato e redução na relação acetato: propionato.

Em consequência de não haver estabelecimento da concentração ativa dos componentes dos óleos e dos métodos de extração (BURT, 2004), portanto, devido à inconstância dos resultados das atuais pesquisas, a utilização desses compostos ainda não tem sido empregada de forma efetiva comercialmente (CALSAMIGLIA et al., 2007).

2.2 QUITOSANA: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES

A quitosana é um polissacarídeo de ocorrência natural que tem revelado versatilidade e propriedades promissoras para sua utilização segura em uma ampla variedade de produtos e aplicações (Quadro 1). A flexibilidade química da molécula de quitosana é uma das vantagens que permite otimização de seu perfil biológico (HEIN et al., 2008; KEAN; THANOU, 2010).

Nas últimas duas décadas a importância deste polímero natural tem crescido significativamente em função de sua bioatividade e biocompatibilidade, assim como por ser fonte renovável e biodegradável (ALLAN; HADWIGER, 1979; SUDARSHAN et al., 1992; SINGLA; CHAWLA 2001). A quitosana vem demonstrando ampla funcionalidade nas aplicações tecnológicas, farmacêuticas e biomédicas, o que representa grande oportunidade para a comunidade científica e industrial (AJUN, 2009; LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

A quitosana é um polissacarídeo oriundo da quitina, sendo esta o segundo polímero mais abundante na natureza, depois somente da celulose. A quitina é um componente dos exoesqueletos de alguns invertebrados (insetos, crustáceos e moluscos) e de paredes celulares de alguns fungos e algas (SENEL et al., 2004). Este polissacarídeo foi isolado pela primeira vez em 1811, pelo francês Henri Braconnot, extraída de fungos superiores e por isso denominada “fungina” (SKAUGRUD; SARGENT, 1990).

A quitosana é derivada da desacetilação da quitina, a qual é formada majoritariamente por unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc) unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, enquanto a quitosana é composta predominantemente por unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN) (Figura 1) unidas pelo mesmo tipo de ligação (ROBERTS, 1994).

Área de Aplicação	Exemplos
Agente antimicrobiano	Bactericida; Fungicida Controle de contaminação em commodities agrícolas
Indústria de filmes comestíveis	Transferência controlada de unidade entre alimentos e meio ambiente Liberação controlada de antimicrobianos Liberação controlada de antioxidantes Liberação controlada de nutrientes, aromas e drogas Controle de temperatura Membranas de osmose reversa
Aditivo	Clarificação e deacidificação de frutas e bebidas Extensor de sabor natural Agente emulsificante Agente estabilizante
Qualidade nutricional	Fibra dietética Agente hipocolesterolêmico Aditivo na pecuária e para peixes Redutor da absorção de lipídios Produção de proteína celular Ingrediente alimentar infantil
Recuperação de material sólido a partir de resíduos de processamento de alimentos	Floculação por afinidade Fracionamento de Agar
Purificação de água	Recuperação de íons metálicos, pesticidas, fenóis e bifenil policlorados Remoção de corantes

Área de Aplicação	Exemplos
Outras aplicações	Imobilização de enzimas Encapsulamento de nutracêuticos Cromatografia Reagentes analíticos

Fonte: Adaptada de Shahidi et al. (1999)

Quadro 1 - Aplicações da quitina, quitosana e seus derivados na indústria de alimentos

Figura 1 – Estrutura química da quitosana

A diferenciação entre a quitina e a quitosana é feita pela porcentagem de unidades GlcNAc e GlcN, sendo o grau médio de acetilação, um parâmetro estrutural importante para suas propriedades físico-químicas e aplicações. A quitosana é biocompatível, não antigênica, atóxica e biofuncional (HIRANO et al., 1990; LI et al., 1992; KEAN; THANOU, 2009, 2010). Além disso, de acordo com Muzzarelli (1997), o composto é metabolizado por enzimas animal, especialmente a lisozima, tornando-a biodegradável.

O polímero derivado da quitina tem sido utilizado com inúmeros interesses nas pesquisas e na prática, entre suas aplicações destaca-se sua utilização na indústria de alimentos como biofilme comestível para prolongar a “shelf-life” dos produtos perecíveis por meio de suas propriedades antimicrobianas (SHAHIDI et al., 1999; ROMANAZZI et al., 2003; ZIVANOVIC, 2005; AIDER, 2010).

Na biomedicina, Thanou e Juninger (2005) descreveram que a quitosana tem potencial aplicação na liberação de fármacos e vacinas, além disso, a literatura reporta vários estudos

2.2.1 Quitosana como antimicrobiano

A eficiência antimicrobiana da quitosana é bem documentada na literatura (MUZZARELLI et al., 1990; SHAHIDI et al., 1999; JEON et al., 2002). A atividade antibacteriana da quitosana foi proposta pela primeira vez por Allan e Hardwiger (1979). De acordo com Tang et al. (2010), esse polissacarídeo possui amplo espectro de ação com doses mínimas inibitórias contra ambas bactérias, gram positivas e gram negativas.

Recentemente os estudos tendem em caracterizar a quitosana preferivelmente como bacteriostático, a literatura considera a quitosana como detentora de atividade bactericida ou bacteriostática, apesar de não elucidar a distinção entre ambos os mecanismos de ação (COMA et al., 2002; POTARA et al., 2011; TAO et al., 2011).

A eficácia bactericida da quitosana deve ser considerada em decorrência de diversos aspectos que podem ser classificados em quatro categorias a seguir: (1) fatores microbianos, relacionadas com a espécie de microorganismo e idade das células (TSAI; SU, 1999; CHEN; CHOU, 2005); (2) fatores intrínsecos da quitosana, incluindo a densidade de carga positiva e concentração (HELANDER et al., 2001; NO et al., 2002; TAKAHASHI et al., 2008), características hidrofílica / hidrofóbica (DUTTA et al., 2004; TIKHONOV et al., 2006; XIE et al., 2007) capacidade quelante (KURITA, 1998; KONG et al., 2008), grau de deacetilação (KONG et al., 2008; GOIRI et al., 2009a) e peso molecular (NO et al., 2002; ZHENG; ZHU, 2003); (3) estado físico (CHUNG et al., 2005; PHAECHAMUD, 2008) e (4) fatores ambientais: força iônica no meio (CHUNG et al., 2003; RAAFAT; SAHL, 2009), pH, temperatura, tempo de reatividade (TSAI; SU, 1999; LIM; HUDSON, 2004; NO et al., 2006).

O mecanismo da atividade antimicrobiana não é bem definido até o momento, mas várias hipóteses têm sido sugeridas. A hipótese mais provável é a mudança na permeabilidade celular devido às interações entre a quitosana policationica e as cargas eletronegativas na superfície da célula.

A quitosana interage com a superfície lipopolissacarídea (LPS) das bactérias gram negativas e da mesma forma com a fração peptideoglicana das bactérias gram positivas, ambas aniônicas. Entretanto, determinados estudos apontam que bactérias gram positivas são mais susceptíveis do que as bactérias gram negativas (WANG, 1992; NO et al., 2002; SENEL et al., 2004; KUMAR et al., 2005,;).

Apesar do amplo espectro de ação supracitado, a quitosana comercial tem uma massa molar média na faixa de $1,0 \times 10^5 - 1,2 \times 10^6$ Daltons (LI et al., 1992). De acordo com Nagaraja et al. (1997), as bactérias gram negativas possuem uma membrana externa que contém porinas com um tamanho limite de 600 Daltons e portanto, pode-se inferir analogia da ação da quitosana comparada à ação dos ionóforos por se tratar também de uma molécula de alto peso molecular.

As modificações químicas sofridas pela molécula podem alterar suas propriedades. O grau de atividade antimicrobiana depende do grau de deacetilação e pH (VÅRUM; SMIDSRØD, 2005). Esta interação gera um escape de eletrólitos e constituintes protéicos intracelulares (YOUNG et al., 1982; SUDARSHAN et al., 1992; FANG et al., 1994; CHIEN et al., 1998; JUNG et al., 1999) capaz de suprimir a célula bacteriana.

Raafat et al. (2009) estudaram o mecanismo de ação da quitosana como antimicrobiano e concluiu que a ligação da quitosana aos polímeros da parede celular bacteriana causam efeitos secundários celulares por desestabilização e posterior interrupção da membrana. Ainda que através de mecanismos desconhecidos, o comprometimento da função da membrana é causado pelas perdas de componentes celulares sem, no entanto, a formação de poros distintos.

Além disso, quando ligada à membrana, a quitosana afeta as vias de geração de energia, provavelmente devido ao comprometimento da organização funcional da cadeia de transporte de elétrons, causando redução da oxigenização adequada e forçando as células à anaerobiose. Todos esses mecanismos levam à disfunção de todo sistema celular. Especula-se ainda que o acúmulo do polímero nas proximidades da membrana desencadeia várias respostas ao estresse devido à diminuição do pH local.

A quitosana também é mencionada por atuar contra fungos e vírus, porém a literatura é escassa a respeito da funcionalidade proposta neste caso. O impacto da quitosana sobre as infecções virais é atribuído à habilidade de indução da resposta imune, como na produção de interferons (RABEA et al., 2003).

Ghaouth (1992) descreveu que o mecanismo antifúngico da quitosana envolve a alteração da morfogenia da parede celular com a presença das moléculas de quitosana interferindo diretamente no crescimento de fungos, similarmente aos efeitos observados em células bacterianas. Porém, os estudos a respeito da atuação da quitosana são recentes e devem ainda gerar maior número de resultados a fim de identificar todos os fatores envolvidos com sua atividade antimicrobiana.

2.2.2 Utilização da quitosana na Medicina Veterinária

A utilização da quitosana na medicina veterinária não tem sido amplamente empregada como na indústria e na medicina humana, porém demonstra potencial utilidade na produção e sanidade animal (SENEL et al., 2004; HUANG et al., 2005; SHI et al., 2005), seja aplicada como aditivo alimentar ou sob a forma terapêutica.

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

Além disso, há relatos documentando os efeitos da quitosana sobre a prevenção da imunossupressão pós cirúrgica (KOSAKA et al., 1996), na cicatrização de feridas em bovinos (OKAMOTO et al., 1996) e na maximização das taxas de cura de mastite em vacas (MOON et al., 1998).

Minami et al. (1997) observaram que o número de fagócitos e suas atividades oxidativas na secreção do úbere, aumentaram apenas um dia após a administração de quitosana em vacas com mastite, enquanto Moon et al. (2007) concluíram que a quitosana é um agente efetivo na prevenção e cura da mastite bovina ocasionada por *S. aureus*, microorganismo que desafia o combate à mastite na pecuária leiteira.

Pusater et al. (2003) realizaram ensaios clínicos em suínos com injúria hepática e concluiu, neste caso que a quitosana melhora significativamente a homeostase nos processos de coagulação. A quitosana tem sido usada como cicatrizante de feridas, uma vez que em âmbito celular o agente estimula células inflamatórias, tais como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e fibroblastos, resultando em aumento de granulação e organização (UENO et al., 1999).

Estudos com quitosana aplicada por 15 dias em lesões abertas no dorso de cães da raça Beagle, foram avaliadas histologicamente e imuno-histoquimicamente. Os resultados obtidos por Ueno et al. (2001) mostraram aumento da infiltração de leucócitos , da formação de tecidos de vascularização e granulação, além do incremento na produção de colágeno tipo III, osteopoetina, macrófagos e interleucinas tipo I.

Na produção de vacinas, Günbeyaz et al. (2010) pesquisaram a quitosana no desenvolvimento de sistema mais eficiente e econômico de imunização contra o herpes vírus bovino tipo I (BHV-1), a qual proporcionasse resposta imune sistêmica e localmente nas mucosas. Neste estudo os autores tiveram êxito na sua utilização como veiculador de antígenos além de facilitar sua aplicação para um grande número de animais.

Além da propriedade de proteção e liberação de vacinas contendo DNA, Zhang et al. (2010) relataram que a quitosana agiu como imunopotencializador contra o vírus New Castle em aves, tornando-a ainda mais eficiente como agente microencapsulante.

A utilização de quitosana como aditivo na alimentação de animais é pouco estudada até o presente, sendo mais desenvolvidos os estudos em monogástricos com o intuito de melhorar a retenção de nitrogênio, eficiência alimentar e crescimentos de frangos de corte (SUK, 2004; HUANG et al., 2005; SHI et al., 2005) e leitões recém desmamados (HUANG et al., 2005).

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

Em ruminantes, a quitosana foi estudada como uma alternativa de fonte de nitrogênio (EL-SEED et al., 2003). No entanto, diferente de estudos com coelhos e frangos, onde a degradabilidade da quitosana mostrou-se entre 88% e 98% (HIRANO et al. 1990), foi concluído que a ausência de degradabilidade ruminal impossibilita seu uso como fonte de N na dieta desses animais.

Recentemente, a quitosana tem sido cogitada como possível moduladora da fermentação ruminal com a finalidade de otimização da eficiência alimentar em ruminantes (GOIRI et al., 2009a). De forma semelhante ao uso proposto em monogástricos, em selecionar microorganismos benéficos que atuam de forma simbiótica com o animal, as propriedades antimicrobianas da quitosana em ruminantes podem ser empregadas como adjuvantes nas melhorias do padrão de fermentação no ecossistema ruminal.

2.3 Utilização da quitosana na alimentação de ruminantes

Em vista dos relatos documentados na literatura a respeito da quitosana e suas propriedades benéficas gerais e, recentemente seu interesse específico como aditivo na nutrição animal, é natural que as pesquisas se voltariam para a classe de animais de produção que geram maiores custos e lucros na pecuária de corte e no comércio mundial, os ruminantes.

No ano de 2008 foram relatados 1.157 artigos sobre a quitosana indexados no PubMed, apesar desta extensa publicação a respeito do assunto somente a partir de 2009, revistas notórias internacionais na área de nutrição animal divulgaram poucos estudos sobre sua utilização como um novo aditivo na alimentação de ruminantes.

O primeiro estudo a respeito da utilização da quitosana teve o intuito de avaliar as características químicas do produto e sua ação na microbiota ruminal. É sabido que o grau de deacetilação da quitosana é uma propriedade que pode intervir diretamente na sua atividade bactericida (KONG et al., 2008).

Deste modo, Goiri et al. (2009c) utilizando seis diferentes tipos de quitosana “*in vitro*”, observaram que o grau de deacetilação >95 do composto, conferiu redução de metano do total de AGCC, aumento do propionato, além da redução da relação acetato. Neste trabalho os autores concluíram que o maior grau de deacetilação da quitosana aumenta a quantidade de energia obtida por unidade de substrato fermentável.

A partir da obtenção da propriedade química ideal do composto, Goiri et al. (2009c) em estudo dose-resposta *in vitro* avaliaram a digestão e fermentação ruminal considerando diferentes substratos, variando a relação volumoso: concentrado. Ao avaliarem como substrato, dietas com alta proporção de forragem (80%), estes autores não observaram alterações na concentração total de AGCC e na proporção molar de acetato, porém houve redução da digestibilidade da matéria orgânica *in vitro* (DIVMO), concentração de butirato e ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR). Em relação ao propionato, houve marcante aumento de sua concentração com o aumento da dose de quitosana além da redução na relação C2:C3.

No mesmo estudo com proporção forragem e concentrado (50:50), os mesmos autores citados anteriormente relataram que o aumento da dose de quitosana não influenciou o total de AGCC e a proporção molar de acetato ou metano, porém diminuiu a DIVMO e a proporção molar de butirato e AGCR. De forma semelhante a dietas com alta proporção de

forragem, houve efeito da dose de quitosana com aumento da proporção molar de propionato e redução da relação C2:C3. Ainda, nas dietas com baixa proporção de volumoso (20%) o aumento da dose de quitosana resultou em redução da DIVMO e da proporção molar de acetato, butirato e AGCR, sendo observada também marcante redução na produção de metano. Novamente os autores observaram aumento na proporção molar de propionato e redução da relação C3:C2.

Os resultados de Goiri et al. (2009c) demonstraram que a dose de quitosana utilizada no estudo *in vitro* influencia a fermentação microbiana ruminal, e que a dose ótima a ser utilizada depende da natureza do substrato utilizado para incubação e da especificação da quitosana utilizada.

A monensina sódica é, sem dúvida, o promotor de crescimento mais amplamente empregado e detentor de vantagens na nutrição animal que geram desafios para a obtenção de um substituto que ofereça todos os seus predicados. Todos os resultados supra descritos de estudos com quitosana em ruminantes se referem a experimentos conduzidos *in vitro*, que gerou a necessidade da avaliação da quitosana em estudos *in vivo*.

Desta forma, o estudo de Goiri et al. (2010) foi o primeiro que utilizou animais com o objetivo de avaliar a quitosana como moduladora da fermentação ruminal. Neste trabalho, Goiri et al. (2010) utilizaram quatro ovelhas não lactantes canuladas no rúmen e forneceram dietas composta por 50% de feno de alfafa e 50% de concentrado, e avaliaram a fermentação ruminal e cecal e a digestibilidade aparente das dietas quando submetidas a dieta controle e com quitosana. De forma similar aos estudos *in vitro*, Goiri et al. (2010) não observaram efeito da quitosana na proporção molar de acetato, porém houve aumento da proporção molar de propionato e redução da relação acetato: propionato e da concentração de N-NH₃.

Analisando os estudos *in vitro* e o estudo *in vivo* que avaliaram quitosana e seus efeitos sobre a fermentação ruminal e digestão, conclui-se que existe grande potencial a ser explorado da utilização de quitosana na alimentação de ruminantes, seja para a produção de leite ou carne.

Porém, não foram encontrados resultados na literatura de pesquisas *in vivo* com bovinos, o que demonstra uma carência de amplo interesse em ser sanada, principalmente para as grandes nações pecuárias, como é o caso do Brasil.

2.3.1 Consumo e Digestibilidade da Matéria Seca

De acordo com Mertens (1994), a ingestão de nutrientes, a digestibilidade e o metabolismo dos alimentos são as maneiras mais eficientes de melhorar o desempenho produtivo dos animais.

O consumo de matéria seca é determinado pelo conjunto de informações e sinais enviados ao centro da saciedade do sistema nervoso central. Em vista disso, a modificação dos produtos finais da fermentação ruminal nas dietas com aditivos moduladores pode ser suficiente para determinar a redução do consumo (ALLEN, 2000), pois em especial, o propionato, apresenta efeito supressor sobre a ingestão de alimentos, uma vez que estimula a síntese e liberação de insulina no sangue.

O efeito mais proeminente da utilização de aditivos moduladores, como por exemplo, os ionóforos na dieta de ruminantes, é aumentar a eficiência alimentar e diminuir a ingestão de matéria seca. Corroborando esta informação, Garcia-Rodriguez et al. (2011) avaliaram a suplementação de quitosana na concentração de 1,2% em ovelhas lactantes alimentadas com feno e concentrado e relatou diminuição no consumo de matéria seca sem, no entanto, prejudicar a produção leiteira dos animais.

A determinação da digestibilidade de um alimento compreende a medida quantitativa dos nutrientes consumidos e as quantidades excretadas nas fezes, sendo definida como a fração do nutriente ingerido que não é recuperado nas fezes. A digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes está intimamente atrelada aos eventos ruminais relacionados com o pH, taxa de passagem e degradabilidade dos alimentos pelos microorganismos (NRC, 2001).

É sabido que a digestibilidade da fibra tem influência direta no consumo da MS em ruminantes e é bem elucidado na literatura que a diminuição desta aumenta o tempo de retenção da digesta no rúmen. Goiri et al. (2010) concluíram que a inclusão de quitosana na dieta de ovelhas tende a diminuir a digestibilidade da fibra, porém não verificou alteração no consumo de matéria seca dos animais.

É escassa a literatura a respeito do consumo e digestibilidade de nutrientes com a utilização da quitosana, sendo necessária fazer suposições e analogias aos ionóforos comerciais por semelhança entre seus mecanismos de ação.

Com respeito à digestibilidade da proteína, com a utilização da monensina, Beede et al. (1986) e Salles e Lucci (2000) observaram melhorias neste coeficiente de digestibilidade com administração de ionóforos. Rodrigues et al. (2001), trabalhando com ovinos, verificaram

que a utilização de monensina aumentou a digestibilidade total da proteína bruta, independentemente do nível de concentrado (25, 50 ou 75% da dieta).

Vacas em lactação mantidas em pastagem apresentaram melhora na digestibilidade aparente do nitrogênio, quando foram suplementadas com monensina (RUIZ et al., 2001). Corroborando com estes resultados, Araújo–Febres e Fernández (1991) relataram as mesmas melhorias com novilhos mestiços Holandês × Brahman, alimentados com dietas de baixo ou alto teor de fibra, suplementadas com monensina.

Acredita-se que a melhora da digestibilidade da proteína bruta com a utilização de ionóforos esteja relacionada com sua menor taxa de deaminação (RUSSELL et al., 1988). Dessa forma, peptídeos e aminoácidos podem ser convertidos em proteína microbiana por cepas resistentes aos ionóforos (YANG; RUSSELL, 1993), melhorando o aproveitamento da proteína disponível (RODRIGUES et al., 2001). Schelling (1984), relatou que o fato de haver maiores quantidades de proteína metabólica podem maximizar a utilização de nitrogênio pelos tecido do animal.

Novamente, Goiri et al. (2009), ao avaliar a digestibilidade aparente total, não observaram efeito da quitosana sobre o consumo e a digestibilidade da matéria orgânica, proteína bruta e extrato etéreo. Desta forma, juntamente com outros dados do estudo, os autores concluíram que a quitosana altera a fermentação ruminal favorecendo o uso mais eficiente da energia, sem, no entanto, reduzir a digestibilidade da matéria orgânica.

2.3.2 Fermentação Ruminal

Como descrito anteriormente, a quitosana possui mecanismo de ação antimicrobiano para diversos tipos de microorganismos. Embora não existam estudos que elucide seu modo de ação especificamente na microbiota ruminal, há algumas hipóteses a serem consideradas e resultados efetivos que possam justificar sua atuação no rúmen.

Analisando os estudos *in vitro* e os estudo *in vivo* que avaliaram a quitosana e seus efeitos sobre a fermentação ruminal, conclui-se que esta quando comparada à monensina sugere efeito similar ou mais amplo em promover melhor eficiência de utilização de energia pelo animal.

Goiri et al. (2009b) compararam duas doses de quitosana contrastando com a utilização da monensina, utilizando a técnica de simulação de rúmen (Rusitec®) e uma dieta com a proporção forragem e concentrado na proporção 50:50. Esses autores evidenciaram aumento na proporção molar de propionato com a utilização dos dois aditivos, porém a quitosana elevou as concentrações de propionato em 21% em relação à monensina.

Goiri et al. (2009b) reportaram que tanto a utilização da quitosana quanto da monensina reduziram a relação acetato:propionato, porém discutiram que no caso da monensina esta redução foi observada somente no primeiro de três períodos avaliados, enquanto que com a quitosana o efeito foi permanente durante todo o experimento, independentemente da dose utilizada.

A eficiência de utilização de ácido propiônico nos tecidos de ruminantes pode ser maior do que a de ácido acético (Smith, 1971) e está associada com menor produção de calor (BALDWIN et al., 1980), de modo que a quitosana pode atuar na conservação de energia durante o fermentação de alimentos para AGCC.

Em ensaios realizados com ovelhas canuladas, Goiri et al. (2010) sugeriram que a quitosana modifica o ecossistema microbiano, particularmente afetando negativamente bactérias celulolíticas e desta forma modula a fermentação tanto ruminal quanto cecal. Essa afirmação é coerente com a diminuição do acetato e butirato observada por esses autores.

Considerando que a monensina atua selecionando as bactérias gram-negativas (RUSSELL; WALLACE, 1997), a produção de ácidos graxos voláteis é modificada. O padrão nas concentrações de AGCC é alterado de modo que há diminuição da proporção molar dos ácidos acético e butírico (MCGUFFEY et al., 2001), com conseqüente redução das produções dos gases metano e carbônico (RUSSEL; STROBEL, 1989) e aumento da proporção de ácido propiônico (NAGARAJA et al., 1981; GANDRA et al., 2009).

Utilizando três diferentes proporções de forragem:concentrado (80:20, 50:50, 20:80), Goiri et al. (2009c) observaram que a quitosana diminuiu as concentrações de butirato como produto da fermentação ruminal *in vitro*

Os ionóforos também exercem controle sobre a produção de lactato, graças à inibição do *Streptococcus bovis*, principal bactéria causadora da acidose láctica (DENNIS et al., 1981), o que resulta na elevação do pH ruminal, sobretudo em dietas com alta porcentagem de grãos (RUSSELL, 1996).

Goiri et al. (2009a) ao utilizarem a quitosana na fermentação de silagem de milho *in vitro*, observou que houve manutenção dos valores de pH dentro das variações fisiológicas, porém, mais elevados que os valores de pH do grupo controle.

As concentrações de amônia ruminal sofrem redução com a utilização de monensina em decorrência da menor degradação de peptídeos e menor deaminação no rúmen (CHALUPA, 1980). A utilização de quitosana em todas as doses reduziu a produção total de gases e a produção de metano. A monensina, no entanto, reduziu a produção total de gases, porém, não alterou a produção de metano.

Segundo Wolin (1960), o balanço estequiométrico de AGV, CO₂ e CH₄ indicam que a síntese de acetato e butirato promovem a produção de CH₄, enquanto que a de propionato reduz o hidrogênio, portanto reduzindo a produção de metano. A maior dose de quitosana reduziu a produção de metano por grama de matéria seca desaparecida, sendo ainda o único tratamento que diminuiu a concentração de N-NH₃ (GOIRI et al., 2009b).

A menor síntese de N-NH₃ é usualmente associada à redução da degradação de aminoácidos (CHALUPA et al., 1980; HORTON, 1980). Sob certas condições de pH ruminal, os grupos NH₂⁺ positivamente carregados da quitosana podem interagir eletrostaticamente com as cargas negativamente carregadas dos grupo carboxila dos aminoácidos, protegendo-os da degradação ruminal (CHIANG et al., 2009).

2.3.3 Síntese de Proteína Microbiana

Determinar a contribuição da Pmic para a exigência de proteína e aminoácidos do hospedeiro tem se tornado ainda mais relevante desde o desenvolvimento dos novos sistemas de proteínas para formulação de ração (BRODERICK; MERCHEN, 1992). E de fato, a Pmic é importante por ser responsável em suprir até 100% da totalidade de proteína metabolizável requerida pelo gado de corte, dependendo do teor de proteína não degradável no rúmen ingerida (NRC, 1996). Ainda, considerando o fato da suplementação protéica ser a fração mais onerosa da dieta, a estimativa da Pmic assume maior significância.

O uso de derivados de purinas (DP) para estimar a síntese de Pmic tem sido uma alternativa às técnicas invasivas (ORELLANA et al., 2001). Chen e Gomes (1992) elucidaram o método de excreção de DP, onde se adota que o fluxo duodenal de ácidos nucléicos é, predominantemente, de origem microbiana e, após digestão intestinal dos nucleotídeos de purinas, as bases nitrogenadas adenina e guanina são catabolizadas e excretadas,

proporcionalmente, na urina como DP, principalmente alantoína, mas, também como xantina, hipoxantina e ácido úrico.

Em bovinos, a alantoína e o ácido úrico constituem 98% dos derivados de purinas excretados na urina, uma vez que, a xantina e a hipoxantina são convertidas a ácido úrico por ação da xantina oxidase (RENNÓ et al., 2000).

Vários fatores que afetam a síntese de P_{mic} no rúmen têm sido abordados por diversos autores, como o teor e a fonte de N e de carboidratos na dieta, a taxa de diluição ruminal, a frequência de alimentação, o consumo de alimento, a relação volumoso:concentrado, a ensilagem, os aditivos da silagem, os ionóforos e o teor de minerais na dieta (STERN; HOOVER, 1979; SNIFFEN; ROBINSON, 1987; DURAND; KOMISARCZUK, 1988).

A utilização da quitosana e sua relação com a síntese protéica microbiana não tem sido estudada até o momento, mas considerando o mecanismo de ação dos ionóforos pode-se fazer algumas implicações a respeito.

A adição de monensina na dieta pode reduzir a síntese de proteína microbiana. Segundo Yang e Russell (1993), o N-NH₃ é a principal fonte de N para a síntese de proteína microbiana e uma forma de se reduzir a fermentação de proteínas alimentares, ou seja, de diminuir a concentração da amônia ruminal, é o controle de bactérias proteolíticas, que pode ser alcançado com a adição da monensina sódica. Neste estudo, os autores concluíram que há diminuição de aproximadamente 10 vezes, na quantidade de bactérias que podem utilizar peptídeos e aminoácidos, mas não carboidratos, como fonte de energia para crescimento com a utilização de monensina.

Da mesma forma, Zinn et al. (1994), utilizando marcadores microbianos observaram diminuição de 14,5% na produção de proteína bacteriana no rúmen pela menor taxa de passagem de N microbiano para o duodeno com a suplementação de ionóforos.

Entretanto, Jalc et al. (1992, 1993) e Jalc e Laukova (2002), utilizando a técnica de simulação ruminal (Rusitec), verificaram que a eficiência de síntese de massa microbiana foi aumentada com a adição de monensina. Da mesma forma, Oliveira et al. (2005) constataram aumento na produção de proteína microbiana em novilhos suplementados e admitiu que, embora o aditivo inibisse a deaminação em âmbito ruminal, pode favorecer a síntese de proteína bacteriana.

A literatura possui uma vasta variedade de relatos a respeito do assunto, porém, muitos resultados controversos, portanto, julga-se necessário seja realizado estudo minucioso com a quitosana para concluir a forma com que este aditivo pode interagir com a síntese de P_{mic}.

2.3.4 Parâmetros Sanguíneos

Também é escassa a respeito da utilização da quitosana e suas implicações na fisiologia e metabolismo de ruminantes. Apenas um estudo analisa poucos parâmetros sanguíneos em animais suplementados com quitosana na dieta.

A análise da bioquímica sanguínea é de grande valia na monitorização clínica da saúde e alterações no metabolismo do animal. Principalmente, em estudos que visam à utilização de um novo componente, ou no caso de um produto já existente, diferentes formas de administração ou veiculação. A análise do perfil bioquímico plasmático é uma ferramenta útil para avaliar a toxicidade de aditivos alimentares (LANGSTON et al., 1985).

Determinadas alterações no âmbito ruminal, proporcionado por aditivos podem ser monitoradas sistemicamente por refletir nos metabolismos de energia, proteína, lipídios e nas enzimas do animal. A concentração de uréia sanguínea tem sido empregada nos perfis metabólicos como indicador do *status* protéico. De acordo com a literatura (PRESTON et al., 1965; HAMMOND, 1983; PITTS et al., 1992), o nitrogênio ureico sanguíneo tem sido utilizado como um indicador , principalmente em comparações qualitativas de fontes e/ou níveis de N ingerido.

A uréia é sintetizada no fígado em quantidades proporcionais à concentração de amônia ruminal e sua concentração no sangue está diretamente relacionada com seus níveis na ração e da relação energia/proteína da dieta (WITTWER et al., 1993).

Trabalhando com bovinos de corte em terminação, a utilização de ionóforos pode alterar expressivamente as concentrações plasmáticas de N ureico (OLIVEIRA et al., 2005; ZEOULA et al., 2008). De acordo com McGuffey et al. (2001), a monensina reduz a deaminação de aminoácidos, podendo reduzir a produção de amônia ruminal e conseqüentemente as concentrações de N-uréico circulantes no plasma.

Em oposição, Duffield, Sandals e Leslie (2008a) reportaram aumento das concentrações de uréia circulante em vacas em lactação suplementadas com monensina. A redução da degradação protéica ruminal proporcionada pelos ionóforos podem refletir em aumento da proteína metabolizável e elevação na produção hepática de uréia. Duffield

Sandals e Leslie (2008b), trabalharam com a adição de diferentes fontes de ionóforos nas rações de bovinos e observou elevação dos teores plasmáticos de uréia em até 6%.

Da mesma forma que as conclusões obtidas por Duffield Sandals e Leslie (2008a), Garcia-Rodriguez et al. (2011) relataram em ensaio realizado com ovelhas lactantes que a inclusão de quitosana no concentrado desses animais resultou em um incremento de 8,9% na concentração de uréia no sangue, e portanto, assim como a monensina, pode estar associada à menor degradação de proteínas e aminoácidos no rúmen (CHALUPA et al., 1980).

Para autores como Payne e Payne (1987), a glicose é sempre um importante componente de escolha no monitoramento do perfil energético de gado de corte. Apesar de bons resultados obtidos com o BHB e AGL, o primeiro é bom indicativo em casos de balanços negativos severos e o segundo possui custo elevado para seu uso recorrente na prática.

As alterações apontadas com a utilização da quitosana nas concentrações de glicose, são referentes ao seu notado aumento, fator coerente com o mecanismo de ação da ruminal do aditivo (GARCIA-RODRIGUEZ, et al. 2011).

De acordo com a literatura, o propionato é o principal substrato da gliconeogênese para ruminantes (YOUNG, 1977) e seu aumento no rúmen é seguido por elevação dos níveis de glicose sanguínea (MAAS et al., 2001). Tanto a adição de ionóforos quanto à de quitosana na dieta de ruminantes tem demonstrado substancial aumento na proporção de propionato do total de AGCC.

Em estudo realizado com ovinos, Goiri et al. (2010) constataram que a suplementação com quitosana implicou uma mudança nos padrões de fermentação no tocante às rotas de energia, o que resultou em aumento da produção de ácido propiônico, principal precursor da glicose em ruminantes.

Garcia-Rodriguez et al. (2011) concluíram que a manutenção da produção leiteira em ovinos com, no entanto, um menor consumo de matéria seca pelos animais, foi causado pelo aumento de 6,5 % na concentração de glicose sanguínea dos animais suplementados com quitosana.

O mesmo efeito, sobre a glicose, pode ser verificado com a utilização de ionóforos (RAUN et al., 1976), sendo esta característica um dos principais mecanismos de ação que releva os benefícios de tais aditivos. O aumento da glicose conferido pelos ionóforos também está relacionado à natureza da dieta. Morris et al. (1990) relataram que trabalhando com monensina e dietas com alta porcentagem de sorgo floculado houve um menor aumento do

propionato e uma menor diminuição do acetato, o que não refletiu no aumento da glicose plasmática.

Goodrich et al. (1984), sugeriram que as bactérias ruminais de animais recebendo forragem podem ser mais sensíveis aos ionóforos que aquelas de animais recebendo dieta contendo concentrado. Thonney et al. (1981) relataram aumento nas concentrações séricas de glicose para animais recebendo lasalocida e consumindo dieta de alto grão.

Apesar de não haver estudos conduzidos com o objetivo de avaliar a concentração de proteínas totais e albumina plasmáticas de animais suplementados com quitosana, de acordo com Kaneko et al. (1997), a alteração das proteínas totais no plasma está relacionada com deficiência na alimentação (dietas com teor de PB menor a 10%) além das causas patológicas como falhas hepáticas, transtornos renais e intestinais, parasitismo e hemorragia. A utilização da quitosana deve ser melhor investigada para elucidar se algum desses parâmetros pode ser influenciado com sua utilização.

A suplementação de ionóforos na dieta de ruminantes tem ação sobre a produção das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase, gamaglutamiltransferase e fosfatase alcalina, tendo em vista que com o maior aporte de propionato e aminoácidos hepático, há conseqüentemente maior atividade enzimática.

Martineau et al. (2007) concluíram que as concentrações séricas de GGT e AST tenderam a ser maiores com a utilização da monensina do que com a lasalocida, sugerindo que a monensina causou de alguma forma maior injúria hepática. Gandra et al. (2009) observaram valores mais elevados de GGT e AST para vacas em lactação que receberam tratamentos com maiores concentrações de monensina, e neste caso atribuiu esse aumento ao intenso metabolismo hepático de nutrientes com a utilização do aditivo.

O modo de ação dos ionóforos assim com se espera que seja com a quitosana, não interfere diretamente no metabolismo de lipídios, sendo este mais intimamente relacionado ao status fisiológico do animal individualmente.

Duff, Galuyean e Branine (1994) reportaram que a utilização de ionóforos para gado de corte não implicou em efeito de tratamento ou tempo para os padrões de colesterol ou triglicerídeos plasmáticos. Algumas evidências sugerem que os ionóforos aumentam a quantidade de lipídios bacterianos. O'Kelly e Spiers (1988) reportaram aumento nas concentrações de colesterol e ácidos graxos quando bovinos de corte recebendo feno de alfafa foram suplementados com monensina. Este aumento foi, presumivelmente, um efeito sobre o aumento da síntese lipídica bacteriana, refletindo em maior quantidade de lipídios disponível para absorção

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL, INSTALAÇÃO E ANIMAIS

A fase experimental e coleta de dados do presente estudo foram conduzidas no Laboratório de Pesquisas em Bovinos de Leite (LPBL) do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, situado no campus Administrativo de Pirassununga, no período de Agosto a Outubro de 2010.

A localização geográfica do campus da USP em Pirassununga é 21°59' de latitude sul e 47°26' de longitude oeste (W.Gr) e altitude média de 635 metros. O clima da região é tropical do tipo Cwa na classificação de Koppen, e a temperatura média anual é de 20,8°C, com precipitação pluviométrica média anual de 1298 mm.

Foram utilizados 8 novilhos castrados da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) com média de peso vivo e idade de 503 kg e 24 meses respectivamente. Os animais foram canulados no rúmen segundo a metodologia descrita por Leão e Coelho da Silva (1980). As unidades experimentais foram agrupados em dois quadrados latinos 4x4 balanceados e contemporâneos, com duração do período experimental de 18 dias, sendo 14 dias de adaptação e 4 dias de coleta de amostras.

Os animais foram mantidos em regime de confinamento, alocados em baias individuais cobertas, tipo *tie stall*, com piso de concreto, dotadas de comedouros de alvenaria e bebedouros automáticos.

3.2 RAÇÕES EXPERIMENTAIS

As dietas fornecidas aos animais em estudo foram compostas por quatro rações durante todo o período experimental, formuladas para serem isonitrogenadas e isocalóricas, de forma a atenderem as exigências nutricionais de novilhos em crescimento com ganho de peso corporal de aproximadamente 1,20 kg/dia, conforme recomendações do NRC (1996).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente para receber as seguintes rações experimentais: 1) Controle (Q0), composta por ração sem a inclusão de quitosana; 2) Quitosana 50 (Q50), com a inclusão de 50 mg/kg de peso corporal de quitosana; 3) Quitosana 100 (Q100), com a inclusão de 100 mg/kg de peso corporal de quitosana; e 4) Quitosana 150 (Q150), com a inclusão de 150 mg/kg de peso corporal de quitosana.

A forragem oferecida foi constituída de silagem de milho, sendo a proporção volumoso: concentrado da dieta de 60:40 respectivamente.

A quitosana utilizada era composta químico-fisicamente pelas seguintes especificações técnicas: densidade aparente 0,64 g/ml, cinzas totais 2,0% máximo, pH 7,0-9,0, viscosidade <200 cPs e grau de deacetilação 95% (Polymar Indústria e Cia. Imp. e Exp. LTDA, Brasil).

A concentração de quitosana de cada animal foi diariamente pesada em papel, dividida igualmente em duas porções, e inoculadas via cânula ruminal duas vezes ao dia, anteriormente ao fornecimento da alimentação da manhã e da tarde. As respectivas rações, água e sal mineral foram fornecidos *ad libitum* durante todo período experimental.

3.3 ANÁLISE DE ALIMENTOS

Diariamente foram feitas as pesagens das quantidades dos volumosos e concentrados fornecidos e das sobras de cada tratamento. Os animais foram arraçoados duas vezes ao dia, às 7:00 e às 14:00 horas, de acordo com o consumo de matéria seca do dia anterior, de forma a ser mantido um porcentual diário de excedente da dieta, entre 5 e 10% para que não houvesse limitação de consumo.

As duas porções constituintes da ração, concentrado e volumoso, foram misturadas no cocho e fornecidas na forma de dieta completa. Ao final de cada período de adaptação era

realizada a coleta e armazenamento a 20°C do *pool* de amostras de alimentos e sobras obtidos durante as coletas para posterior análise de nutrientes.

As análises químico-bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). A proporção dos ingredientes no concentrado e dieta total, assim como a respectiva composição bromatológica das rações experimentais, concentrados e ingredientes encontram-se nas tabelas 3, 4 e 5.

Nos alimentos fornecidos e nas amostras de sobras foram analisados os teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE), proteína bruta (PB), nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) e lignina de acordo com as metodologias descritas por Silva e Queiroz (2002).

Tabela 1 - Proporção dos ingredientes no concentrado e na ração expressos na matéria seca (%MS)

Ingredientes (%)	Concentrado	Ração ¹
Silagem de Milho	-	60,00
Milho moído	70,98	28,70
Farelo de soja	12,30	4,85
Grão de soja	10,29	3,99
Uréia	1,25	0,48
Sulfato de amônia	0,52	0,20
Calcáreo	0,23	0,09
Mistura mineral ²	4,20	1,61
Sal comum	0,23	0,09

¹Composição por quilograma de produto: cálcio- 190g, fósforo-73g, enxofre-30g, magnésio-44g, cobre-340mg, zinco-1350mg, manganês-940mg, cobalto-3mg, iodo-16mg, selênio-10mg, ferro-1064mg, vitamina A-100000, vitamina D-40000, vitamina E-600,0.

Tabela 2 - Composição bromatológica dos ingredientes do concentrado experimental

Nutrientes	SM ⁵	FS ⁶	MM ⁷	GS ⁸
Matéria seca (MS) ¹	26,19	90,35	88,20	91,79
Matéria orgânica (MO) ²	93,73	93,42	98,23	94,63
Proteína bruta (PB) ²	9,18	51,06	9,68	41,95
Nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) ²	4,97	2,63	3,40	2,79
Nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) ²	3,01	0,48	2,09	0,99
Extrato etéreo (EE) ²	2,16	1,94	3,87	19,03
Carboidratos totais (CT) ²	82,39	40,42	84,68	33,65
Fibra em detergente neutro (FDN) ²	57,72	15,00	8,46	21,29
Fibra corrigida para cinzas e proteínas (FDNcp) ²	57,24	13,39	8,11	20,28
Carboidratos não fibrosos (CNF) ²	24,67	25,42	76,22	12,36
Fibra em detergente ácido (FDA) ²	36,63	10,59	4,18	16,37
Fibra em detergente ácido indigestível (FDAi) ²	17,47	0,66	0,54	0,43
Lignina ²	3,38	2,94	2,88	2,90
Matéria mineral (MM) ²	6,27	6,58	1,77	5,37
Nutrientes digestíveis totais (NDT) ³	63,52	78,66	87,52	98,05
Energia líquida (EL) ³	1,37	2,21	2,04	2,73
Energia bruta (EB) ⁴	3739,38	4081,00	3493,00	4947,88

¹Valor expresso em porcentagem da matéria natural; ²Valores expressos em porcentagem da matéria seca;

³Valores estimados pelas equações do NRC (2001); ⁴Obtido com auxílio de bomba calorimétrica. ; ⁵SM: silagem de milho; ⁶FS: farelo de soja; ⁷Milho moído; ⁸GS: Grão de soja

Tabela 3- Composição bromatológica do concentrado e da ração

Nutriente	Concentrado	Ração
Matéria seca (MS) ¹	89,11	51,36
Matéria orgânica (MO) ²	92,69	93,31
Proteína bruta (PB) ²	20,69	13,78
Nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) ²	1,66	3,64
Nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) ²	3,03	3,01
Extrato etéreo (EE) ²	4,91	3,26
Carboidratos totais (CT) ²	67,09	76,27
Fibra em detergente neutro (FDN) ²	10,02	38,64
Fibra corrigida para cinzas e proteínas (FDNcp) ²	9,47	38,13
Carboidratos não fibrosos (CNF) ²	57,07	37,63
Fibra em detergente ácido (FDA) ²	5,91	24,34
Fibra em detergente ácido indigestível (FDAi) ²	0,51	10,68
Lignina ²	2,71	3,11
Matéria mineral (MM) ²	7,31	6,68
Nutrientes digestíveis totais (NDT) ³	82,76	71,21
Energia líquida (EL) ³	2,0	1,62

¹Valor expresso em porcentagem da matéria natural; ²Valores expressos em porcentagem da matéria seca;

³Valores estimados pelas equações do NRC (2001);

O teor de proteína bruta (PB) foi obtido pelo produto da multiplicação do teor de nitrogênio total por 6,25. Os carboidratos totais (CT) foram calculados segundo Sniffen et al. (1992), em que : $CT = 100 - (\% PB + \% EE + \% MM)$. Os teores de carboidratos não-fibrosos (CNF) foram estimados segundo Hall, (1998) onde: $CNF = 100 - [(\%PB - \%PB \text{ Uréia} + \% \text{ Uréia}) + \%EE + \%MM + \%FDN]$.

Os nutrientes digestíveis totais foram calculados conforme equações do NRC (2001), em que: $NDT = CNFD + PBD + (AGD * 2,25) + FDND - 7$, onde PBD, CNFD, FDND e AGD representam o total destes nutrientes digestíveis. Os nutrientes digestíveis totais observados $NDT = PBd + FDNd + (EEd * 2,25) + CNFd$ foram calculados de acordo com Weiss et al. (1992). Os teores de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente neutro livre de cinza e proteína (FDNcp), e fibra detergente ácido (FDA) foram obtidos conforme método descrito por Van Soest et al. (1991), utilizando-se α -amilase e sem adição de sulfito de sódio na determinação do FDN, em Sistema Ankon®.

3.4 DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL

Para estimativa da digestibilidade aparente total dos nutrientes e da matéria seca, as amostras de fezes, silagem e sobras foram coletadas nos 15º, 16º, 17º e 18º dias de cada período experimental. Os “pool” de amostras de cada animal foram acondicionados em sacos plásticos e armazenados em freezer à -20 °C. As amostras de silagem, sobras e fezes foram pré-secas em estufa com ventilação forçada (60°C/72 horas) e processadas em moinho de facas com peneiras de porosidade 2 mm, já as amostras dos demais ingredientes da ração, farelo de soja, milho moído e grão de soja foram processados em moinho de facas com peneiras de porosidade 1mm.

A excreção total de fezes de cada animal foi estimadas pela concentração do indicador interno de fibra em detergente ácido indigestível (FDAi).

Na avaliação das frações químicas dos componentes indigestíveis, utilizou-se 4 repetições de cada amostra pré-seca, as quais foram acondicionadas em sacos de tecido não-

tecido (TNT-100g/m²), com dimensões de 4 x 5 cm, segundo a relação de 20 mg de matéria seca por centímetro quadrado de superfície (NOCEK, 1988).

Segundo metodologia adaptada por Casali (2006), as amostras foram incubadas por 288 horas no rúmen de dois novilhos canulados da raça Nelore, previamente adaptados com concentrado a base de farelo de soja e milho moído e volumoso a base de silagem de milho

Após a retirada do rúmen os sacos foram lavados com água corrente até o total clareamento desta, e imediatamente conduzidos à estufa de ventilação forçada (60°/72 horas). Posteriormente, os sacos foram submetidos ao tratamento com detergente ácido (MERTENS, 2002) por uma hora, em equipamento analisador de fibra Ankon®. Após este período foram lavados com água quente e acetona e secos em estufa não ventilada (105°C/45 minutos), sendo retirados, acondicionados em dessecador (20 sacos/dessecador), e pesados obtendo-se ao final deste tratamento, a concentração de FDAi.

3.5 FERMENTAÇÃO RUMINAL

As amostras de líquido ruminal foram coletadas no último dia de cada período, sendo uma coleta realizada antes da alimentação (0 hora), e seis coletas com intervalos de 2 horas após a alimentação (2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas). Logo após a coleta foram determinados os valores de pH ruminal utilizando potenciômetro. As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP.

No laboratório as amostras foram centrifugadas a 2.000 x g por 15 minutos, 1 mL do sobrenadante foi colocado em tubo de ensaio e adicionando-se 0,2 mL de ácido fórmico P.A., arrolhado e identificado e armazenado em congelador a -20 °C para determinação de ácidos graxos de cadeia curta. Da mesma amostra 2 mL do sobrenadante foi pipetado e armazenado em tubos de ensaio contendo 1 mL de ácido sulfúrico a 1 N, para posterior determinação da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃).

A metodologia utilizada para análise de ácidos graxos de cadeia curta foi preconizada por Erwin et al. (1961), sendo utilizado cromatógrafo a gás (Modelo 9001 Gas Chromatograph, Marca Finnigan) equipado com coluna de vidro de 02 metros de

comprimento x 1/4, empacotada com 80/120 Carbopack B-DA/4% Carbowax 20M. Os gases utilizados foram o nitrogênio como gás de arraste na vazão de 25 mL/minuto, oxigênio como gás comburente na vazão de 175 mL/minuto, e hidrogênio como gás combustível na vazão de 15 mL/minuto. As temperaturas utilizadas do vaporizador foi de 220 °C, do detector de ionização de chamas de 250 °C e da coluna de separação de 195 °C por 3 minutos, aumentando 10 °C/minuto até 200 °C.

Soluções padrão a 0,1 Normal de ácido acético, propiônico e butírico foram preparadas e padronizadas com hidróxido de potássio (KOH) 0,1 Normal, a fim de produzir solução padrão de ácidos graxos voláteis de concentração conhecida. As determinações foram realizadas injetando-se 1 µL de amostra em cromatógrafo integrado a computador, que processava os cálculos de quantificação, utilizando-se do software BORWIN versão 1.21 para cromatografia.

O nitrogênio amoniacal (N-NH₃) foi determinado pelo método de ácido salicílico. Foram adicionados aos tubos contendo amostras de líquido ruminal e ácido sulfúrico a 1 N, 1 mL de tungstato de sódio a 10%, e posteriormente as amostras foram centrifugadas a 1.200 x g durante 15 minutos. Em seguida foram pipetados 25 µL do sobrenadante a um tubo limpo e neste adicionados 5 mL do reagente fenol e 5 mL de hipoclorito.

Os tubos foram agitados para homogeneização das amostras e colocados em banho-maria a 37 °C durante 15 minutos adquirindo coloração azul. Após resfriamento as amostras foram analisadas em espectrofotômetro quanto a sua absorbância e os resultados obtidos foram utilizados em equação de regressão para calcular a concentração em mg/dL, onde: Concentração de N-NH₃ (mg/dL) = Absorbância – (a)/b; b= R² da equação elaborada a partir do padrão.

3.6 SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA

As análises para determinação da síntese de proteína microbiana foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do VNP-FMVZ-USP.

Alíquotas de 50 mL de urina (amostra *spot*) foram obtidas de todas os animais no 16º dia do período experimental, aproximadamente 4 horas após a alimentação, durante micção

espontânea. A urina foi filtrada e alíquotas de 10 mL foram diluídas imediatamente em 40 mL de ácido sulfúrico a 0,036 N para evitar destruição bacteriana dos derivados de purinas e precipitação do ácido úrico.

A excreção urinária diária de creatinina foi estimada a partir da excreção média diária, estabelecida de 27,76 mg/Kg de peso vivo para gado de corte (RENNÓ, 2003). Dessa forma, com a excreção média diária de creatinina e a concentração de creatinina (mg/dL) na amostra *spot* de urina, foi estimado o volume total diário de urina, em litros por animal/dia. As concentrações de alantoína na urina e os de ácido úrico na urina foram determinadas pelo método colorimétrico, conforme metodologia de Fujihara et al. (1987), descrita por Chen e Gomes (1992).

A excreção total de derivados de purinas foi calculada pela soma das quantidades de alantoína e ácido úrico excretadas na urina expressas em mmol/dia. As purinas microbianas absorvidas (Pabs, mmol/dia) foram calculadas a partir da excreção de derivados de purinas (DP, mmol/dia), por meio da equação $Pabs = (DP - 0,236 \cdot PV^{0,75}) / 0,84$, em que 0,84 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados de purina e $0,236 \cdot PV^{0,75}$, a excreção endógena de derivados de purina (ORELLANA BOERO et al., 2001).

A síntese ruminal de compostos nitrogenados (Nmic, gN/dia) foi calculada com base nas purinas absorvidas (Pabs, mmol/dia), utilizando-se a equação (CHEN; GOMES, 1992): $Nmic = (70 \cdot Pabs) / (0,83 \cdot 0,134 \cdot 1.000)$, em que 70 é o conteúdo de N nas purinas (mgN/mol); 0,134, a relação N purina: N total nas bactérias (VALADARES et al., 1999); e 0,83, a digestibilidade intestinal das purinas microbianas.

3.7 BALANÇOS DE ENERGIA E DE NITROGÊNIO

Para obtenção do consumo de energia bruta e realização do cálculo da eficiência do uso de energia consumida, as amostras de silagem, ingredientes e concentrados foram analisadas quanto ao seu teor de energia bruta em bomba calorimétrica, de acordo com Harvatine e Allen (2006). O consumo de energia digestível (CED) foi obtido por meio do coeficiente de digestibilidade das rações experimentais e do consumo de energia bruta, de

acordo com os valores de energia obtidos para os ingredientes e a silagem de milho (HARVATINE; ALLEN, 2006).

O consumo de energia líquida (CEL), os valores de energia líquida de ganho (EL_g) e mudança de peso de corpo vazio (MPCV) foram calculados de acordo com as equações do NRC (2000), a seguir: $CEL \text{ (Mcal/dia)} = 0,703 \times EM \text{ (consumo)} - 0,19 + \{[(0,097 \times EM \text{ (consumo)} + 0,19)/97] \times [EE - 3]\}$; $EM \text{ (consumo)} = 1,01 \times (ED \text{ (consumo)} - 0,45) + 0,0046 \times (EE - 3)$ onde: EM = energia metabolizável; EE = extrato etéreo; ED = energia digestível.

Os valores de energia metabolizável (EM) foram obtidos pela seguinte fórmula: $EM \text{ (Mcal/Kg)} = [1,01 \times \{(\%CNF/100) \times 4,2 + (\%FDN/100) \times 4,2 + (\%PB/100) \times 5,6 + (\%AG/100) \times 9,4 - 0,3\}] - 0,45 + 0,0046 \times (EE - 3,0)$.

A mudança de peso de corpo vazio (MPCV) foi calculada a partir do peso vivo (PV) onde: $PCV = 0,81 \times PV$. A energia líquida de ganho foi calculada através da fórmula: $EL_g = EL \text{ (consumo)} - EL \text{ (manutenção)}$ onde $EL \text{ (manutenção)} = (0,07) \times (PV \times 0,85)^{0,75}$

A eficiência de utilização de energia para ganho de peso foi estimada a partir da relação entre os teores de energia líquida de ganho em função da EM da dieta, segundo Harvatine e Allen (1980).

Para o cálculo de balanço de nitrogênio foi realizada a determinação da concentração de creatinina na urina de acordo com metodologia descrita por Valadares et al. (1999) e Rennó (2003). As amostras *spot* de 50 mL de urina foram obtidas de todos os animais no 16º dia de cada período experimental, quatro horas após a alimentação matinal, durante micção espontânea. As alíquotas de 50 mL de urina (amostra *spot*) foram filtradas e alíquotas de 10 mL foram diluídas imediatamente em 40 mL de ácido sulfúrico a 0,036 N para evitar destruição bacteriana dos derivados de purinas e precipitação do ácido úrico e foram armazenadas a -15 °C para posteriores análises de ácido úrico e alantoína. Uma amostra de urina pura foi armazenada para determinação dos compostos nitrogenados totais, de uréia e creatinina.

As concentrações de creatinina foram determinadas por meio de kits comerciais (Laborlab®), utilizando reação enzimática calorimétrica cinética em aparelho SBA-200 CELM®. Para a realização dessa análise, 100 µL de urina foram diluídos em 4.900 µL de água deionizada. Os resultados obtidos foram calculados pela seguinte fórmula: $Creatinina \text{ (mg/dL)} = creatinina \text{ (mg/dL)} \times 0,020 \times 50$ (BIGGS; COPPER, 1961).

O volume urinário total diário foi estimado dividindo-se as excreções urinárias diárias de creatinina pelos valores observados de concentração de creatinina na urina das amostras *spot*. Dessa forma, com a excreção média diária de creatinina e a concentração de creatinina

(mg/dL) na amostra *spot* de urina, foi estimado o volume total diário de urina, em litros por animal/dia, para o cálculo do balanço de nitrogênio.

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

O nitrogênio total das amostras de urina foi determinado de acordo com as metodologias descritas por Silva e Queiroz (2002), onde a quantidade em gramas de nitrogênio para cada 100 mL de urina foi obtido dividindo-se o valor de proteína bruta das amostras pelo fator 6,25.

O balanço de nitrogênio foi obtido subtraindo o total de nitrogênio em gramas consumido pelos valores de nitrogênio na urina e fezes, obtendo-se os valores de nitrogênio retido em gramas e em porcentagem de nitrogênio total.

3.8 PARÂMETROS SANGUÍNEOS

As coletas de sangue foram realizadas no 17º dia de cada período experimental por punção da veia jugular, anteriormente ao fornecimento das rações no período da manhã. As amostras foram coletadas em tubos vacuolizados (*vacutainer*) de 10 mL para dosagem dos parâmetros sanguíneos glicose, colesterol total, proteínas totais, albumina, uréia e nitrogênio uréico, as enzimas aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamil transferase (GTA).

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

As análises das concentrações dos parâmetros sanguíneos foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP, por meio de kits comerciais (Laborlab® e CELM®) que utilizam método enzimático colorimétrico de ponto final, sendo a leitura realizada em analisador

automático de bioquímica sanguínea (Sistema de Bioquímica Automático SBA-200 CELM®).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e regressão polinomial pelo comando PROC MIXED do programa Statistical Analysis System versão 9.2 (SAS, 2009), para um delineamento quadrado latino 4x4 e considerando cada animal uma unidade experimental. Os dados de AGV, pH e concentrações de nitrogênio amoniacal no líquido ruminal foram submetidos ainda ao comando REPEATED do PROC MIXED para avaliação de medidas repetidas no tempo. Para cada variável, o animal será submetido a quatro estruturas de covariâncias: uma ordem auto-regressivo, Toeplitz, componentes de variância e simetria composta. A estrutura de Akaike foi utilizada o que permite maiores critérios de informação. Para as variáveis medidas ao longo do tempo, o modelo incluiu o tratamento (dieta), o tempo e a interação entre o tempo e o tratamento como efeitos fixos. Para todas as variáveis foi utilizado efeito aleatório de animal dentro do quadrado. As médias foram ajustadas pelo LSMEANS e analisadas pelo teste de Tukey ajustado do PROC MIXED. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $P < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONSUMO E DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL

A inclusão de quitosana nos tratamentos não afetou as variáveis de consumo avaliadas ($P > 0,05$), com exceção da fibra. Os efeitos da quitosana sobre o consumo e digestibilidade aparente total da MS, MO, PB, FDN, EE, CT, CNF e NDT em novilhos está demonstrado na tabelas 4 e 5.

Na adição da concentração de 150 mg/kg de PV de quitosana observou-se efeito quadrático com menores valores sobre o consumo de FDN, expressos em kg/dia ($P < 0,05$) e em porcentagem de peso vivo do animal ($P < 0,05$). No entanto, o CFDN foi similar ao do tratamento controle.

Partindo do pressuposto de que a quitosana possui características de modulação da fermentação ruminal, a população microbiana pode ser alterada podendo assim modificar os processos digestivos e conseqüentemente o consumo de nutrientes.

Atribuindo analogia ao mecanismo de ação da quitosana com os ionóforos, de acordo com Eifert et al. (2005), a diminuição no consumo da fibra com a utilização da monensina, pode ser explicada pela redução de sua digestibilidade.

Porém, no presente estudo houve aumento linear na digestibilidade do FDN ($P < 0,05$), resultando num incremento de 7,01% (Q0 vs. Q150). Além disso, não houve restrição no CMS ($P > 0,05$) e ocorreu aumento do CDMS ($P < 0,05$).

Tabela 4- Média e erro padrão da média (EPM) dos consumos de matéria seca e nutrientes em função dos tratamentos

Variável	Tratamentos ¹				Média	EPM	Valor P^2	
	Q0	Q50	Q100	Q150			L	Q
Kg/dia								
CMS	8,26	8,49	8,39	8,25	8,35	0,16	0,873	0,307
CMO	7,71	7,92	7,82	7,73	7,80	0,15	0,938	0,353
CPB	1,19	1,23	1,21	1,19	1,21	0,02	0,846	0,341
CEE	0,30	0,30	0,30	0,29	0,30	0,00	0,334	0,662
CCT	6,21	6,38	6,31	6,23	6,28	0,12	0,995	0,355
CFDN	2,99	3,06	3,09	2,91	3,01	0,07	0,399	0,037
CCNF	3,21	3,32	3,21	3,46	3,30	0,09	0,292	0,596
CNDT	5,99	6,15	6,03	5,97	6,03	0,12	0,776	0,410
% PV								
CMS	1,48	1,54	1,52	1,49	1,51	0,02	0,973	0,253
CFDN	0,54	0,55	0,56	0,52	0,54	0,01	0,483	0,045

¹ Tratamentos Q0; Q50; Q100 e Q150 se referem à inclusão de, respectivamente, 0, 50, 100 e 150 mg/kg de peso corporal de quitosana colocada diretamente no rúmen. ² Probabilidades de resposta linear (L) ou quadrática (Q).

Araújo-Febres e Fernández (1991) constataram que em dietas com baixo ou alto teor de fibra fornecida à novilhos mestiços Holandês-Brahma, a suplementação de monensina promoveu aumento da digestibilidade da matéria seca e do FDN, o que de acordo com Spears (1990) está relacionado com o maior tempo de retenção ruminal do alimento, promovido pelo ionóforo, permitindo assim mais tempo para a digestão microbiana.

Nestes casos, considerar a máxima digestibilidade da ração pela maior permanência do alimento no trato gastrointestinal pode como consequência, reduzir o nível de ingestão e comprometer o desempenho dos animais.

Outro fator apontado como o principal responsável pela redução na digestibilidade do FDN seria a redução do pH, o que resulta em diminuição da atividade fermentativa pela população fibrolítica (ERFLE et al., 1982; MOULD et al., 1983; HOOVER, 1986; CALSAMIGLIA et al., 2002), porém essa causa não concorda com os resultados obtidos nesse estudo (Tabela 6).

Tabela 5– Média e erro padrão da média (EPM) para os coeficientes de digestibilidade aparentes totais da matéria seca e nutrientes em função dos tratamentos

Variável	Tratamentos ¹				Média	EPM	Valor P^2	
	Q0	Q50	Q100	Q150			L	Q
CDMS	64,66	67,59	68,35	69,01	67,40	0,73	0,020	0,355
CDMO	66,66	69,45	70,00	70,72	69,21	0,74	0,041	0,430
CDPB	63,12	64,92	66,49	67,51	65,51	0,81	0,040	0,793
CDEE	80,39	80,24	80,27	83,80	81,17	1,53	0,296	0,398
CDCT	66,64	69,80	70,30	70,70	69,36	0,74	0,034	0,275
CFDN	56,62	60,19	60,69	60,59	59,52	0,72	0,048	0,175
CCNF	75,85	78,84	79,19	79,59	78,37	0,98	0,168	0,480
NDT	68,07	70,97	71,59	72,10	70,68	0,74	0,047	0,378

¹ Tratamentos Q0; Q 50; Q100 e Q150 se referem à inclusão de, respectivamente, 0, 50, 100 e 150 mg/kg de peso corporal de quitosana colocada diretamente no rúmen.² Probabilidades de resposta linear (L) ou quadrática (Q).

Em oposição aos nossos resultados, Goiri et al. (2009c), em trabalhos realizados com quitosana *in vitro* observaram diminuição na digestibilidade de FDN, porém Goiri et al. (2010), concluíram que a inclusão de quitosana na dieta de ovelhas não restringiu a digestibilidade da fibra assim como não alterou o consumo dos animais.

Vários estudos têm demonstrado que as bactérias gram-positivas são mais susceptíveis à quitosana do que as bactérias gram negativas (WANG, 1992; NO et al., 2002; KUMAR et al., 2005) e portanto, a redução da digestibilidade de FDN com seu uso pode depender da fonte de fibra utilizada, assim como da composição da dieta (SPEARS, 1990).

Aumentando-se a inclusão de quitosana na dieta houve aumento da digestibilidade da MS e MO ($P < 0,05$). Estes resultados concordam com o reportado na literatura com a utilização de ionóforos (HALL, 2000; MCGUFFEY et al., 2001) e coerentes com o aumento da digestibilidade do FDN, razão que pode intervir diretamente na MS (NRC, 1996).

Goiri et al. (2009c), comparando a digestibilidade *in vitro* da MO com o uso da quitosana ou monensina, verificou que a quitosana é semelhante à monensina em diminuir a digestibilidade da matéria orgânica. Porém, concluiu que a natureza do substrato fermentável assim como a dose de quitosana pode diminuir esse coeficiente.

Toda a informação em questão leva a conclusão de que a fonte de fibra, a proporção volumoso: concentrado e as concentrações de quitosana oferecidas no presente experimento não favoreceu decréscimo para os coeficientes de digestibilidade.

Atualmente a literatura é escassa sobre o uso da quitosana como modulador de fermentação ruminal, refletindo poucos resultados nos parâmetros de ingestão e metabolismo dos nutrientes. Os resultados obtidos juntamente ao já documentado com a utilização de ionóforos não permitem conclusões coesivas a respeito da digestibilidade da fibra, parâmetro este, primordial nos estudos de nutrição de ruminantes.

Houve melhor digestibilidade da PB ($P < 0,05$) para os animais à medida que se aumentou a concentração de quitosana na dieta, o que conferiu um aumento de 6,5 % para Q0 vs. Q150.

Rodrigues et al. (2001) verificaram que a utilização de monensina aumentou a digestibilidade total da proteína bruta, independentemente do nível de concentrado (25, 50 ou 75% da dieta) utilizado para ovinos. Acredita-se que a melhora da digestibilidade da proteína bruta com aditivos moduladores esteja relacionada com sua capacidade de reduzir a deaminação protéica (RUSSELL; STROBEL, 1988).

Van Soest (1994) reportou que os ionóforos podem reduzir a digestibilidade da proteína bruta e da matéria orgânica em dietas que contêm predominantemente fontes de concentrado rapidamente fermentáveis uma vez que a proteína solúvel do feno e da silagem possui alta concentração de nitrogênio não-protéico em comparação ao concentrado.

Apesar dos animais suplementados com maiores concentrações de quitosana possuírem consumo e digestibilidade numericamente maiores para CNF, ambos os parâmetros não foram significativos ($P > 0,05$).

A digestibilidade do EE não foi influenciada pelo tratamento e manteve seus níveis em torno de 80%. A digestibilidade dos carboidratos totais foi influenciada positivamente com o aumento das concentrações de quitosana na dieta ($P < 0,05$), provavelmente como reflexo da digestibilidade do FDN. Foi hipotetizado neste estudo que a digestibilidade dos nutrientes não seria influenciada negativamente pela adição de quitosana na dieta, teoria esta aceita, pois as inclusões de concentrações crescentes de quitosana na dieta implicaram na maior digestibilidade dos nutrientes totais ($P < 0,05$), resultando em aumento linear crescente de 68,07; 70,97; 71,59 e 72,10 para Q0, Q50, Q100 e Q150 respectivamente.

4.2 FERMENTAÇÃO RUMINAL

Todos os parâmetros de fermentação estudados foram influenciados pelo tempo após alimentação ($P < 0,05$). Os resultados discutidos a seguir podem ser visualizados na tabela 6.

Não houve diferença para os valores de pH ruminal ($P > 0,05$) com a inclusão do aditivo, obtendo-se média entre os tratamentos de 6,34. Igualmente não foi demonstrada diferença na interação tratamento x tempo ($P > 0,05$). Esta diferença pode não ter sido elucidada por ser tratar de uma dieta de “baixo grão” (Tabela 1), o que permite atividade tamponante ruminal fisiológica mesmo sem a inclusão da quitosana.

Não houve diferença para as concentrações de N-NH₃ com o aumento da inclusão de quitosana na dieta ($P > 0,05$), porém constatou-se efeito quadrático com redução no tratamento Q150 ($P < 0,05$).

Tabela 6– Efeito das diferentes concentrações de quitosana nos perfil da fermentação ruminal

Item	Tratamentos ¹				EPM	Valor P^2				
	Q0	Q50	Q100	Q150		Trat	T	Trat x T	L	Q
pH	6,34	6,33	6,37	6,34	0,02	0,719	<0,001	0,770	0,649	0,901
N-NH ₃ , mg/dL	15,46	18,17	17,64	15,65	0,52	0,108	<0,001	0,995	0,994	0,015
AGCC, mM										
Total	105,91	105,73	106,27	103,74	2,48	0,662	<0,001	0,634	0,396	0,452
Acetato	72,99	72,74	72,71	70,30	1,55	0,208	<0,001	0,637	0,077	0,293
Propionato	21,04	20,88	21,66	22,08	0,72	0,122	<0,001	0,796	0,029	0,470
Butirato	11,87	12,10	11,90	11,34	0,36	0,145	<0,001	0,762	0,099	0,102
AGCC, %										
Acetato	69,17 ^a	69,00 ^a	68,67 ^a	67,97 ^b	0,33	<0,001	<0,001	0,988	<0,001	0,121
Propionato	19,66 ^{bc}	19,57 ^c	20,20 ^b	21,13 ^a	0,32	<0,001	<0,001	0,999	<0,001	0,003
Butirato	11,17 ^{ab}	11,42 ^a	11,12 ^{ab}	10,89 ^b	0,18	0,023	0,012	0,989	0,040	0,043
C2:C3 ³	3,58 ^a	3,58 ^a	3,48 ^a	3,27 ^b	0,07	<0,001	<0,001	0,977	<0,001	0,003

¹ Tratamentos Q0; Q50; Q100 e Q150 se referem à inclusão de, respectivamente, 0, 50, 100 e 150 mg/kg de peso corporal de quitosana colocada diretamente no rúmen. ² Valor de P observado para tratamento (Trat), tempo (T) e interação tratamento vs. tempo (Trat x T), contrastes linear (L) and quadrático (Q). ³ C2:C3: proporção acetato-propionato. Médias em uma mesma linha com diferentes letras diferem ($P < 0,05$).

O fato de ocorrer uma diminuição da amônia ruminal pode ser indicativo de menor taxa de deaminação da proteína bruta da dieta pela microflora ruminal e conseqüentemente maior fluxo de aminoácidos para o intestino delgado e melhor aproveitamento de nitrogênio pelos tecidos (TOLBERT et al., 1978; SCHELLING, 1984). Em bovinos alimentados com monensina também se observa menores concentrações ruminiais de amônia (CHALUPA,

1980), em decorrência da ação dos ionóforos sobre as atividades proteolíticas e deaminativas de bactérias fermentadoras de aminoácidos (BERGEN; BATES, 1984; YANG; RUSSEL, 1993).

Russell et al. (1988), utilizando técnicas clássicas de isolamento, identificaram duas bactérias, *Peptostreptococcus spp.* e *Clostridium spp.*, que produziam de 18 a 39 vezes mais amônia do que outras espécies ruminais conhecidas. Ambas são gram positivas e requerem aminoácidos como fonte de crescimento (MCGUFFEY et al., 2001).

O fato de haver menor produção de $N-NH_3$ e conseqüentemente, indicar maior fluxo de proteína para o duodeno implica ter havido melhoria no desempenho já que se constatou também melhor digestibilidade da proteína da dieta (Tabela 5).

A concentração de amônia também é dependente do pH ruminal, pois quanto menor o valor de pH, menor o nível de amônia (ERFLE et al., 1982). No caso dos ionóforos, há, portanto, maior eficiência da monensina no controle da produção de amônia em dietas que proporcionam pH mais alto (LANA et al., 1998).

Neste experimento o pH manteve-se em valores elevados (média de 6,34) e espera-se que a quitosana tenha promovido diminuição da concentração ruminal de amônia.

Goiri et al. (2010), trabalhando com quitosana na dieta de ovelhas descartaram a hipótese de que a diminuição nas concentrações de $N-NH_3$ pelo uso da quitosana seja em função de sua maior assimilação para produção de proteína microbiana, justamente por causa da atividade antimicrobiana do aditivo. O presente trabalho também não encontrou aumento da Pmic em função do tratamento (Tabela 7).

A inclusão de quitosana na dieta não causou diferenças nas concentrações totais de AGCC ($P>0,05$), porém alterou as proporções molares de AGCC individualmente.

Houve aumento das concentrações de propionato (mmol/L) com o aumento dos níveis de quitosana ($P<0,05$) e de forma semelhante houve efeito linear crescente de 7,47% ($P < 0,001$) e quadrático ($P<0,05$) para as porcentagens molares de propionato. Esses resultados demonstram que a adição de quitosana na dieta modifica a fermentação ruminal desviando para rotas energeticamente mais eficientes.

O propionato contribui com cerca de 32 a 73% da gluconeogênese hepática, sendo o maior precursor de glicose para o animal (SEAL; REYNOLDS, 1993). Goiri et al. (2010) trabalhando com quitosana na concentração 136 mg/Kg de PV para ovelhas obtiveram resultados semelhantes ao desse estudo e conferiu aumento de 21,48% na proporção de propionato.

O aumento do propionato também foi relacionado com um maior aumento na retenção de nitrogênio em ruminantes (ESKELAND et al., 1974), esses dados juntamente com os resultados de digestibilidade e $N-NH_3$ obtidos no presente trabalho reforçam o conceito de que a quitosana pode proporcionar as mesmas vantagens dos ionóforos como a melhoria na conversão alimentar (CHALUPA, 1977).

Foi observada tendência na diminuição das concentrações de acetato com a utilização da quitosana ($P=0,07$) e um decréscimo efetivo quando analisamos suas proporções molares ($P<0,001$). Este resultado corrobora com Goiri et al. (2010), os quais sugerem que a quitosana pode alterar o ecossistema ruminal, especialmente atuando em bactérias celulolíticas e desta forma modificar a atividade fermentativa. Fato também demonstrado com o desvio linear ($P<0,001$) e quadrático ($P<0,05$) na relação acetato:propionato obtendo-se menores valores desta com a adição de 150mg/Kg de PV de quitosana diariamente. A redução da proporção acetato: propionato é verificado com a utilização de monensina (RICHARDSON et al., 1976; WALLACE et al., 1980) e também foi reportado com o uso da quitosana (GOIRI et al., 2010), o que justifica o efeito potencial modulador desse aditivo entre diferentes populações microbianas ruminais. Uma das vantagens de reduzir essa relação é a redução do incremento calórico metabólico, pois o ácido propiônico produz menor quantidade de calor no seu processo de formação (BERGEN; BATES, 1984).

Houve efeito linear decrescente para a proporção molar de butirato ($P<0,05$), o que confirma o incremento da participação de bactérias gram-negativas alterando os produtos finais de fermentação (MCGUFFEY et al., 2001), a exemplo do que pode ser visto no caso da monensina, que tem seu mecanismo de ação já bem elucidado em inibir bactérias gram-positivas (KONE et al., 1989), tal como a *Butyrivibrio fibrisolvens*, produtoras de butirato (CHEN; WOLIN, 1979).

Deste modo, o perfil de fermentação ruminal do presente trabalho sugere, de acordo com a literatura, semelhança do mecanismo de ação da quitosana aos ionóforos comerciais com notado aumento da proporção molar de ácido propiônico no rúmen e redução na proporção de ácidos acético e butírico (RICHARDSON et al., 1976; NAGARAJA et al., 1981).

Em decorrência da diferença da produção e utilização do hidrogênio metabólico, a importância da modulação das proporções de AGCC no rúmen se dá pela eficiência da fermentação das hexoses para acetato, butirato e propionato (62%, 78% e 109% respectivamente) (CHALUPA, 1977). Além disso, os ruminantes demonstram uma das suas

maiores ineficiências metabólicas ao produzirem acetato e butirato pela perda de energia alimentar na formação de CO₂ e CH₄ (RUSSEL; STROBEL, 1989).

4.3 SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA

Não houve diferença ($P>0,05$) nas excreções diárias em Mmol/L de alantoína e ácido úrico na urina assim como para a produção de urina em L/dia, entre os diferentes tratamentos experimentais (Tabela 7). De forma semelhante, não houve diferença nas concentrações em Mmol/dia de alantoína, ácido úrico e derivados de purinas, alantoína em % de proteína microbiana total e purinas absorvidas. Não foi observada diferença ($P>0,05$) para a produção de nitrogênio microbiano e proteína bruta microbiana, em g/dia com a inclusão de quitosana na dieta.

Tabela 7– Média e Erro padrão da média (EPM) da síntese de proteína microbiana em função dos tratamentos

Variável	Tratamentos ¹				Média	EPM	Valor P^2	
	Q0	Q50	Q100	Q150			L	Q
Mmo/L								
Al-urina	11,41	8,55	9,50	10,95	10,10	0,83	0,945	0,148
Ac-úrico	1,16	0,88	0,74	1,04	0,96	0,08	0,352	0,023
Mmol/dia								
Al-urina	85,50	89,76	77,35	105,07	89,42	6,40	0,347	0,289
Ac-úrico	9,01	9,17	6,54	10,03	8,69	0,70	0,943	0,225
DP	19,35	19,21	19,23	19,33	19,28	0,13	0,934	0,208
Al% PT	90,11	90,56	91,93	91,00	90,90	0,57	0,449	0,562
Pabs	89,49	94,90	76,99	114,01	93,84	8,21	0,376	0,265
g/dia								
PN mic	56,31	59,73	48,45	71,75	59,06	5,16	0,376	0,265
PB mic	352,02	373,33	302,85	448,48	369,16	32,30	0,376	0,265
L/dia								
ETU	8,04	11,05	9,09	9,67	9,46	0,53	0,521	0,243

¹ Tratamentos Q0; Q50; Q100 e Q150 se referem à inclusão de, respectivamente, 0, 50, 100 e 150 mg/kg de peso corporal de quitosana colocada diretamente no rúmen. ² Probabilidades de resposta linear (L) ou quadrática (Q). ³ PT= proteína total microbiana. ⁴ N mic = nitrogênio microbiano. ⁵ PB mic = proteína bruta microbiana.

Os resultados supracitados revelam, portanto, não haver efeito da quitosana sobre a síntese de proteína microbiana com a utilização da quitosana. Esse resultado era esperado já que não foram conferidas alterações no N-NH₃ (Tabela 8) entre os tratamentos. De acordo com Russell et al. (1992) é de fundamental importância a síntese de proteína microbiana e, para que esta ocorra, é necessário que se tenha proteína degradável no rúmen (PDR) em quantidade e qualidade (amônia - NH₃, peptídeo e aminoácidos), com o objetivo de atingir a máxima eficiência microbiana.

Apesar de não ter havido diferença no N e PB microbianas, ambos os fatores demonstraram valores numéricos notadamente maiores com o tratamento Q150. Esse fato pode ter sido em decorrência de um maior aproveitamento da energia disponível, a qual também se mostrou com a inclusão de quitosana em questão, pois de acordo com Chalupa (1980), outro fator que poderia diminuir a síntese de proteína microbiana seria o decréscimo das proporções molares de ácidos graxos de cadeia curta.

As dietas oferecidas neste trabalho foram calculadas para que fossem isonitrogenadas e possuíam a mesma fonte de proteína, o que também pode justificar a ausência de alteração na Pmic.

A partir do NRC (1996), as exigências de proteína foram divididas em exigência animal e exigência dos microorganismos ruminais. A Pmic supre de 60 a 85% as requisições de manutenção, crescimento, gestação e lactação em ruminantes (TIMMERMANS et al., 2000) sendo portanto, de extrema importância para atender as demandas nutricionais do animal.

Os valores em porcentagem de alantoína não foram significativos entre os animais recebendo os diferentes tratamentos ($P>0,05$). Costa et al. (2006) relatou não ter havido resposta na produção microbiana (purinas microbianas absorvidas e N microbiano) em decorrência à adição de ionóforos na dieta de novilhas Pardo-Suiço.

Chen e Gomes (1992) relataram que a proporção de alantoína em relação às purinas totais é de 80-85% em bovinos, sendo observada neste estudo uma média de 90,9 %. Rennó et al. (2008) trabalhando com novilhos de diferentes grupos genéticos e considerando a proporção 50 % concentrado e 50% volumoso na dieta verificaram média de 91% nas proporções de alantoína em relação à excreção de derivados de purinas totais.

Valero (2010), em estudos com monensina sódica não evidenciaram diferenças na síntese de proteína microbiana (g/dia) nem na eficiência de síntese microbiana (g/100g NDT). O valor médio para eficiência microbiana, quando expresso em g de PBmic/kg de NDT consumido, foi 62,53g PBmic/kg de NDT, que foi inferior aos valores de 130 g PBmic/kg de NDT empregado pelo NRC (1996).

A maior eficiência na produção microbiana está relacionada com o sincronismo de energia e proteína, e tendo em vista os mecanismos de ação da quitosana, possivelmente há a seleção de microrganismos que são mais eficientes na síntese da proteína microbiana, pela maximização do conteúdo energético fermentável.

Não houve diferença para a proteína bruta microbiana assim como não foi constatado efeito das concentrações de quitosana utilizadas sobre o N microbiano ($P > 0,05$). De acordo com Russel (1996), a utilização de certos moduladores de fermentação ruminal, como os ionóforos, pode reduzir a produção de amônia no rúmen, limitando a disponibilidade de N para a produção da proteína microbiana.

Segundo Stern e Hoover (1979), para variadas situações, cerca de 40 a 100% dos compostos nitrogenados microbianos podem ser derivados dos compostos nitrogenados amoniacais. Já havia sido demonstrado no presente estudo que não houve diferença da amônia para justificar alteração na síntese de proteína microbiana.

4.4 BALANÇOS DE ENERGIA E DE NITROGÊNIO

Não foram observadas diferenças para os consumos de EB, ED e EL em Mcal/dia com a inclusão das concentrações de quitosana na dieta dos animais em estudo ($P > 0,05$). A tabela 8 ilustra os resultados referentes ao balanço energia discutidos a seguir.

A produção de energia líquida de ganho (EL_g), assim como a mudança de peso corporal vazio (MPCV) não sofreram diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$).

O presente experimento não teve como objetivo trabalhar com desempenho animal por se tratar de digestão e metabolismo. Ainda assim, de acordo o preconizado pelo NRC (1996), a EL_m corresponde a $0,077 \text{ Mcal/ PV}^{0,75}$ para raças européia e considerada 10% menor para animais zebuínos. Neste estudo, os valores de energia obtidos atende às necessidades de manutenção e produção dos animais.

Tabela 8- Efeito das concentrações de quitosana sobre a eficiência de utilização de energia e o balanço energético

Variável	Tratamentos ¹				Média	EPM	Valor <i>P</i> ²	
	Q0	Q50	Q100	Q150			L	Q
<i>Consumo</i>								
EB (Mcal/dia)	30,09	30,92	30,56	30,04	30,40	0,60	0,859	0,294
ED (Mcal/dia)	19,47	20,86	20,79	20,60	20,43	0,38	0,150	0,126
EL (Mcal/dia)	13,81	14,23	13,90	13,97	13,98	0,29	0,921	0,570
<i>Produção</i>								
EL _g (Mcal/dia)	6,72	7,19	6,87	6,91	6,92	0,27	0,861	0,508
MPCV (Kg/dia)	0,98	0,99	0,71	0,78	0,87	0,07	0,209	0,850
<i>Balanço de Energia</i>								
EL (Mcal/dia)	7,09	7,04	7,03	7,05	7,05	0,05	0,486	0,381
<i>Eficiência energética</i>								
EL _g /CED	0,34	0,33	0,32	0,33	0,33	0,01	0,525	0,569

¹ Tratamentos Q0; Q 50; Q100 e Q150 se referem à inclusão de, respectivamente, 0, 50, 100 e 150 mg/kg de peso corporal de quitosana colocada diretamente no rúmen.² Probabilidades de resposta linear (L) ou quadrática (Q).

Não houve efeito das concentrações de quitosana utilizadas sobre o balanço de energia dos animais ($P>0,05$) assim como não foram constatadas diferenças para a eficiência energética com a inclusão do aditivo ($P>0,05$).

Na ausência de diferença entre os balanços de energia obtidos, não pode-se concluir que a quitosana reflete um balanço de energia mais favorável, porém o fato de não ter ocorrido diferenças nos balanços de energia com a inclusão da quitosana não é coerente com os demais resultados obtidos, principalmente, quanto à fermentação ruminal, onde houve notado aumento do propionato a favor dos tratamentos (Tabela 6).

Raun et al. (1976) observaram um aumento de apenas 3,0% a 6,0% na energia metabolizável disponível para o animal com a utilização de ionóforos e apesar disso atribuiu a alteração na proporção molar de AGVs ao aumento no ganho de peso (até 11,0%) e aumento da eficiência de utilização dos alimentos (até 17,0%).

O acréscimo no desempenho dos animais sem provocar grandes alterações na EN retida, levou estes pesquisadores a concluir que o aumento na disponibilidade de energia não é o único benefício alcançado com a utilização de aditivos, sendo que o aumento do propionato poderia estar ainda, relacionado ao menor incremento calórico (SMITH, 1971) e à proteção de

aminoácidos normalmente usados na gliconeogênese (BEEDE et al., 1986; FUNK et al., 1986).

A literatura a respeito da utilização da quitosana na nutrição de ruminantes é escassa e, portanto, não há embasamentos anteriores para afirmar que o aditivo não favorece positivamente o balanço de energia dos animais suplementados.

O balanço de nitrogênio é importante na avaliação do equilíbrio nitrogenado do animal e se, sob determinadas condições alimentares, ocorre ganho ou perda de N (KOLB, 1984). Os resultados para o consumo de nitrogênio (NT), excreção fecal de nitrogênio (NT-Fecal), excreção urinária de nitrogênio (NT-Urina) e balanço de nitrogênio (BN), em g/dia e % NT estão apresentados na tabela 9.

Não foram observadas diferenças para os BN g/dia e %NT ($P > 0,05$), porém os dados encontrados demonstram balanço de nitrogênio positivos com a adição de quitosana na dieta, indicando que os animais do estudo independente do tratamento, estavam sob condições nutricionais de ganho de N o que sugere também um equilíbrio ideal entre proteína e energia nas dieta.

Tabela 9- Médias e erro padrão da média (EPM) para balanço de nitrogênio em função dos tratamentos

Variável	Rações experimentais ¹				Média	EPM	Valor P ²	
	Q0	Q50	Q100	Q150			L	Q
NT (g/dia)	191,62	197,32	194,24	191,88	193,76	4,13	0,901	0,338
NT- Fecal (g/dia)	70,42	69,49	65,52	63,13	67,14	2,44	0,095	0,826
NT-Urina (g/dia)	86,76	95,52	89,25	108,11	94,91	3,86	0,099	0,502
BN (g/dia)	34,42	32,31	28,65	19,37	28,69	3,40	0,081	0,548
NT- Fecal (% NT)	36,87	35,07	33,50	32,48	34,48	0,81	0,040	0,793
NT-Urina (% NT)	45,64	48,75	47,74	56,73	49,71	2,00	0,071	0,440
BN (% NT)	17,48	16,17	14,47	10,22	14,58	1,65	0,091	0,620

¹Q0= Tratamento controle; Q50, Q100 e Q150 = 50, 100 e 150 mg/kg de PV de quitosana na dieta respectivamente. ² Probabilidades de resposta linear (L) ou quadrática (Q). Médias em uma mesma linha com diferentes letras diferem ($P < 0,05$).

Russel et al. (1980), avaliando a suplementação de monensina na dieta de novilhos, relataram maior retenção de N com o aditivo em relação ao grupo controle (23,6 vs. 19,6 g/dia), porém justificou a observação devido à maior ingestão de N por estes animais. Funk et al. (1986), trabalhando com lasalocida, não observaram diferenças no balanço de nitrogênio de ovinos recebendo 65% de concentrado na ração.

Sip e Pritchard (1991), em trabalho realizado com novilhos, não observaram interação entre a monensina e a proteína bruta da dieta e atribuiu às respostas de desempenho animal (7,6% no ganho diário) à melhora no metabolismo energético a não ao seu efeito “protéico-protetor,” o que foi ainda substanciado pelo fato da monesina não ter provocado nenhum efeito nas concentrações plasmáticas de uréia.

O aumento do propionato pode diminuir a fermentação de proteína para utilização como energia e, portanto, teria um efeito poupador de aminoácidos como fonte de energia no epitélio ruminal. Trabalhando com gado de corte em crescimento, Beede et al. (1986) relatou que a retenção de nitrogênio foi 47% maior para animais recebendo a concentração de 27 mg de monensina/ kg de MS.

O consumo de NT foi semelhante tanto para o tratamento controle como para os demais tratamentos (191,62; 197,32; 194,24 e 191,88 respectivamente, Q0; Q50; Q100 e Q150) sendo as médias, portanto não significativas ($P > 0,05$). O fato de não serem observadas diferenças com os tratamentos, possivelmente, é decorrente das rações experimentais terem sido iguais, diferindo somente quanto à quantidade de quitosana ofertada. Além disso, o consumo de PB não sofreu diferença entre os tratamentos (Tabela 3).

Houve diminuição nas perdas de NT - Fecal em % NT com a inclusão de quitosana na dieta ($P < 0,05$). Assim como acontece com a utilização de ionóforos, as perdas de nitrogênio endógeno fecal podem ser reduzidas e isto pode explicar parcialmente a maior digestibilidade aparentes do nitrogênio.

No presente trabalho houve maior digestibilidade da PB da dieta com a inclusão da quitosana (Tabela 5) e esse evento pode ser responsável pela menor excreção de N nas fezes.

Não foi demonstrada diferença com a inclusão da quitosana nas perdas de N nas fezes em g/dia. Van Soest (1994) afirmou que as perdas fecais de nitrogênio correspondem em média a 0,6% do total de MS ingerida e entre 3 a 4% do total de PB ingerida, os dados obtidos neste estudo demonstraram que a média de NT-Fecal foi de aproximadamente 0,8% do total do CMS e 5% do CPB, estando próximos ao relatado na literatura e portanto, podem ser considerados normais.

Não houve efeito da inclusão das concentrações de quitosana sobre a excreção de N na urina (g/dia e % NT). Apesar disso, observaram-se maiores valores numéricos para a excreção de N sobre a dieta Q150 resultando num aumento de 24,60% em relação à Q0. O incremento da digestibilidade da proteína bruta refletiu maior fluxo de aminoácidos para o intestino e conseqüentemente menor degradabilidade ruminal e maior absorção desta no duodeno. Caso ocorresse o oposto, ou seja, a degradação da proteína excedendo a taxa de assimilação para a

síntese de proteína microbiana, de acordo com Russell et al., (1991), o catabolismo protéico levaria a uma excessiva concentração de amônia ruminal e possivelmente, maiores perdas urinárias de compostos nitrogenados.

Os dados sobre o balanço de N deste estudo são coerentes com as informações a cerca do N-NH₃ e outros compostos nitrogenados apresentados. Estes resultados, portanto, já eram aguardados.

Além de melhorar a saúde e o desempenho para gado de corte, a inclusão de moduladores da fermentação ruminal, pode trazer diversos benefícios ao meio ambiente, como melhorar a qualidade do ar através da redução na produção de metano, bem como na qualidade da água e solo pela diminuição da quantidade de nitrogênio excretado pelas fezes e urina, o qual pode atingir lençóis freáticos por lixiviação (TEDECHI; FOX, 2003).

De acordo com Gandra (2009), o balanço de nitrogênio e a eficiência do uso do nitrogênio podem ser potencializados e melhorados com a suplementação de monensina sódica. Espera-se que ocorra o mesmo com a utilização da quitosana na nutrição de bovinos.

No entanto, a dose utilizada, condição fisiológica e fase de desenvolvimento dos animais podem ser consideradas fatores determinantes e, portanto mais estudos são necessários para a imposição de resultados conclusivos.

4.5 PARÂMETROS SANGUÍNEOS

A tabela 10 demonstra os dados resultantes dos metabólitos e enzimas plasmáticas. A análise desses parâmetros pode revelar indícios de toxicidade e indicar os limiares ótimos de suplementação da quitosana. Os metabólitos plasmáticos, colesterol, proteínas totais e as enzimas hepáticas, AST e GGT não foram influenciadas pelo tratamento ($P>0,05$).

Tabela 10– Efeito das diferentes concentrações de quitosana nos metabólitos e enzimas plasmáticas

Variável	Tratamentos ¹				EPM	Valor P^2	
	Q0	Q50	Q100	Q150		L	Q
Glicose, mg/dL	54,37	64,62	68,50	67,25	2,21	0,008	0,086
PT, mg/dL	51,2	51,2	65,6	61,5	0,37	0,184	0,780
Albumina, g/L	29,6	26,3	25,2	27,0	0,09	0,106	0,050
Colesterol, mg/dL	235,38	189,88	215,63	220,75	11,48	0,774	0,088
Uréia, mg/dL	30,37	30,37	32,25	29,12	1,77	0,875	0,559
NUS, mg/dL	14,20	14,17	15,06	13,61	0,83	0,875	0,568
AST, U/L	55,75	65,50	52,00	58,00	3,52	0,801	0,755
GGT, U/L	4,20	3,22	2,82	3,22	0,23	0,078	0,101

¹Q0= Tratamento controle; Q50, Q100 e Q150 = 50,100 e 150 mg/kg de PV de quitosana na dieta respectivamente. ² Probabilidades de resposta linear (L) ou quadrática (Q). Médias em uma mesma linha com diferentes letras diferem ($P<0,05$).

As enzimas hepáticas AST e GGT refletem esse resultado de uma forma positiva, já que, quando alteradas podem ser indicativo de injúria hepática, e assim como já relatado anteriormente, a quitosana tem demonstrado atoxicidade e, portanto, segurança para utilização em animais.

As concentrações de glicose plasmática foram influenciadas de forma linear crescente pelo tratamento ($P<0,05$), resultando num incremento de 18.58%, 26.35%, 23.68% respectivamente para Q0 versus Q50, Q100 e Q150. Contudo, os valores apresentam dentro da normalidade para a espécie, 45 a 75 mg/dL (KANEKO et al., 2007). Estes dados são coesivos com o aumento também linear obtido na participação do propionato no total de AGCC (Tabela 8).

Apesar de ser evidente que os animais se encontravam sob status energético positivo, a glicose, segundo Payne e Payne (1987), é o componente de escolha no perfil metabólico de bovinos de corte e esta demonstrou considerável aumento em relação ao tratamento Q0 o que indica maior disponibilidade de energia com o tratamento.

De acordo com a literatura o propionato é o principal substrato da gliconeogênese para ruminantes (YOUNG, 1977) e seu aumento no rúmen é seguido por elevação dos níveis de glicose sanguínea (MAAS et al., 2001).

Garcia-Rodriguez et al. (2011), observaram incremento de 6.5% na produção de glicose e em trabalhos realizado com ovelhas lactantes suplementadas com quitosana.

Não foram observadas diferenças para a uréia e NUS ($P>0,05$) nos animais que receberam a inclusão de quitosana na dieta. A manutenção dos níveis de uréia é importante para que não ocorram gastos energéticos com sua excreção pela urina além dos fatores relacionados ao impacto ambiental.

NUSSIO (2002) também não observou diferenças entre os tratamentos com e sem monensina para o NUS. Avaliando os diversos resultados, por vezes controversos a respeito dos níveis de uréia, deve-se levar em consideração também que os níveis de uréia plasmática podem estar associados diretamente ao consumo de alimento (QUIGLEY; BERNARD, 1992; MOSCARDINI et al., 1998). Gandra et al. (2009) trabalhando com concentrações crescentes de monensina na dieta de vacas em lactação também não evidenciaram diferenças para a uréia e o NUS.

Os teores de uréia metabólica são mais correlacionados com a relação entre consumo de energia e consumo de proteína, do que ao consumo de proteína, isoladamente. Porém no presente estudo, além de não terem sido demonstradas restrição no consumo de PB, o *status* energético dos animais manteve-se positivo (Tabela 6).

Ao contrário dos dados explanados neste trabalho, Garcia-Rodriguez et al. (2011) verificaram aumento de 8.9% de uréia no sangue de ovinos suplementados com quitosana durante a lactação e atribuiu a ocorrência à menor degradabilidade de proteína ruminal.

McGuffey, Richardson e Wilkinson(2001) reportou que a monensina diminui a deaminação de aminoácidos e a produção de amônia ruminal refletindo na também diminuição do nitrogênio ureico plasmático. Enquanto que no presente estudo, a produção de $N-NH_3$ ruminal demonstrou redução no tratamento Q150, porém não acompanhada pelo NUS.

Embora estejam próximos dos valores fisiológicos (29,6; 26,3; 25,2 e 27g/L), houve efeito quadrático sobre os valores de albumina sérica ($P=0,05$).

González-Filho et al. (2000) reportaram que os valores normais de albumina para gado de corte são de 30 g/L . As concentrações séricas do presente trabalho, não condizem com injúria hepática ou déficit alimentar protéico já que os dados demonstrados anteriormente justificam consumo e metabolismo protéico adequado.

O mecanismo de ação esperado para a quitosana não justifica alteração sobre a total de proteína e para a albumina sérica. Martineau et al. (2007), trabalhando com os ionóforos monensina e lasalocida para vacas em lactação, não observaram efeito nas concentrações de albumina e proteínas totais. A ausência de resposta encontrada para o colesterol e proteínas totais também foram elucidadas por Gandra et al. (2009), utilizando monensina sódica em dieta de vacas em lactação.

Apesar de não ter havido diferença para o colesterol total com a inclusão das concentrações de quitosana, os valores observados (média de 215,4mg/dL) encontram-se acima do que a literatura cita como referência (máximo de 120 mg/dL) (GONZALEZ-FILHO, 2000; KANEKO et al., 2007).

5 CONCLUSÕES

A quitosana, quando utilizada como aditivo modulador da fermentação ruminal, resultou em alterações que possibilitam sua utilização como alternativa ao uso de ionóforos para bovinos. Também, as alterações na fermentação ruminal resultaram em melhoria na digestibilidade aparente total da matéria seca e nutrientes.

O *status* energético do animal manteve-se positivo e os produtos finais da fermentação ruminal assim como a glicose plasmática dos animais suplementados comprovaram que a quitosana desvia o metabolismo do animal para rotas energeticamente mais eficientes.

É necessário que sejam realizadas novas pesquisas para que seja elucidado o exato mecanismo de ação da quitosana sobre os microrganismos ruminais, suas doses ótimas de administração, e seus efeitos sobre desempenho produtivo animal, com o intuito de viabilizar sua utilização na nutrição de ruminantes.

REFERÊNCIAS

AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: review. **Food Science and Technology**, v. 43, n. 6, p. 837-842, 2010.

AJUN, W.; YAN, S.; LI, G.; HUILLI, L. Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and in vitro release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 566–574, 2009.

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

ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n.7, p. 1598-1630, 2000.

ARAUJO-FEBRES, O.; FERNÁNDEZ, M. C. Efecto en novillos del monensin y el nivel de fibra de la dieta sobre el consumo y la digestibilidad de la materia seca. **Revista de La Facultad de Agronomía**, v. 8, n. 2, p. 143-153, 1991.

ARAUJO, R. C. **Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação ruminal in vitro**. 2010.178 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.

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

BALDWIN, R. L.; SMITH, N. E.; TAYLOR, J. Manipulating metabolic parameters to improve growth rate and milk secretion. **Journal of Animal Science**, v. 51, p. 1416-1428, 1980.

BEEDE, D. K.; SCHELLING, G. T.; MITCHELL, G. E.; TUCKER, R. E.; GILL, W. W.; KOENIG, S. E.; LINDSEY, T. O. Nitrogen utilization and digestibility by growing steers and goats of diets that contain monensin and low crude protein. **Journal of Animal Science**, v. 62, n. 3, p. 857-863, 1986.

BERGEN, W. G.; BATES D. B. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 6, p. 1465-1483, 1984.

BIGGS, H. G.; COOPER, J. M. An evaluation of four methods of measuring urinary creatinine. **Clinical Chemistry**, v. 7, p. 665-673, 1961.

BRODERICK, G. A.; MERCHEN, N. R. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2618-2632, 1992.

BROUDISCOU, L. P.; PAPON, Y.; BROUDISCOU, A. F. Effects of dry plant extracts on feed degradation and the production of rumen microbial biomass in a dual outflow fermenter. **Animal Feed Science and Technology**, v. 10, p. 183-189, 2002.

BUETER, C. L.; LEE, C. K.; RATHINAM, V. A. K.; HEALY, G. J.; TARON, C. H.; SPECHT, C. A.; LEVITZ, S. M. Chitosan but not chitin activates the inflammasome by a mechanism dependent upon phagocytosis. **Journal of Biology Chemistry**, v. 286, p. 35447-35455, 2011.

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

BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 761-771, 2006.

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

CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; DEVANT, M. Effects of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 574-579, 2002.

CARDOZO, P. W.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. Effects of natural plant extracts on protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 3230-3236, 2004.

CARRO, M. D.; RANILLA, M. J. Los antibióticos promotores del crecimiento como aditivos: efectos sobre la producción animal, situación legal y perspectivas de futuro. **Información Veterinaria**, v. 238, p. 35–45, 2002.

CASALI, A. O. **Procedimentos metodológicos *in situ* na avaliação do teor de compostos indigestíveis em alimentos e fezes de bovinos**. 2006. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

CHALUPA, W. Manipulating Rumen Fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 45, n. 3, p. 585-599, 1977.

CHALUPA, W. Chemical control of rumen microbial metabolism. In: Y. RUCKEBUSCH, Y.; THIVEND, P. **Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants**. Westport : ed. AVI Publishing Co, 1980. p. 325–347.

CHEN, M.; WOLIN, M. J. Effect of monensin and lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 38, p.72–77, 1979.

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). Bucksburnd, Aberdeen: International Feed Research Unit; Rowett Research Institute, 1992. 21 p. (Occasional Publication).

CHEN, Y. L.; CHOU, C. C. Factors affecting the susceptibility of *Staphylococcus aureus* CCRC 12657 to water soluble lactose chitosan derivative. **Food Microbiology**, v. 22, p. 29–35, 2005.

CHIANG, Y. W.; WANG, T. H.; LEE, W. C. Chitosan coating for the protection of amino acids that were entrapped within hydrogenated fat. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1057–1061, 2009.

CHIEN, C. S.; LIAU, W. Y.; TSAI, G. J. Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfbenzoyl chitosan and application to oyster preservation. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 1124-1128, 1998.

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

CHUNG, Y. C.; KUO, C. L.; CHEN, C. C. Preparation and important functional properties of water-soluble chitosan produced through Maillard reaction. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1473–1482, 2005.

CHUNG, Y. C.; WANG, H. L.; CHEN, Y. M.; LI, S. L. Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 179–184, 2003.

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

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

CUARÓN, J. A. Estímulo de la inmunidad por pre y prebióticos. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 2., 2006, São Paulo. **Anais...** São Paulo:[s.n.], 2006.

DENNIS, S. M.; NAGARAJA, T. G.; BARTLEY, E. E. Effects of lasalocida or monensin on lactate-producing or using-rumen bacteria. **Journal of Animal Science**, Champaing. v. 52, n. 2, p. 418-26, 1981.

DESNOYERS, M.; GIGER-REVERDIN, S.; BERTIN, G. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 1620-1632, 2009.

DICOSTANZO, A.; CASSADY, J. M.; ZEHNDER, C. M. Utilization of approved feed additives in growing, finishing and replacement beef cattle diets. In: 57 th Minnesota Nutrition Conference, 1996, Minnesota, **Proceedings...** Minnessota: Protiva Technical Symposium, 1996. p. 81-96.

DUFF, G. C.; GALYEAN, M. L.; BRANINE, M. E. Effects of adaptation to lasalocid, monensin or a daily rotation of lasalocid and monensin on in vitro fermentation of a 90% concentrate diet. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 75, p. 129–134, 1994.

DUFFIELD, T. F.; SANDALS, D.; LESLIE, K. E. Effect of prepartum administration of monensin in a controlled-release capsule on postpartum energy indicators in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2345-2354, 1998a.

DUFFIELD, T. F.; SANDALS, D.; LESLIE, K. E. Efficacy of monensin for the prevention of sub clinical ketosis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2855- 2866, 1998b.

DURAND, M.; KOMISARCZUK, S. Influence of major minerals on rumen microbiota. **The Journal of Nutrition**, v. 118, p. 249-260, 1988.

DUTTA, P. K.; DUTTA, J.; TRIPATHI, V. S. Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 63, p. 20–31, 2004.

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

EL-SEED, A. N. M. A. F.; KAMEL, H. E. M.; SEKINE, J. et al. Chitin and chitosan as possible novel nitrogen sources for ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 83, p. 161-163, 2003.

ERFLE, J. D.; BOILA, R. J.; TEATHER, R. M.; MAHADEVAN, S.; SAUER, F. D. Effect of pH on fermentation characteristics and protein degradation by rumen microorganisms in vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p. 1457–1464, 1982.

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. 1768-1777, 1961.

ESKELAND, B.; PFANDER, W. H.; PRESTON, R. L. Intravenous energy infusion in lambs: effects on nitrogen retention, plasma free amino acids and plasma urea nitrogen. **British Journal of Nutrition.**, v. 31, p.201, 1974.

EUROPEAN COMISSION. European Community Regulation, n.º 1831 of 22 September 2003. The European Parliament and the Council of on Additives for Use in Animal Nutrition. **Official Journal European Union**, Brussels, v. 268, p. 29-43, 2003.

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

FUNK, M. A.; GALYEAN, M. L.; ROSS, T. T. Potassium and lasalocid effects on performance and digestion in lambs. **Journal of Animal Science**, v. 63, n. 3, p. 685-691, 1986.

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

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

GARCIA-RODRIGUEZ, A.; MANDALUNIZ, N.; ARRANZ, J.; GOIRI, I. Inclusion of chitosan in the diet of dairy ewes in early lactation. In: JORNADAS SOBRE PRODUCCIÓN ANIMAL, 14., 2011, 2011, Zaragoza. **Anais...** Zaragoza: Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario, 2011. p. 222-224.

GARRET, W. N. Factors influencing energetic efficiency of beef production. **Journal of Animal Science**, v. 51, n. 6, p. 1434- 1440, 1980.

GATTAS, C. B. A.; MORAIS, M. G.; ABREU, U. G. P.; FRANCO, G. L.; STEIN, J.; LEMPP, B. Efeito da suplementação com cultura de levedura na fermentação ruminal de bovinos de corte. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 37, n. 4, p. 711-716, 2008.

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

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

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

GOIRI, I.; OREGUI, L. M.; GARCIA-RODRIGUEZ, A. Dose response effects of chitosan on “in vitro” rumen digestion and fermentation mixtures differing in forage to concentrate ratios. **Animal Feed Science and Technology**, v. 151, n. 2, p. 215-227, 2009c.

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

GONZÁLEZ-FILHO, H. D. Uso do perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: GONZÁLEZ, F. H. D. (Ed.). **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre: UFRGS, 2000. p. 63-74.

GOODRICH, R. D.; GARRETT, J. E.; GAST, M. A. Influence of monensin on the performance of cattle. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 6, p. 1484-1498, 1984.

GÜNBEYAZ, M.; FARAJI, A.; OZKUL, A.; PURALI, N.; SENEL, S. Chitosan based delivery systems for mucosal immunization against bovine herpesvirus 1 (BHV-1). **European journal of pharmaceutical sciences official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 41, p. 531-545, 2010.

GUSTAFSON, R. H.; BOWEN, R. E. Antibiotic use in animal agriculture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 531-541, 1997.

HALL, M. B. Making nutritional sense of nonstructural carbohydrates. In: ANNUAL FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM, 9., 1998, Gainesville, FL. **Proceedings...** Gainesville: Florida University, 1998. p. 108-121.

HALL, J. O. Ionophore use and toxicosis in cattle. **The Veterinary clinics of North America. Food Animal Practice**, v.16, p. 497-509, 2000.

HAMMOND, A. C. Effect of dietary protein level, ruminal protein solubility and time after feeding on plasma urea nitrogen and the relationship of plasma urea nitrogen to other ruminal and plasma parameters. **Journal of Animal Science**, v. 57, p. 435, 1983.

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

HEIN, S.; WANG, K.; STEVENS, W. F.; KJEMS J. Chitosan composites for biomedical applications: status, challenges and perspectives. **Material Science Technology**, v. 24, n. 9, p. 1053- 1061, 2008.

HELANDER, I. M.; NURMIAHO-LASSILA, E. L.; AHVENAINEN, R.; RHOADES, J.; ROLLER, S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. **International Journal Food Microbiology**, v. 71, p. 235–244, 2001.

HIRANO, S.; ITAKURA, C.; SEINO, H.; AKIYAMA, Y.; NONAKA, I.; KANBARA, N.; KAWAKAMI, T. Chitosan as an ingredient for domestic animal feeds. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 38, n. 5, p. 1214–1221, 1990.

HOOVER, W. H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 2755–2766, 1986.

HORTON, G. M. J.; BASSENDOWSKI, K. A.; KELLER, E. H. Digestion and metabolism in lambs and steers fed monensin with different levels of barley. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 50, p. 997-1008, 1980.

HUANG, R. L.; YIN, Y. L.; WU, G. Y. Effect of dietary oligochitosan supplementation on ileal digestibility of nutrients and performance in broilers. **Poultry Science**, v. 84, p. 1383-1388, 2005.

JALC, D.; BARAN, M.; VENDRAK, T. SIROKA, P. Effect of monensin on fermentation of hay and wheat bran investigated by the rumen simulation technique (Rusitec). 2. End-products of fermentation and protein synthesis. **Archives of Animal Nutrition**, v. 42, n. 2, p. 153-158, 1993.

JALC, D.; LAUKOVA, A. Effect of nisin and monensin on rumen fermentation in artificial rumen. **Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, v. 115, n. 1-2, p. 6–10, 2002

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

JUNG, B.; KIM, C.; CHOI, K.; LEE, Y. M.; KIM, J. Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities. **Journal Applied Polymers Science**, v. 72, p. 1713-1719, 1999.

KAMALAMMA, U.; KRISHNAMOORTHY, U.; KRISHNAPPA, P. Effect of feeding yeast culture (Yea-sacc1026) on rumen fermentation in vitro and production performance in crossbred dairy cows. **Animal Feed Science Technology**, v. 57, n. 3, p. 247-256, 1996.

KANEKO, J. J. Serum proteins and dysproteinemias . In: KANEKO, J. J.; HARVEY, W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. San Diego: Academic Press, San Diego, CA, 1997. p. 117-138.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 3-11, 2010.

KEAN, T.; THANOU, M. Chitin and chitosan sources, production and medical applications, In: WILLIAMS, P. A.; ARSHADY, R. **Desk reference of Natural Polymers, their Sources, Chemistry and Applications**. London: Kentus Books, 2009. p. 327–361.

KOLB, E. **Fisiologia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1984. 612 p.

KONE, P.; MACHADO, P.F.; COOK, R.M. Effect of the Combination of Monensin and Isoacids on Rumen Fermentation In Vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 2767-2771, 1989.

KONG, M.; CHEN, X. G.; LIU, C. S.; YU, L. J.; JI, Q. X.; XUE, Y. P.; CHA, D. S.; PARK, H. J. Preparation and antibacterial activity of chitosan microspheres in a solid dispersing system. **Frontiers of Materials Science in China**, v. 2, p. 214–220, 2008.

KÖKSAL,O.; ÖZDEMİR, F.; ETÖZ, B. C.; BÜYÜKCOŞKUN, N. O.; SİĞİRLİ, D. Hemostatic effect of a chitosan linear polymer (Celox®) in a severe femoral artery bleeding at model under hypothermia or warfarin therapy. **Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery**, v. 17, p. 104-202, 2011.

KOSAKA, T.; KANEKO, Y.; NAKADA, Y.; MATSUURA, M.; TANAKA, S. Effect of chitosan implantation on activation of canine macrophages and polymorphonuclear cells after surgical stress. **Journal Veterinary Medicine Science** , v.58, p.963–967, 1996.

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

KURITA, K.; KAMIYA, M.; NISHIMURA, S. I. Solubilization of a rigid polysaccharide: controlled partial n-acetylation of chitosan to develop solubility. **Carbohydrate Polymers**, v. 16, p. 83–92, 1991.

LANA, R. P.; RUSSELL, J. B.; AMBURGH, M. E. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 2190-2196, 1998.

LANGSTON, V. C.; GALEY, F.; LOVELL, R.; BUCK, W. B. Toxicity and therapeutics of monensin: A review. **Veterinary Medicine**, v. 80, p. 75, 1985.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LEÃO, M. I.; COELHO DA SILVA, J. F. Técnicas de fistulação de abomaso em bezerros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 1., 1980, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1980. p.37.

LI, G. P.; LIU, Z. G.; LIAO, B.; ZHONG, N. S. Induction of Th1-type immune response by chitosan nanoparticles containing plasmid DNA encoding house dust mite allergen Der p 2 for oral vaccination in mice. **Cell Molecular Immunology**, v. 6, p. 45–50, 2009.

LI, Q.; DUNN, E. T.; GRANDMAISON, E. W.; GOOSEN, M. F. A. Applications and properties of chitosan. **Journal Bioactive Competible Polymers**, v. 7, p. 370–397, 1992.

LIM, S. H.; HUDSON, S. M. Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 313–319, 2004.

MAAS, J. A.; WILSON, G. F.; MCCUTCHEON, S. N.; LYNCH, G. A.; BURNHAM, D. L.; FRANCE, J. The effect of season and monensin sodium on the digestive characteristics of autumn and spring pasture fed to sheep. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 1052-1058, 2001.

MARTIN, S. A.; NISBET, D. J. Effect of Direct-Fed Microbials on Rumen Microbial Fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 1736-1744, 1992.

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

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

MEINERT, R. A.; YANG, C. M. J.; HEINRICHS, A. J. Effect of monensin on growth, reproductive performance, and estimated body composition in Holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 245-257, 1992.

MERTENS, D. R. Regulation of forage intake. In: FORAGE QUALITY EVALUATION AND UTILIZATION, 1994, Nebraska, **Proceeding... Nebraska**: American Society of Agronomy, 1994. p. 988.

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.

MINAMI, S.; EGAWA, T.; OHIRA, J.; OKAMOTO Y.; MATSUHASHI, A. Effects of chitosan with intramammary administration on phagocytes in udder secretion. **Journal of the Japan Veterinary Medical Association** , v. 50, p.143–146, 1997.

MOON, J.S.; JOO, Y.S.; KU, B.K.; KIM, Y.; PARK, Y.H.; HAHN, T.W. A study on efficacy of chitosan on bovine mastitis. **Korean Journal Veterinary Research**, v.38, p.71–76, 1998.

MOON, J. S.; KIM, H. K.; KOO, H. C.; JOO, Y. S.; NAM, H. M.; PARK, Y. O.; KANG, M. I. The antibacterial and immunostimulative effect of chitosan-oligosaccharides against infection by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 989-998, 2007.

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

MOSCARDINI, S.; WRIGHT, T. C.; LUIMES, P. H. Effects of rumen-undegradable protein and feed intake on purine derivate and urea nitrogen: comparison with predictions from the Cornell Net Carbohydrate and protein system. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2421-2329, 1998.

MOULD, F. L.; ØRSKOV, E. R.; MANN, S. O. Associative effects of mixed feeds. I. Effect of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis in vivo and dry matter digestion on various roughages. **Animal Feed Science and Technology**, v. 10, p. 15–30, 1983.

MUZZARELLI, R.A. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 53.n.2, p.131-40, 1997.

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

NAGARAJA, T. G.; AVERY, T. B.; BARTLEY, E. E.; GALITZER, S. J.; DAYTON, A. D. Prevention of lactic acidosis in cattle by lasalocid or monensin. **Journal of Animal Science**, v. 53, p. 206–216, 1981.

NAGARAJA, T. G.; NEWBOLD, C. J.; VAN NEVEL, C. J. Manipulation of ruminal fermentation. **In: The rumen microbial ecosystem**. Cidade: Hobson & Stewart, 1997. p. 523-632.

NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; MCINTOSH, F. M. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. **The British Journal of Nutrition**, v. 76, p. 249-261, 1996.

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

NO, H. K.; KIM, S. H.; LEE, S. H.; PARK, N. Y.; PRINYAWIWATKUL, W. Stability and antibacterial activity of chitosan solutions affected by storage temperature and time. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 174–178, 2006.

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.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL . Nutrient requirements of dairy cattle. 7th ed. Washinton, D.C.: National Academic Press, 2001. p. 381.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient Requirements of Beef Cattle, 7th ed. Washington, DC: Natl. Acad. Press, 1996. p.168.

NUSSIO, C. M. B. **Processamento de milho e suplementação com monensina para bezerros leiteiros pré e pós desmama precoce**. 2002. 116 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

OKAMOTO, Y.; MINAMI, S.; MATSUHASHI, A.; HAMADA, K.; YANAGIYA, G.; OHIRA, J.; FUKUMOTO, Y.; MURAKAMI, C. Effects of chitosan on bovine wound healing. **Journal of the Japan Veterinary Medical Association**, v. 49, p. 22–27, 1996.

O'KELLY, J. C.; SPIERS, W.G. Monensin induced metabolic changes in cattle fed a restricted intake of lucerne hay. **Journal of Agriculture. Science**, v.111, p.403, 1988.

OLIVEIRA, M. V. M.; LANA, R. P.; JHAM, G. N.; PEREIRA, J. C.; PÉREZ, J. R. O.; VALADARES FILHO, S.C. Influência da monensina no consumo e na fermentação ruminal em bovinos recebendo dietas com teores baixo e alto de proteína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 5, p. 1763-1774, 2005.

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

OWENS, F. N.; SECRIST, D. S.; HILL, W. J. Acidosis in cattle: a review. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 76, p. 275-286, 1998.

OWENS, F. N.; ZORRILLA-RIOS, J.; DUBESKI, P. Effects of ionophores on metabolism, growth, body composition and meat quality. In: PEARSON, A. M.; DUTSON, T. R. **Growth Regulation in Farm Animals: Advances in Meat Research**. London. Elsevier, 1991.p. 321–342.

PAYNE, J. M.; PAYNE, S. **The metabolic profile test**. Oxford: oxford University Press, 1987.

PERRY, T. W.; BEESON, W. M.; MOHLER, M. T. Effect of monensin on beef cattle performance. **Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 42, p. 761-765, 1976.

PHAECHAMUD, T. Hydrophobically modified chitosans and their pharmaceutical applications. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 1, p. 2–9, 2008.

PITTS, J. S.; MCCOLLUM, F. T; BRITTON, C. M. Protein supplementation of steers grazing tobosa-grass in spring and summer. **Journal Range Management**, v. 45, p. 226–231, 1992.

POTARA, M.; JAKAB, E.; DAMERT, A.; POPESCU, O.; CANPEAN, V.; ASTILEAN, S. Synergistic antibacterial activity of chitosan-silver nanocomposites on *Staphylococcus aureus*. **Nanotechnology**, v. 22, n. 13, p. 135-144, 2011.

PRESTON, R. L.; SCHNAKENBERG, D. D.; PFANDER, W. H. Protein utilization in ruminants. I. Blood urea nitrogen as affected by protein intake. **Journal of Nutrition**, v. 86, p. 281-288, 1965.

PUSATERI, A. E.; MCCARTHY, S. J. G.; GREGORY K.W.; HARRIS, R. A.; CARDENAS, L.; MCMANUS, A. T.; GOODWIN, C.W. Effect of a chitosan-based hemostatic dressing on blood loss and survival in a model of severe venous hemorrhage and hepatic injury in swine. **The Journal of Trauma**, v. 54, p. 177, 2003.

QUIGLEY, J. D.; BERNARD, J. K. Effect of nutrient source and time of feeding on changes in blood metabolites in young calves. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 1543-1549, 1992.

RAAFAT, D.; SAHL, H.G. Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey. **Microbial Biotechnology**, v.2, p.186–201, 2009.

RABEA, E. I.; BADAWY, M. E. T.; STEVENS, C. V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 1457-1465, 2003.

RAUN, A. P.; COOLEY, C. O.; POTTER, E. L.; RATHMATHER, R. P.; RICHARDSON, L. F. Effect of monensin on feed efficiency of feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 3, p. 670-677, 1976.

RENNÓ, L. N.; VALADARES, R. F. D.; LEÃO, M. I.; VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, J.F.C.; CECON, P.R.; DIAS, H.LC.; COSTA, M.A.L.; OLIVEIRA, R.V. Estimativa da produção de proteína microbiana pelos derivados de purinas na urina em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 1223-1234, 2000.

RENNÓ, L. N. **Consumo, digestibilidade total e parcial, produção microbiana, parâmetros ruminais e excreções de uréia e creatinina em novilhos alimentados com dietas contendo quatro níveis de uréia ou dois de proteína.** 2003.252 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

RENNÓ, L. N.; VALADARES FILHO, S. C.; VALADARES, R. F. D.; PAULINO, M. F.; RENNO, F. P.; SILVA, P. A. Níveis de uréia na ração de novilhos de quatro grupos genéticos: estimativa da produção de proteína microbiana por meio dos derivados de purinas

na urina utilizando duas metodologias de coleta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 3 p. 546-555, 2008.

RICHARDSON, L. F.; RAUN, A. P.; POTTER, E.L.; COOLEY, C. O; RATHMACHER, R. P. Effect of monensin on rumen fermentation in vitro and in vivo. **Journal of Animal Science**, v. 43, p. 657-664, 1976.

ROBERTS, G. A. F. **Chitin chemistry**. London: Mc Millan Press, 1992. p.350.

ROBINSON, P. H.; ERASMUS, L. J. Effects of analyzable diet components on responses of lactating dairy cows to *Saccharomyces cerevisiae* based yeast products: A systematic review of the literature. **Animal Feed Science and Technology**, v. 149, p. 185-198, 2009.

RODRIGUES, P. H. M.; MATTOS, W. R. S.; MELOTTI, L.; RODRIGUES, R. R. Monensina e digestibilidade aparente em ovinos alimentados com proporções de volumoso/concentrado. **Scientia Agrícola**, v. 58, n. 3, p. 449-455, 2001.

ROMANAZZI, G.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A. Short hypobaric treatments potentiate the effect of chitosan in reducing storage decay of sweet cherries. **Posthary Biology Technology**, v. 29 p. 73-80, 2003.

RUIZ, R.; ALBRECHT, G. L.; TEDESCHI, L. O. Effect of monensin on the performance and nitrogen utilization of lactating dairy cows consuming fresh forage. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1717-1727, 2001.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J. Effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 1-6, 1989.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J.. Effects of additives on in vitro ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another gram-positive antibiotic. **Journal of Animal Science**, v. 66, p. 552-558, 1988.

RUSSELL, J. B. Mechanisms of ionophore action in ruminal bacteria. In: SYMPOSIUM ELANCO ANIMAL HEALTH - SCIENTIFIC UPDATE ON RUMENSIN/TYLAN/MICOTIL FOR THE PROFESSIONAL FEEDLOT CONSULTANT, 1996, Amarillo. **Proceedings...** Amarillo: ELANCO, 1996. p. 315.

RUSSELL, J. B.; WALLACE, R. J. Energy-yielding and energy-consuming reactions. In: HOBSON, P. N. **The ruminal microbial ecosystem**. 2. ed. Essex, England: Elsevier Science, 1997. p. 267-268.

SALLES, M. S. V.; LUCCI, C. S. Monensina para Bezerros Ruminantes em Crescimento Acelerado. 1. **Desempenho**. **Revista Brasileira de Zootecnia**., v. 29, p. 573-581, 2000.

SAS. STATISTICAL ANALISYS/STAT. **SAS user's guide**: statistics. . Release 8.0 Cary: SAS, 1999. 1500 p.

SCHELLING, G. T. Monensin mode of action in the rumen. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 6, p. 1518-1527, 1984.

SEAL, C. J.; REYNOLDS, C. K. Nutritional implications of gastrointestinal and liver metabolism in ruminants . **Nutrition Research Reviews**., v. 6, p. 185, 1993.

SEGABINAZZI, L. R. **Aditivo a base de extratos vegetais como alternativa à monensina sódica na dieta de vacas de corte terminadas em confinamento**. 2008.84 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

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

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

SHI, B. L.; LI, D. F.; PIAO, X. S.; Effects of chitosan on growth, performance and energy and protein utilization in broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 46, p. 516-519, 2005.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de Alimentos (Métodos químicos e biológicos)**. Viçosa: Impr. Univ., 2002. p. 235.

SINGLA, A. K.; CHAWLA, M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects—an update. **Journal Pharm Pharmacology**. v. 53, p. 1047–1067, 2001.

SIP, M. L.; PRITCHARD, R. H. Nitrogen utilization by ruminants during restricted intake of high-concentrate diets. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 6, p. 2655-2662, 1991.

SMITH, G. E. Energy metabolism. In: CHURCH, D. C. **Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants**. Virginia: Oregon State University, 1971. 601 p.

SNIFFEN, C. J., ROBINSON, P.H. Microbial growth and flows as influenced by dietary manipulations. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 425–441, 1987.

SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P. S. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3562–3577, 1992.

STERN, M. D.; HOOVER, W. H. Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: A review. **Journal of Animal Science**, v.49, p.1590–1603, 1979.

SUDARSHAN, N. R.; HOOVE, D. G.; KNORR, D. Antibacterial action of chitosan. **Food Biotechnology**, v. 6, p. 257–272, 1992.

SKAUGRUD, O.; SARGENT, G. Chitin and Chitosan: Crustacean Biopolymers with Potential. In: INTERNATIONAL BY-PRODUCTS CONFERENCE, 1992, Alaska. **Proceeding...** Anchorage, Alaska, 1992. p. 61-72.

SPEARS, J. W. Ionophores and nutrient digestion and absorption in ruminants. **Journal of Nutrition**. v. 120, p. 632–638, 1990.

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

SUK, Y. O. Interaction of breed-by-chitosan supplementation on growth and feed efficiency at different supplementing ages broiler chickens. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 17, p. 1705-1711, 2004.

TAKAHASHI, T.; IMAIA, M.; SUZUKIA, I.; SAWAI, J. Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated by the deacetylation degree. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 485–491, 2008.

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

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

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

THANOOU, M.; JUNGINGER, H. E. Pharmaceutical applications of chitosan and derivatives. In: DUMITRIU, S. **Polysaccharides. Structural diversity and functional versatility**. New York: Marcel Dekker, 2005. p. 661–677.

THONNEY, M. L.; HEIDE, D. J.; DUHAIME, R. J.; HAND, R. J.; PEROSIO, D. J. Growth, feed efficiency and metabolite concentrations of cattle fed high forage diets with lasalocid or monensin supplements. **Journal of Animal Science**, v. 52, n. 2, p. 427-436, 1981.

TIKHONOV, V. E.; STEPNOVA, E. A.; BABAK, V. G.; YAMSKOV, I. A.; PALMA-GUERRERO, J.; JANSSON, H. B. Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-/2(3)-(dodec-2-enyl) succinoyl/-derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, p. 66–72, 2006.

TIMMERMANS, J.R.; JOHNSON, L.M.; HARRISON, J.H.; Estimation of the flow of microbial nitrogen using Milk uric acid or allantoin. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1286-1299, 2000.

TOLBERT, R. E.; LICHTENWALNER, R. E. Effect of monensin on apparent digestibility and nitrogen utilization of sorghum based rations. **Journal of Animal Science**, v.47 p. 276, 1978.

TSAI, G. J.; SU, W. H. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 239–243, 1999.

UENO, H.; MORI, T.; FUJINAGA, T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, p. 105, 2001.

UENO, H.; YAMADA, H.; TANAKA, I.; KABA, N.; MATSUURA, M.; OKUMURA, M.; KADOSAWA, T.; FUJINAGA, T. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. **Biomaterials**, v. 20, p. 1407, 1999.

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

VALERO, M. V. **Monensina ou própolis na dieta de bovinos mestiços terminados em confinamento: desempenho, digestibilidade, produção microbiana, características de carcaça e do músculo longissimus**. 2010. 61 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010.

VAN DER WERF, J. H. J.; JONKER, L. J.; OLDENBROEK, J. K. Effects of monensin on milk production by Holstein and jersey cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 415-427, 1998.

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

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

VÅRUM, K. M., SMIDSRØD, O. Structure–property relationships in chitosans, In: **Polysaccharides**. New York: Dumitriu, S, 2005. p. 625–642.

WALLACE, R. J.; CHENG, K. J.; CZERKAWSKI, W. J. Effect of monensin on fermentation characteristics of the artificial rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 40, p. 672–674, 1980.

WALLACE, R. J. Ruminal microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2992-3003, 1994.

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

WEISS, W. P.; CONRAD, H. R.; PIERRE, N. R. S. T. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. **Animal Feed Science Technology**, v. 39, p. 95-110, 1992.

WOLIN, M. J. A theoretical rumen fermentation balance. **Journal of Dairy Science**, v. 43, n. 10, p. 1452-1459, 1960.

XIE, Y. J.; LIU, X. F.; CHEN, Q. Synthesis and characterization of water-soluble chitosan derivates and its antibacterial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 142–147, 2007.

YANG, C. M.; RUSSELL, J. B. The effect of monensin supplementation on ruminal ammonia accumulation in vivo and the numbers of amino acid-fermenting bacteria. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 3470–3476, 1993.

YOUNG, J. W. Gluconeogenesis in cattle: significance and methodology. **Journal of Dairy Science**, v. 60, n. 1, p. 1-15, 1977.

YOUNG, D. H.; KOHLE, H.; KAUSS, H. Effect of chitosan on membrane permeability of suspension cultures Glycine max and Phaseolus vulgaris cells. **Plant Physiology**, v. 70 p. 1449-1454, 1982.

ZEOULA, L. M.; BELEZE, J. R. F.; GERON, L. J. V.; MAEDA, E. M.; PRADO, I. N.; PAULA, M. C. Digestibilidade parcial e total de rações com a inclusão de ionóforo ou probiótico para bubalinos e bovinos. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 37, n. 3, p. 563-571, 2008.

ZHANG, W.; YIN, Z.; LIU, N.; YANG, T.; WANG, J.; BU, Z.; WU, D. DNA-chitosan nanoparticles improve DNA vaccine-elicited immunity against Newcastle disease virus through shuttling chicken interleukin-2 gene. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, p. 693-702, 2010.

ZHENG, L. Y.; ZHU, J. F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate. Polymers**, v. 54, p. 527–530, 2003.

ZINN, R. A.; PLASCENCIA, A.; BARAJAS, R. Interaction of forage level and monensin in diets for feedlot cattle on growth performance and digestive function. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2209-2215, 1994.

ZIVANOVIC, S.; CHI, S.; DRAUGHON, A. F. Antimicrobial Activity of Chitosan Films Enriched with Essential Oils. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 1, p. 228-231, 2005.