RODOLFO DANIEL MINGOTI

**Desempenho produtivo, digestão e metabolismo de vacas leiteiras alimentadas com
diferentes concentrações de quitosana nas dietas**

Pirassununga

2013

RODOLFO DANIEL MINGOTI

Desempenho produtivo, digestão e metabolismo de vacas leiteiras alimentadas com diferentes concentrações de quitosana nas dietas

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

2013

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2858
FMVZ

Mingoti, Rodolfo Daniel

Desempenho produtivo, digestão e metabolismo de vacas leiteiras alimentadas com diferentes concentrações de quitosana nas dietas. / Rodolfo Daniel Mingoti. -- 2013.
107 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Palma Rennó.

1. Vacas leiteiras. 2. Quitosana. 3. Digestibilidade. 4. Modulador fermentação ruminal. 5. Perfil de ácidos graxos. 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: MINGOTI, Rodolfo Daniel

Título: **Desempenho produtivo, digestão e metabolismo em vacas leiteiras alimentadas com diferentes concentrações de quitosana nas dietas**

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATORIA

Dedico a realização deste sonho aos meus
pais, Vera Regina e Antônio Donizetti
Mingoti, e irmãos, Rafael e Renata.

Ofereço este trabalho aos amores
da minha vida: Fernando e Pedro.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e os dons e as graças recebidas em todos os seus momentos.

Aos meus pais, Vera Regina e Antônio Donizetti, pelo constante incentivo e incansável sacrifício para proporcionar aos seus filhos a oportunidade de realizarem os sonhos mais grandiosos.

Aos meus irmãos Renata e Rafael pela enorme amizade e amor em todos os momentos. Vocês são a minha vida.

A meus amados sobrinhos: Fernando e Pedro; e cunhados: Thiago e Mariana.

À minha segunda família: Kaki (Gustavo), Kazão (Rodrigo), Jeferson e Ivan

A minha namorada: Tamie (Agarose – Popotinha)

A todos os familiares, parentes e amigos pela ajuda e pelo incentivo.

Ao Prof. Francisco, pela confiança depositada em mim desde o início da nossa caminhada, pela sua orientação e dedicação. Muito além de um orientador, você se tornou um amigo pessoal e uma das mais valiosas pessoas que pude conhecer. Obrigado pelas risadas, goles e histórias que JAMAIS serão esquecidas.

Aos INCRÍVEIS companheiros e amigos que fizeram toda a diferença na minha vida: Obrigado Jefferson (From-from); Rafael (Bisão); Elmeson (Mineirinho); Pablo (Country); Gustavo (Boi); Rui (Libidao) e Bruno (Xacrete)

À Universidade de São Paulo, a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, e ao Departamento de Nutrição e Produção Animal por me receberem e ajudarem a realizar meus sonhos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão de auxílio à pesquisa que possibilitou a realização deste estudo.

As vacas de leite. Obrigado pelo tempo e pela viabilidade de execução do projeto.

Ao grupo de pesquisa; Professores: – José Esler, Jefferson; Pós-doutoranda – Taíssa
Doutorandos: Rafael, Lenita, Vitor, Pablo, Gustavo Calomeni, Rodrigo e Elmeson; Mestrandos
– Cybele, Tiago Vendramini, Tiago Del Valle, Gustavo Almeida; Felipe; Iniciação científica –
Mariana; Caio; Artur; Victor

Aos professores do Departamento de Nutrição e Produção Animal pelos ensinamentos.

Aos funcionários do LPBL: Tio Carlão (*in memoriam*), João (Jota), Lenon; Paulo; Toco;
Diogo; Luquinha; e. Aos funcionários da Higilimp: Dona Dalva e Cris

Aos colegas da pós-graduação em nutrição em produção animal pelo agradável convívio
durante o curso.

Enfim, a todos aqueles que, de alguma forma colaboraram para realização deste
trabalho.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará vivendo o impossível.”

São Francisco de Assis

“Existe no silêncio tão profunda sabedoria que às vezes ele transforma-se na mais perfeita resposta.”

Fernando Pessoa

RESUMO

MINGOTI, R. D. **Desempenho produtivo, digestão e metabolismo em vacas leiteiras alimentadas com diferentes concentrações de quitosana nas dietas.** [Productive performance, digestion and metabolism in dairy cows fed with different concentrations of chitosan in diets]. 2013 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

O presente estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes concentrações de quitosana nas dietas de vacas em lactação sobre o consumo, digestibilidade aparente total da matéria seca e nutrientes, fermentação e síntese de proteína microbiana ruminal, produção e composição do leite, concentrações de parâmetros sanguíneos, perfil de ácidos graxos na gordura do leite, e os balanços de energia e de nitrogênio. Foram utilizadas 16 vacas da raça Holandesa, multíparas, pesando em média 610 kg, agrupado em 4 quadrados latinos 4x4 contemporâneos e balanceados, possuindo respectivamente 60, 81, 102, 123 dias em lactação ao início de cada período experimental nos quais foram oferecidos as seguintes dietas: 1) Controle; 2) Quitosana 50; 3) Quitosana 100 e 4) Quitosana 150 compostas, respectivamente, com a inclusão de 0, 50, 100 e 150 mg/kg de peso corporal de quitosana. Foi utilizada dieta com a proporção volumoso:concentrado de 50:50. A suplementação com quitosana foi fracionada em duas porções de mesmo peso, colocada sobre o concentrado imediatamente antes do primeiro e do segundo fornecimento das rações. 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 e silagem foram coletadas do 15º ao 21º 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 da matéria seca e nutrientes a quantidade total de fezes excretada foi estimada pela concentração de fibra em detergente ácido indigestível (FDAi). As amostras de líquido ruminal foram coletadas com a utilização de sonda esofágica três horas após a alimentação matinal. A produção de leite e o consumo de matéria seca foram mensurados diariamente durante todo o período experimental. As amostras utilizadas para análise da composição do leite foram coletadas no 16º dia de cada período experimental, sendo provenientes das duas ordenhas diárias. Amostras de urina foram

no 16º dia de cada período experimental, quatro horas após a alimentação matinal, durante micção estimulada por massagem na vulva. As amostras de sangue foram coletadas em tubos vacuolizados por punção da veia e/ou artéria coccígea. Não houve efeito para as variáveis de consumo da matéria seca e nutrientes, fermentação e síntese de proteína microbiana ruminal, produção e composição do leite. Foi observado efeito linear para as variáveis ureia e nitrogênio ureico no soro; excreção de N-Fecal (% Nitrogênio Total). No entanto, houve efeito linear decrescente ($P < 0,05$) para as variáveis excreção de N-Fecal (g/dia) e concentrações dos ácidos graxos de cadeia curta ($< C16$), sendo encontradas menores concentrações de AG em dietas que houveram inclusão de quitosana, porém, as concentrações de ácidos graxos de cadeia longa ($> C16$) foram inversamente correlacionadas, a qual, observou maior concentração para as dietas em que houveram inclusão do aditivo. Houve efeito quadrático das dietas experimentais sobre a digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta e fibra em detergente neutro; eficiência de utilização de Energia e Nitrogênio; excreção de N-Leite (% Nitrogênio Total). Da mesma forma, observou-se efeito quadrático das dietas experimentais sobre a concentração total dos ácidos graxos de cadeia com 18 carbonos ($C18$), a qual foi observado maior concentração de AG quando incluído 100mg/kg PV de quitosana. O mesmo efeito ocorreu para o total de AG insaturados ($C18$ insaturado), dado em que se verifica numericamente maior concentração para a dieta com 100 mg/kg PV de quitosana. A utilização de quitosana como aditivo modulador da fermentação ruminal em rações de vacas leiteiras no terço médio de lactação, tendo como volumoso a silagem de milho, não alterou o consumo de alimentos e o desempenho, no entanto, houve melhora na digestibilidade aparente total da matéria seca e nutrientes, assim como também na eficiência de utilização de nitrogênio.

Palavras-chave: Vacas leiteiras. Quitosana. Digestibilidade. Modulador fermentação ruminal.

Perfil de ácidos graxos.

ABSTRACT

MINGOTI, R. D. **Productive performance, digestion and metabolism in dairy cows fed with different concentrations of chitosan in diets** [Desempenho produtivo, digestão e metabolismo em vacas leiteiras alimentadas com diferentes concentrações de quitosana nas dietas] 2013 107p. Dissertation (Master of Science) - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Pirassununga, 2013.

This study was carried to evaluate the effect of different levels of chitosan in feeding of dairy cows in lactation on intake and nutrients digestibility, ruminal fermentation, microbial protein synthesis, productive performance, fatty acids profile of milk fat, concentrations of blood parameters, balance of energy and nitrogen. Sixteen Holstein cows, multiparous, weighing an average 610 kg, was allocated in four latin squares balanced 4x4, having respectively 60, 81, 102, 123 days in milk at the start of each experimental period, in which were offered the following diets: 1) Control (CT), 2) 50 Chitosan (Q50) 3) Chitosan 100 (Q100 and 4) Chitosan 150 (Q150) respectively composed with the inclusion of 0, 50, 100 and 150 mg / kg body weight of chitosan. The diets consisted of corn silage and concentrate in ratio 50:50. Supplementation with chitosan was fractionated into two portions of equal weight and put above the concentrate immediately before the first and second feeding. Daily, weight measurements were carried of amount of forage and concentrates provided and remnant from the diets from each animal to estimate the intake. Samples of silage, remnant from diets and feces were collected the 15th to the 18th day of each experimental period, stored in plastic bags in a freezer at -20°C, and later undergoing analyzes chemical bromatologic of major nutrients. The digestibility was determined using of an internal indicator (FDAi). The samples of ruminal liquid were collected with use of esophageal probe three hours after the morning feeding. The milk production and dry matter intake were measured daily during the whole experimental period. The samples used for analysis of milk composition were collected in the 16th day of each experimental period, derived to the two daily milkings. *Spot* urine samples were obtained on the 16th day of each experimental period, four hours after the morning feeding during urination stimulated by massage at the vulva. Blood samples were collected in tubes vacuolized by venipuncture and / or coccygeal artery. There was no effect for the variables of intake of dry matter and nutrients, fermentation and microbial protein synthesis ruminal, milk production and composition. Linear effect was observed for the variables urea

excretion N-fecal (% Total Nitrogen). However, there was negative linear effect ($P < 0.05$) for the variables of excretion N-Fecal (g / day) concentrations of short chain fatty acids ($< C16$) and observed lower concentrations of FA in diets that there was adding chitosan, however, concentrations of long chain fatty acids ($> C16$) were inversely correlated, in which noted higher concentrations was at the diets there was wherein inclusion of the additive. There was quadratic effect of experimental diets on digestibility of dry matter, organic matter, crude protein and neutral detergent fiber; utilization efficiency Energy and Nitrogen; excretion of N-Milk (% Total Nitrogen). Similarly, we observed a quadratic effect of experimental diets on the total concentration of chain fatty acids with 18 carbons ($C18$), which was a higher concentration when included AG 100 mg / kg BW of chitosan. The same effect was seen for the total fatty acids, unsaturated ($C18$ unsaturated), where there was numerically, greater concentration in the diet with 100 mg / kg BW of chitosan. The use of chitosan as an additive modulator ruminal fermentation in feed of lactating cows in mid lactation, feeding with corn silage, did not showed change at food intake, however, showed improvement in apparent digestibility of dry matter and nutrients as well as, in the use of nitrogen efficiency.

Keywords: Dairy cows. Chitosan. Digestibility. Rumen fermentation modulator. Fatty acid profile.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AG	Ácidos Graxos
AGL	Ácidos Graxos Livres
AGPI	Ácidos Graxos Poliinsaturados
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
CLA	Ácido Linoléico Conjugado
CMS	Consumo de Matéria Seca
DAT	Digestibilidade Aparente Total
DP	Derivados de Purina
ED	Energia Digestível
EE	Extrato Etéreo
ELg	Energia Líquida de Ganho
ELL	Energia Líquida de Lactação
EM	Energia Metabolizável
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
FS	Farelo de Soja
GGT	Gama Glutamiltransferase
GS	Grão de Soja
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
JDS	Journal of Dairy Science
MN	Matéria Natural
MO	Matéria 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
PDR	Proteína Degradável no Rúmen
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLC	Produção de Leite Corrigida

PNDR	Proteína Não Degradável no Rúmen
PV	Peso Vivo
RBZ	Revista Brasileira de Zootecnia
SM	Silagem de Milho

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

QUADRO 1 - Aplicações da Quitina, Quitosana e seus Derivados na Indústria de Alimentos	34
FIGURA 1 – Estrutura Química da Quitosana	35
QUADRO 2 – Principais Características da Quitosana nas Aplicações Biomédicas	36

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Proporção dos Ingredientes no Concentrado e na Ração, Expressos na Matéria Seca (%MS)	55
TABELA 2 - Composição Bromatológica dos Alimentos da Ração.....	55
TABELA 3 - Composição Bromatológica do Concentrado e da Ração.....	56
TABELA 4 - Média Ajustada e Erro Padrão da Média dos Consumos de Matéria Seca e Nutrientes em Função das Dietas Experimentais.....	66
TABELA 5 – Média Ajustada e Erro Padrão da Média para os Coeficientes de Digestibilidade Aparentes Totais da Matéria Seca e Nutrientes em Função das Dietas Experimentais	68
TABELA 6 – Parâmetros de Fermentação Ruminal em Função das Dietas Experimentais.....	71
TABELA 7 – Médias Ajustadas e Erro Padrão da Média de Síntese de Proteína Microbiana Ruminal em Função das Dietas experimentais	73
TABELA 8 – Desempenho Produtivo de Acordo com as Dietas Experimentais	75
TABELA 9 – Médias Ajustadas e Erro Padrão da Média para o Perfil de Ácidos Graxos da Gordura do Leite de Acordo com as Dietas Experimentais.....	78
TABELA 10 - Médias Ajustadas e Erro Padrão da Média para o Balanço de Energia em Função das Dietas Experimentais	80
TABELA 11 - Médias Ajustadas e Erro Padrão da Média para Balanço de Nitrogênio em Função das Dietas Experimentais	81
TABELA 12 – Parametros Sanguíneos de Acordo com as Dietas Experimentais	83

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	HIPÓTESE.....	21
3	OBJETIVOS	22
4	REVISÃO DE LITERATURA	23
4.1	ADITIVOS NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES.....	23
4.2	MODULADORES DA FERMENTAÇÃO RUMINAL	24
4.2.1	ANTIMICROBIANOS	24
4.2.1.1	IONÓFOROS VS UNIÃO EUROPEIA	28
4.2.1.2	IONÓFOROS VS SAÚDE HUMANA.....	28
4.2.2	ANTIMICROBIANOS NÃO IONÓFOROS	30
4.2.3	ÓLEOS ESSENCIAIS	31
4.2.4	PROBIÓTICOS.....	32
4.3	QUITOSANA: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES	33
4.3.1	QUITOSANA COMO ANTIMICROBIANO	36
4.3.2	UTILIZAÇÃO DA QUITOSANA NA MEDICINA VETERINÁRIA	38
4.3.3	UTILIZAÇÃO DA QUITOSANA NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES.....	40
4.3.3.1	CONSUMO E DIGESTIBILIDADE	42
4.3.3.2	FERMENTAÇÃO RUMINAL	44
4.3.3.3	SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA RUMINAL.....	45
4.3.3.4	PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE.....	47
4.3.3.5	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE	48
4.3.3.6	PARÂMETROS SANGÜÍNEOS	49
5	MATERIAL E MÉTODOS	53
5.1	LOCAL, INSTALAÇÕES E ANIMAIS.....	53
5.2	DELINEAMENTO E DIETAS EXPERIMENTAIS	53
5.3	ANÁLISE DE ALIMENTOS	54
5.4	DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL.....	56
5.5	FERMENTAÇÃO RUMINAL	57
5.6	SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA	58
5.7	BALANÇO DE ENERGIA.....	60
5.8	BALANÇO DE NITROGÊNIO.....	61
5.9	PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE.....	62

5.10	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE	63
5.11	PARÂMETROS SANGUÍNEOS	63
5.12	AVALIAÇÃO DO ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E PESO CORPORAL	64
5.13	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	64
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
6.1	CONSUMO MATÉRIA SECA E NUTRIENTES.....	66
6.2	DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL.....	68
6.3	FERMENTAÇÃO RUMINAL	70
6.4	SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA	72
6.5	PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE.....	74
6.6	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NO LEITE	76
6.7	BALANÇO DE ENERGIA.....	79
6.8	BALANÇO DE NITROGÊNIO.....	81
6.9	PARÂMETROS SANGUÍNEOS	83
7	CONCLUSÕES.....	87
8	IMPLICAÇÕES	88
	REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

Frente a inúmeros desafios que a bovinocultura leiteira enfrenta diariamente para sobreviver em nosso país é de fundamental importância que o meio acadêmico/científico abasteça a atividade com informações relevantes e estratégias inteligentes que auxiliem o produtor a alcançar sucesso na atividade. 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. Na bovinocultura leiteira, os gastos com alimentação representam um dos principais componentes do custo de produção, oscilando entre 35 a 65%, dependendo da atividade e tipo de exploração. Fundamentado nestes conhecimentos, nutricionistas analisam minuciosamente os pontos críticos da atividade e concentram pesquisas no intuito de incrementar a eficiência de utilização dos alimentos pelos animais, aumentando o desempenho produtivo e trazendo resultados satisfatórios ao sistema de produção.

Neste sentido, nas últimas décadas, diferentes moduladores de fermentação ruminal têm sido utilizados em sistemas de produção animal. Entre estes, destacam-se a utilização de antimicrobianos, que promovem efeitos benéficos, como a prevenção de alterações na saúde dos animais e melhoria no aproveitamento dos nutrientes contidos nos alimentos.

Em meados da década de 70, o uso de ionóforos foram aprovados 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 também liberaram a utilização destes produtos para bovinos (NRC, 2001). Exemplos de ionóforos são monensina, lasalocida e a salinomicina, os quais, em sua maioria, são produtos da fermentação de vários actinomicetos, podendo ser utilizados no intuito de melhorar a eficiência da fermentação ruminal e o desempenho produtivo dos animais. Entre os diversos efeitos que os ionóforos geram no ambiente ruminal, destaca-se o aumento na produção de propionato e os decréscimos na produção de acetato, butirato e metano, aumento no aporte de glicose para a síntese de leite, influenciando diretamente a produção devido ao maior número de precursores para a síntese de lactose.

No entanto, após anos de pesquisas e solidificação do conhecimento, a pecuária tem tido um enorme entrave. Em 2006, à União Europeia banuiu os antimicrobianos como promotores de crescimento animal, estando os ionóforos incluídos na lista. A alegação é a possível presença de resíduos no leite e na carne, além da maior probabilidade de aparecimento de resistência

bacteriana aos antimicrobianos usados na medicina humana (OJEU, 2003). Contudo, ainda inexistem base científica justificando que ionóforos aumentem os riscos de transferência cruzada de resistência microbiana (CALLAWAY et al., 2003; RUSSELL; HOULIHAN, 2003). É evidente o papel da União Europeia como formadora de opinião. É plausível admitir que exportadores mundiais de carne e leite serão pressionados a seguir esta decisão em futuro próximo. Frente ao duelo entre questões econômicas e de saúde pública, há crescente interesse científico por alternativas que mimetizem os efeitos dos ionóforos, sendo seguras ao consumo humano e, ao mesmo tempo, aceitas pela sociedade consumidoras.

Nesse âmbito, considerando o efeito benéfico da utilização destes aditivos não somente sob o ponto de vista das vantagens sanitárias e nutricionais, mas também consequentemente 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.

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) tendo ação também contra 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 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 momento, 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, como 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.

2 HIPÓTESE

A hipótese científica avaliada afirma que a utilização da dose adequada de quitosana na alimentação de vacas leiteiras altera a proporção dos ácidos graxos de cadeia curta melhorando a produção e composição do leite, sem interferir no consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes.

3 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de quitosana nas dietas de vacas em lactação sobre o consumo e digestibilidade aparente total da matéria seca e nutrientes, fermentação e síntese de proteína microbiana ruminal, produção e composição do leite, concentrações de parâmetros sanguíneos, perfil de ácidos graxos na gordura do leite, e os balanços de energia e de nitrogênio.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 ADITIVOS NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES

O Ministério da Agricultura na Lei 6.198/74 e seu regulamento - decreto 76.986/76, artigo 4 item VII, define aditivo como substância intencionalmente adicionada ao alimento com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades, desde que não prejudique seu valor nutritivo. A utilização de antimicrobianos na alimentação animal teve início na década de 50, objetivando-se a cura e prevenção de patologias por meio da exclusão de microrganismos competidores de substrato no trato gastrointestinal. Mesmo com a utilização de pequenas doses obtinha-se sucesso no crescimento, conversão alimentar e prevenção de infecções nos animais, o que surpreendia os produtores (MATOS, 2008). Os antimicrobianos podem ser divididos em dois grupos, ionóforos e não ionóforos, de acordo com o seu modo de ação. Os ionóforos começaram a ser utilizados durante a década de 70. São produzidos principalmente por bactérias do gênero *Streptomyces* (REIS, 2006). Em 1971, foi aprovada sua utilização para aves, com o objetivo de controle da coccidiose e em 1975, o Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos aprovou sua utilização como promotor de crescimento para bovinos confinados (McGUFFEY, 2001).

Existem seis ionóforos aprovados no Brasil, quatro para uso exclusivo em aves domésticas (lasalocida, maduramicina, narasina e senduramicina), um para uso em aves e bovinos (monensina) e um indicado para bovinos e suínos, além das aves domésticas (salinomicina) (SPISSO, 2010). A virginiamicina tem apresentado efeitos positivos sobre o ganho de peso e eficiência alimentar, tanto para monogástricos como para ruminantes (ROGERS et al., 1995; COE et al., 1999; IVES et al., 2002; AGUDELO et al., 2007; NUNEZ, 2008; STEWART et al., 2010). Em virtude da restrição ao uso de antimicrobianos como promotores de crescimento em dietas de animais nos países da Comunidade Europeia e pressões cada vez maiores de grupos de consumidores, tem crescido o interesse pelo uso de substâncias naturais promotoras de crescimento, tais como aditivos microbianos (bactérias, fungos e leveduras) (GOES et al., 2005).

4.2 MODULADORES DA FERMENTAÇÃO RUMINAL

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

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

São várias as substâncias que podem ser utilizadas para essa funcionalidade, sendo elas:

- Antimicrobianos 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 Salinomycin Sódica;
- Antimicrobianos não ionóforos, sendo a Virginiamicina o principal exemplo dessa classe;
- Óleos essenciais;
- Probióticos.

4.2.1 ANTIMICROBIANOS

Antimicrobianos ionóforos são moléculas de baixo peso molecular produzidas por cepas de *Streptomyces sp.* (OVCHINNIKOV, 1979). Esses aditivos são utilizados extensamente na produção animal por melhorar a eficiência do metabolismo energético e proteico e diminuir a incidência de distúrbios digestivos, resultando em aumento na produtividade animal (BERGEN; BATES, 1984). De acordo com Millen et al. (2009) os ionóforos são os principais aditivos alimentares utilizados em confinamentos brasileiros. De acordo com Austic e Smith (1980), ionóforo é um termo genérico aplicado a um número de compostos do grupo dos antimicrobianos denominados poliésteres, contendo um radical carboxílico, o qual facilita a difusão de íons através de barreiras lipídicas, como as membranas celulares. São assim chamados por causa de sua propriedade transportadora de íons, possuindo capacidade de formar complexos lipossolúveis com cátions e mediar seu transporte através das membranas lipídicas. São úteis no controle da acidose ruminal, pois deprimem ou inibem os microrganismos gram-

positivos que são produtores primários de ácido láctico, sem impedir a utilização deste por bactérias gram-negativas como *Megasphaera Elsdenii* e *Selenomonas ruminantium* (NAGARAJA; TAYLOR 1987).

Os ionóforos são altamente efetivos contra bactérias gram-positivas, e exibem pouca ou nenhuma atividade contra bactérias gram-negativas. As bactérias gram-negativas possuem uma camada lipídica externa que contém porinas (canais de proteínas) com um tamanho limite de aproximadamente 600 Dalton. A maioria dos ionóforos é maior que 600 Dalton, não passando através das porinas (NAGAJARA et al., 1997). As bactérias gram-positivas não possuem essa camada externa e o ionóforo pode penetrar livremente na membrana celular.

As bactérias mantêm altas concentrações internas de K^+ , maiores do que no meio externo. Para manter o interior mais alcalino, as células expõem prótons através da membrana celular. Altas concentrações de K^+ no interior da célula são necessárias para tamponar o pH por meio da troca de K^+/H^+ . Para que o pH se estabilize, o excesso de prótons deve ser expulso da célula. Um gradiente químico de prótons é formado juntamente com um potencial elétrico, que vão ser responsáveis pela formação da força motriz de prótons, utilizada para importar solutos para o interior da membrana.

O mecanismo de ação dos ionóforos está relacionado a sua habilidade em alterar o fluxo de cátions através da membrana. Segundo McGuffey (2001), cada ionóforo é capaz de se ligar conforme seu tamanho com um cátion apropriado. A ligação com o cátion inicia a formação do complexo cátion-ionóforo, o qual pode difundir-se pelo interior da membrana. A monensina, como um dos exemplos, faz o antiporte de sódio/potássio, decrescendo a concentração de potássio celular e o influxo de prótons, resultando no abaixamento do pH intracelular. Uma vez que o pH intracelular está baixo, a monensina catalisa efluxo de prótons em mudança com o sódio (RUSSEL, 1987; STROBEL et al., 1989; CHEN; RUSSEL, 1989). Para conter a queda de pH pelo influxo de prótons e sódio, a célula transporta prótons para fora, através das bombas Na^+/K^+ e de próton ATPase. Inicialmente, a célula ainda continua sendo capaz de metabolizar a glicose, no entanto, com o passar do tempo, ela diminui seu metabolismo interno para sobreviver. Isso deve-se ao gasto de energia com as bombas de Na^+/K^+ e de próton ATPase, fazendo com que ocorra um declínio de ATP intracelular. Com essa diminuição do ATP intracelular, a célula se mantém em um estado de letargia, ou acaba morrendo (RUSSEL; STROBEL, 1989).

Os diferentes ionóforos têm um modo de ação comum, com pequenas diferenças, como a especificidade por cátions. De acordo com Pressman (1976), a ordem de seletividade para a

monensina é $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Li}^+ > \text{Cs}^+$ enquanto que para a salinomicina a ordem de seletividade é descrita como: $\text{Rb}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Sr}^{++} > \text{Ca}^{++}, \text{Mg}^{++}$ (MITANI et al., 1975).

Pesquisas que envolvem monensina sódica para vacas em lactação têm produzido resultados divergentes, indicando haver interações entre fatores dietéticos e fisiológicos envolvidos (IPHARRAGUERRE; CLARK, 2003). Fatores como o volumoso utilizado, o período de lactação, o nível de produção e a dose utilizada de monensina sódica interagem e geram resultados muitas vezes contraditórios nos estudos. Desta forma, para haver correta avaliação de resultados a respeito deste ionóforo, deve se considerar todos esses aspectos muito bem definidos.

Em relação ao volumoso utilizado com a suplementação de monensina sódica, Eifert et al. (2005), utilizando silagem de milho como volumoso para vacas no início da lactação, com dose de 16 mg/kg MS de monensina, não encontraram diferença no consumo de matéria seca (17,8 vs. 17,8 kg/dia) e na produção de leite (26,6 vs. 25,9 kg/dia) em relação a dieta controle, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados por Martineau et al. (2007) quando utilizaram silagem de leguminosas para animais no mesmo período de lactação e com dose de monensina de 24 mg/kg MS. Gallardo et al. (2005) utilizaram pastagem de alfafa associada a suplementação de 16 mg/kg MS de monensina. Também para animais no mesmo período de lactação e observaram diferença na produção de leite (27,7 vs. 26,6 kg/dia) em relação a ração controle.

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

O período de lactação dos animais é o fator que tem maior influência sobre a resposta a suplementação com monensina sódica em vacas leiteiras. Segundo Ipharraguerre e Clark (2003) a monensina aumenta as concentrações plasmáticas de glicose e reduz a quantidade no plasma de ácidos graxos não-esterificados e de corpos cetônicos, que estão associados à redução no consumo no início da lactação.

Baseado no potencial da monensina em aumentar a provisão de precursores glicogênicos, diversos autores sugeriram o uso da monensina em vacas no período de transição, onde a administração de monensina para vacas neste período da lactação pode aumentar a síntese hepática de glicose e, então, melhorar o balanço de energia em vacas neste período.

A concentração de glicose no sangue de vacas leiteiras suplementadas com monensina aumentaram ou se mantiveram inalteradas. Porém, de 13 estudos compilados por Ipharraguerre e Clark (2003), somente em quatro houve aumento significativo na concentração da glicose plasmática, além disso, nestes estudos o aumento na disponibilidade deste metabólico foi relativamente pequeno (5,9%). A resposta para administração de monensina foi significativa quando foram suplementadas vacas com doses que variavam de 16 a 17 mg/kg MS, com período de pelo menos 6 semanas pré-parto ou dentro das primeiras 2 semanas de lactação.

As revisões de Ipharraguerre e Clark (2003) e McGuffey et al. (2001) sugerem que a redução no consumo, característica verificada em bovinos de leite, parece ser mais frequente quando as vacas estão no terço médio e final da lactação. No início da lactação, a utilização de monensina reduziu em 2% o consumo e aumentou a produção de leite em 9,2% (PHIPPS et al., 2000). Também no início da lactação, Duffield et al. (1999) verificaram que a resposta à monensina foi dependente do escore de condição corporal. Enquanto não observaram resposta em vacas com escore de condição corporal $\leq 3,25$, verificaram aumentos de 1,5% na produção de leite em vacas com escores entre 3,25 e 3,75, e de 7,4% naquelas com escores $\geq 3,75$.

Segundo McGuffey et al. (2001); Ipharraguerre e Clark (2003) e Duffield et al. (2008a), a dose de monensina sódica para vacas leiteiras em qualquer período de lactação ou submetidas a qualquer tipo de volumoso pode ser definida de duas formas, 16 mg/kg MS ou 24 mg/kg MS, sendo está última forma utilizada para animais em produção, e a primeira em animais em crescimento ou em período de transição. Doses superiores a estas não são recomendadas, pois podem causar queda no desempenho produtivo dos animais ou até mesmo intoxicações (PLAIZER et al. 2000).

Bagg et al. (2005) utilizando doses de 72, 144 e 240 mg/kg MS de monensina sódica em rações de vacas no início de lactação, observou queda de 61,7% e 23,7% no consumo de matéria seca e produção de leite, respectivamente, nas rações com 240 mg/kg MS, já no 3º dia de suplementação, sendo o tratamento interrompido por sinais clínico de intoxicação, onde observações semelhantes foram relatadas para a ração com 144 mg/kg MS. Na ração com 72 mg/kg MS foi observada redução persistente no consumo de matéria seca de 20%, e na produção de leite, de 9%.

4.2.1.1 IONÓFOROS VS UNIÃO EUROPEIA

Em 1999, baseando-se no “Princípio da Precaução” a União Europeia banuiu a utilização de antimicrobianos como promotores de crescimentos (espiramicina, bacitracina de zinco, tilosina e virginiamicina) (REGULAMENTAÇÃO 1831/2003/EC), baseados no conceito de que a resistência de humanos aos antimicrobianos poderia ser influenciada pelo seu uso rotineiro na alimentação animal (GUSTAFSON; BOWEN, 1997)., mas a proibição do uso de ionóforos como aditivos alimentares (monensina sódica e lasalocida) somente ocorreu em 2006. Este princípio é uma prerrogativa para as autoridades da UE, mesmo na ausência de dados científicos conclusivos onde adotaram uma “postura preventiva” em relação a determinada questão (LOYOLA et al., 2006). Outros países, no entanto, adotam o “Princípio da prova”, baseando-se em evidências científicas para uma tomada de decisão, como o caso dos Estados Unidos e Brasil.

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). Contudo, ainda inexistem base científica justificando que ionóforos aumentem os riscos de transferência cruzada de resistência microbiana (CALLAWAY et al., 2003; RUSSELL; HOULIHAN, 2003). É evidente o papel da União Europeia como formadora de opinião. É plausível admitir que exportadores mundiais de carne e leite serão pressionados a seguir esta decisão em futuro próximo. Frente ao duelo entre questões econômicas e de saúde pública, há crescente interesse científico por alternativas que mimetizem os efeitos dos ionóforos, sendo seguras ao consumo humano e, ao mesmo tempo, aceitas pela sociedade consumidora.

4.2.1.2 IONÓFOROS VS SAÚDE HUMANA

Devido ao uso não criterioso de ionóforos, na década de 60, surgiram os primeiros relatos de resistência microbiana, acarretando redução na eficiência do uso deste produto como agente terapêutico em animais e humanos. A transmissão de microrganismos resistentes ao homem ocorreria por meio do consumo de carnes, leite e derivados ou pelo convívio com animais.

Desde 1998, a União Europeia vem procurando eliminar o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, ou indicações como aditivos alimentares sob o Anexo B da Diretriz 70/524/EEC. Essa medida é baseada no “Princípio da precaução” e pretende promover controle mais restrito ao uso de antimicrobianos, passando a registrar esse tipo de produto como — medicamento veterinário — sob a Diretriz 81/851/EEC (revogada e substituída pela Diretriz 2001/82/EEC, emendada pela Diretriz 2004/28/EC). A União Europeia e os Estados-membros associados continuam a reconhecer a necessidade do uso de antimicrobianos para tratar, controlar e prevenir doenças animais (uso terapêutico). Países como os Estados Unidos, por exemplo, tem tomado um rumo diferente, adotando o “Princípio da Prova”, que exige que se reúnam evidências de que o problema ocorreu antes de proceder a alguma medida de controle. De acordo com o FDA, acredita-se que a adoção do “Princípio da Precaução” reduz as oportunidades de saber se existe real risco e sua magnitude. A Dinamarca iniciou um processo de restrição de todos os promotores de crescimento em 1999.

Após a restrição, o uso de promotores de crescimento caiu à zero, porém a prevalência de algumas doenças cresceu significativamente e foi seguida de aumento brutal no uso de antimicrobianos terapêuticos (DANMAP, 1999, 2000, 2001, 2002). O paradoxo é que a maior parte dos antimicrobianos possui análogos utilizados em medicina humana, podendo proporcionar risco muito maior ao desenvolvimento de resistência bacteriana. De acordo com diversos estudos, a ingestão pelo ser humano de resíduos de antimicrobianos de uso aprovado e regulamentado pelas autoridades governamentais, e abaixo dos limites máximos de resíduos fixados pelo Codex (organismo da FAO/OMS), é segura para a população, do ponto de vista toxicológico, e não induz o surgimento de bactérias resistentes no trato gastrointestinal (NETO, 2003). Referindo-se diretamente aos ionóforos, estudos realizados com a monensina (DONOHO, 1984; TEDESCHI et al., 2003) em animais de laboratório e de produção para determinar as concentrações nos tecidos, rotas de eliminação, metabolismo e farmacocinética, indicaram que a monensina administrada oralmente é absorvida, extensivamente metabolizada, excretada na bile e eliminada nas fezes pelas diferentes espécies avaliadas.

Estes e outros estudos permitiram a aprovação dos ionóforos em diferentes lugares do mundo, sem que fosse exigido período de carência tanto para o abate quanto para a comercialização do leite de animais tratados com monensina. De acordo com Spisso (2010), existem dois ionóforos aprovados indicados para uso em bovinos no Brasil a monensina e a salinomicina. Alguma restrição ao seu uso pode ocorrer para que sejam atendidas eventuais exigências de importadores de carne na União Europeia (não por lei, mas por demanda do importador para mercados específicos).

4.2.2 ANTIMICROBIANOS NÃO IONÓFOROS

A virginiamicina (VM) é antibacteriano produzido pela bactéria *Streptomyces virginiae*, isolada em 1954 de uma amostra de solo Belga (DeSOMER; VAN DIJCK, 1955¹ apud PAGE, 2003). É um composto natural formado por dois componentes químicos distintos: fator M ($C_{28}H_{35}N_3O_7$) e fator S ($C_{43}H_{49}N_7O_{10}$) (CROOY; DE NEYS, 1972) e apresenta atividade principalmente contra bactérias gram-positivas. Não apresenta efeito sobre a maioria das bactérias gram-negativas em função da impermeabilidade da parede celular (COCITO, 1979; PAGE, 2003). A atividade antibacteriana da VM depende da interação sinérgica de seus dois componentes, fator M e fator S. Cada fator individualmente tem atividade contra bactérias, mas quando os dois são combinados, a atividade se torna muito mais forte. Os fatores M e S possuem um efeito sinérgico quando combinados à razão de 4:1, respectivamente (VANDERHAEGHE; PARMENTIER, 1960). A VM penetra na parede celular das bactérias gram-positivas e liga-se a uma unidade cromossomal, inibindo a formação da ligação peptídica durante o processo de síntese proteica bacteriana (COCITO, 1979; DiGIAMBATTISTA et al., 1989). Processos metabólicos são rompidos dentro da célula, cessando a multiplicação da bactéria e morte.

A VM proporciona redução na ingestão de matéria seca, melhoria da eficiência alimentar, diminuição da degradação proteica, da produção de amônia, aumento de propionato e redução de acetato e butirato, como também inibe as bactérias que produzem ácido lático, aumentando o pH ruminal.

Ives et al. (2002) trabalhou com duas dietas diferentes, uma com 90 e 95% de concentrado, contendo 17,5 ppm de virginiamicina e 25 ppm de monensina + 10 ppm de tilosina. Na primeira dieta, a VM se mostrou mais eficaz em reduzir a concentração de acetato e aumentar a concentração de propionato em relação ao tratamento controle e ao tratamento contendo monensina+tilosina. Na segunda dieta a VM se mostrou mais eficaz em aumentar propionato e diminuir butirato em relação aos demais tratamentos. Não houve efeito da VM sob a concentração de lactato.

Nunez (2008) também avaliou dois tipos de dietas, uma com 73% e com 91% de concentrado e as dietas continham 13 ppm de salinomicina e duas doses de virginiamicina (0 e 15 ppm). A presença dos aditivos proporcionou diminuição da ingestão de matéria seca (-8,91%), melhor eficiência alimentar (+12,82), maior eficiência da utilização de energia

metabolizável (+11,23%), maior teor de energia líquida para manutenção (+8,17%) e para ganho (+10,63%) em comparação com a dieta controle. A combinação de aditivos resultou em melhor desempenho animal que o fornecimento de salinomicina exclusiva.

4.2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

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

Desde a declaração da proibição de antimicrobianos como aditivos de alimentos na União Europeia, tem havido interesse crescente pelo estudo dos efeitos e mecanismos de ação de óleos essenciais na fermentação microbiana ruminal.

Nos últimos seis anos, 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). (*Eucalyptus globulus*, *Zingiber officinale*, *Allium sativum*, *Origanum vulgare*, *Armoracia rusticana*, *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum cassia*, *Salvia officinalis*, *Equisetum arvense*, *Solidago virgaurea*, *Lavandula officinalis*, *Ginkgo biloba*, *Bétula Alba*, *Arnica chamissonis*, *Achillea millefolium*) na fermentação microbiana ruminal *in vitro* (CARDOZO et al., 2004). Entre estes, *L. officinalis*, *S. virgaurea* e *A. millefolium* estimularam a fermentação ruminal, e *E. arvense*, *A. rusticana*, e *S. officinalis* inibiram a metanogênese (BROUDISCOU et al., 2002). Outros tipos de óleos de planta como *C. cassia*, *A. sativum* e *S. aromaticum* modificaram a produção e o perfil de ácidos graxos de cadeia curta, o metabolismo de nitrogênio ou ambos (BUSQUET et al., 2006).

Em síntese, alguns tipos de óleos essenciais estimularam a fermentação ruminal, enquanto que outros inibem a metanogênese (BROUDISCOU et al., 2002). 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. Outros resultados, têm indicado que o óleo essencial de alho, o

eugenol (principal componente ativo do cravo), a capsaicina (componente ativo da pimenta), e o óleo essencial de erva-doce, podem aumentar a produção de propionato, reduzir a produção de metano e modificar a proteólise ou a deaminação ruminal.

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

4.2.4 PROBIÓTICOS

Devido à ênfase dada à redução do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, nos últimos anos, houve um crescente aumento no interesse pela utilização de aditivos microbianos na alimentação animal. O FDA dos Estados Unidos descreve o termo DFM (direct-fed microbials) como fonte natural de microrganismos (viáveis). Por solicitação do FDA, os fabricantes de tais aditivos passaram a utilizar a denominação DFM em substituição ao termo probiótico. Atualmente cerca de 40 microrganismos diferentes são reconhecidos como seguros para serem utilizados nos alimentos (REGULAMENTAÇÃO 1831/2003/EC).

Bactérias, fungos e leveduras se enquadram na categoria de DFMs. Bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e, em menor escala, *Enterococcus faecium*, são mais frequentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos (SAAD, 2006). Com relação às leveduras, uma das formas encontradas e amplamente utilizada é a levedura desidratada *Saccharomyces cerevisiae*, resíduo da indústria sucro-alcooleira. São recuperadas através de processo de centrifugação na fermentação alcoólica do melaço após estarem secas e moídas, são então destinadas à suplementação dos animais (BERTO, 1985).

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.

4.3 QUITOSANA: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES

A quitosana é polissacarídeo de ocorrência natural que tem revelado versatilidade e propriedades promissoras para sua utilização segura em 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 polissacarídeo oriundo da quitina, sendo está o segundo polímero mais abundante na natureza, depois somente da celulose. A quitina é 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-glicopirranose (GlcNAc) unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, enquanto a quitosana é composta predominantemente por unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcN) (Figura 1) unidas pelo mesmo tipo de ligação (ROBERTS, 1994).

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

Área de Aplicação	Exemplos
Agente antimicrobiano	Bactericida; Fungicida Controle de contaminação em commodities agrícolas
Indústria de filmes comestíveis	Transferência controlada de umidade 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
Outras aplicações	Imobilização de enzimas Encapsulamento de nutracêuticos Cromatografia Reagentes analíticos

Fonte: Adaptada de Shahidi et al. (1999)

Figura 1 – Estrutura química da quitosana

Fonte: Adaptada de Shahidi et al. (1999)

A diferenciação entre a quitina e a quitosana é feita pela porcentagem de unidades GlcNAc e GlcN, sendo o grau médio de acetilação 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 dos animais, 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 envolvendo a utilização da quitosana com aplicação terapêutica (LI et al., 2005; BUETER et al., 2011; KÖKSAL et al., 2011), sendo seu principal emprego em decorrência de suas propriedades cicatrizantes, homeostáticas e imunológicas (Quadro 2).

Quadro 2 – Principais características da quitosana nas aplicações biomédicas

Aplicação biomédica	Principais características
Suturas cirúrgicas Implantes dentários Enxertos de pele Reconstrução óssea Lentes de contato córnea Liberação de drogas para animais e humanos Material para encapsularização	Biocompatibilidade Biodegradabilidade Formação de filmes Agente hidratante Atóxico, tolerância biológica Propriedades cicatrizantes Eficiência contra bactérias, vírus e fungos
Agricultura	Mecanismo de defesa para plantas Estimulador de crescimento em plantas Revestimento de sementes, proteção contra geadas Liberação lenta de fertilizantes e nutrientes no solo
Água e tratamento de resíduos	Flocculante para clareamento de água (consumo e piscinas) Removedor de íons metálicos Minimização de odores
Indústria cosmética	Umectante e tônico para pele Tratamento de acne Melhoramento da elasticidade do cabelo Higiene oral (creme dental e gomas)
Biofarmacêutica	Imunológico, antitumoral Hemostático e anticoagulante Cicatrizante, bacteriostático

Fonte: Adaptada de Rinaudo et al. (2006)

4.3.1 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 policatiónica e as cargas eletronegativas na superfície da célula. A quitosana interage com a superfície lipopolissacarídea (LPS) das bactérias gram negativas e da mesma forma com a fração peptidoglicana 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 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 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 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 concluíram que a ligação da quitosana aos polímeros da parede celular bacteriana causaram 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 oxigenação 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.

4.3.2 UTILIZAÇÃO DA QUITOSANA NA MEDICINA VETERINÁRIA

A utilização da quitosana na medicina veterinária não tem sido amplamente empregada como na indústria de alimentos 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 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, em que a digestibilidade da quitosana mostrou-se entre 88% e 98% (HIRANO et al. 1990), foi concluído que a ausência de digestibilidade 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 microrganismos 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.

4.3.3 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 importante classe de animais de produção, como ocorre no comércio mundial da pecuária de corte e leite.

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 internacionais notórias 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 propriedade que pode intervir diretamente na sua atividade bactericida (KONG et al., 2008). Deste modo, Goiri et al. (2009c) utilizaram seis diferentes tipos de quitosana e realizaram avaliação “*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 de 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 de 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 C2:C3.

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 modulador de fermentação ruminal 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 descritos anteriormente 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.

4.3.3.1 CONSUMO E DIGESTIBILIDADE

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.

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).

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.

Resultados de pesquisas refletem dados inconsistentes sobre o efeito da monensina sódica sobre a digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes em vacas em lactação.

É conhecido 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.

Estudos recentes mostram efeito da monensina sódica na digestibilidade aparente total da proteína em vacas leiteiras. Plaizer et al. (2000) reportaram aumento na digestibilidade da proteína quando suplementaram vacas leiteiras no início da lactação. Da Silva et al. (2008), Gehman et al. (2008) e Oelker et al. (2009) não observaram efeito da utilização da monensina sobre a digestibilidade da proteína em vacas no mesmo período de lactação. Discrepâncias entre estudos podem estar relacionadas à composição da dieta basal. De acordo com Plaizer et al. (2000) a monensina sódica aumenta a digestibilidade aparente total da proteína em rações com altas concentrações de forragens.

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.

Goiri et al. (2009), ao avaliarem 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, influenciou a digestibilidade da matéria orgânica, proteína bruta e extrato etéreo.

4.3.3.2 FERMENTAÇÃO RUMINAL

Como descrito anteriormente, a quitosana possui mecanismo de ação antimicrobiano para diversos tipos de microrganismos. 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.

Analizando os estudos *in vitro* e os estudo *in vivo* que avaliaram a quitosana e seus efeitos sobre a fermentação ruminal, conclui-se que 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 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. Esses autores reportaram que tanto a utilização da quitosana quanto da monensina reduziram a relação acetato:propionato, porém avaliaram 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 de cadeia curta 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 consequente 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 AGCC, 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 NH₃⁺ 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).

4.3.3.3 SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA RUMINAL

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 proteína para formulação de ração (BRODERICK; MERCHEN, 1992).

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 Pmic 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 de proteína microbiana não foi 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 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 Pmic.

4.3.3.4 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

O mecanismo de ação do ionóforo no ambiente ruminal está intimamente correlacionado com melhoras observadas na produção e composição do leite. O aumento da concentração molar de propionato aumenta o fluxo de glicogênio hepático, contribuindo com o aumento na produção (OBA; ALLEN, 2000). Da mesma forma, alterações na composição do leite também se relacionam com seu mecanismo de ação, porém, estão também relacionados com interações que a monensina estabelece com o estágio de lactação, tipo de volumoso e nível de produção dos animais (DUBUC et al., 2009).

A utilização da quitosana e sua relação com a produção e composição do leite não tem sido estudada até o momento, mas considerando o mecanismo de ação dos ionóforos pode-se esperar alguns resultados.

Tomando como base a ação de ionóforos, mais especificamente, a influência que a monensina sódica exerce sobre a eficiência produtiva em vacas leiteiras, cuidadosamente pode-se relacionar o consumo de matéria seca, nível de produção, dose utilizada e estágio de lactação.

McGuffey et al. (2001) analisaram dados de 11 experimentos com vacas suplementadas com premix de monensina sódica, e observaram efeito positivo ($P < 0,10$) de 1,3 kg de leite em relação ao controle. Em revisão de 32 experimentos, Ipharraguerre e Clark (2003) relataram aumento da produção em 14 experimentos e no restante, não foi observado nenhum efeito da suplementação de monensina. Dentre os trabalhos avaliados positivamente, houve aumento na produção de leite de 1,5 kg/dia, que representou superioridade de 7% em relação às rações controle.

Em estudo realizado por Osborne et al. (2004), foram suplementadas vacas no terço médio de lactação com dose de 22 mg/kg MS de monensina sódica, utilizando silagem de milho como volumoso, e não encontraram efeito sobre a produção de leite. Os mesmos resultados foram encontrados por Benchaar et al. (2006); Gehman et al. (2008); AlZahal et al. (2008) e Oelker et al. (2009), onde foram utilizados animais de mesmo período de lactação, dose de monensina e volumoso.

Discrepâncias entre estudos podem estar relacionadas a fatores como fase de lactação, dieta basal, e extensão do experimento. Além disso, Sauer et al. (1998) sugeriram que algumas mudanças adaptáveis podem acontecer com os microrganismos do rúmen quando se utiliza monensina, sendo que vacas que tinham recebido monensina previamente, não eram mais responsivas a segunda dosagem. A resposta para a suplementação de monensina em relação à

produção de leite também sofre influência da genética, onde vacas de nível de produção mais alto respondem melhor a suplementação (VAN DER WERF et al., 1998).

A monensina sódica reduziu o teor de gordura no leite em vários estudos, mas foram observadas grandes variações entre a monensina e a variável em questão. Estas variações podem ser explicadas devido à forma de suplementação e a dose de monensina utilizada, como os estudo de Phipps et al. (2000); Mackintosh et al. (2002); Duffield et al. (2003); Broderick (2004); Bell et al. (2006); Benchaar et al. (2006); Da Silva et al. (2008); Erasmus et al. (2008) e Oelker et al. (2009). A redução da gordura no leite pode ser explicada pela incompleta biohidrogenização dos ácidos graxos de cadeia longa no rúmen, que interfere com a síntese de novo dos mesmos na glândula mamária (BAUMAN; GRIINARI, 2003). Fatores nutricionais como a composição da dieta e o manejo alimentar foram propostos para explicar a redução da gordura com a suplementação do ionóforo (DUFFIELD; BAGG, 2000). No entanto, existem poucos estudos que investigaram essas interações da monensina com fatores nutricionais (DUFFIELD et al., 2003; ALZAHAL et al., 2008).

A suplementação com monensina pode diminuir a degradação ruminal das proteínas e aumentar a retenção de nitrogênio (ALI-HAIMOUND et al. 1995; SCHELLING, 1984), aumentando o fluxo de propionato e a biodisponibilidade de lisina e metionina e outros aminoácidos no intestino delgado. Desta forma, a monensina pode aumentar o teor de proteína do leite (BECKETT et al. 1998).

No entanto, os dados observados na literatura contradizem o possível mecanismo de ação da monensina sobre o aumento do teor de proteína do leite, visto que a grande maioria dos estudos não observou nenhuma alteração (BELL et al., 2006; BENCHAAR et al. 2006; DA SILVA et al., 2008; ERASMUS et al., 2008; OELKER et al., 2009), ou ainda relataram diminuição desta variável, como citaram Hayes et al. (1996); Green et al. (1999); Phipps et al. (2000) e Broderick (2004).

4.3.3.5 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE

Os avanços da pesquisa, especialmente nas técnicas de análise de gordura, permitiram separar a gordura animal em seus componentes menores, os ácidos graxos, e avaliar o efeito individual destes em modelos experimentais. Destes estudos descobriu-se que vários ácidos graxos possuem propriedades benéficas à saúde, como o ácido butírico e os ácidos graxos

insaturados oléico, eicosapentaenóico (EPA), decosahexaenóico (DHA) e os ácidos linoléicos conjugados (CLAs) (LEITE; LANNA, 2009).

A utilização da quitosana e sua relação com o perfil de ácidos graxos do leite não foi estudada até o momento, mas considerando o mecanismo de ação dos ionóforos, pode-se fazer algumas implicações a respeito.

Em experimentos *in vitro*, os ionóforos têm propiciado aumentos na concentração de isômeros trans-C18:1 e redução nas taxas de hidrólise dos ácidos graxos, assim como na velocidade e na extensão da biohidrogenação (FELLNER et al., 1997). Jenkins et al. (2003) observaram, em fermentadores contínuos, que, além de aumentar todos os isômeros trans-C18:1, a combinação monensina e óleo de soja produziu efeitos aditivos em relação a trans-10 C18:1. Griinari et al. (1998) demonstraram que a bio-hidrogenação incompleta esteve associada a alterações no ambiente ruminal, provocadas por dietas com baixo teor de fibra e alto de concentrado, que incidem em aumento proporcional na concentração de trans-10 C18:1, relacionada à redução no teor de gordura do leite.

Da Silva et al. (2007) obteve através da suplementação com monensina em dietas de vacas em lactação aumento da concentração de cis9, trans11-18:2 (CLA) e diminuição da concentração de AG saturados no leite.

4.3.3.6 PARÂMETROS SANGUÍNEOS

De maneira semelhante das variáveis descritas anteriormente, há grande escassez a respeito da utilização da quitosana e suas implicações na fisiologia e metabolismo de ruminantes. 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 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 ureia 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 ureia 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).

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 ureia circulante em vacas em lactação suplementadas com monensina. A redução da degradação proteica ruminal proporcionada pelos ionóforos podem refletir em aumento da proteína metabolizável e elevação na produção hepática de ureia. 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 ureia em até 6%.

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

Segundo Payne e Payne (1987), a glicose é sempre importante componente de escolha no monitoramento do perfil energético em ruminantes. 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 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 em mudança nos padrões de fermentação relacionado 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% na concentração de glicose sanguínea dos animais suplementados com quitosana na dose de 135 mg/kg de peso vivo.

O mesmo efeito sobre a glicose pode ser verificado com a utilização de ionóforos (RAUN et al., 1976), sendo esta característica um dos principais resultados da 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 menor aumento do propionato e menor diminuição do acetato, o que não refletiu no aumento da glicose plasmática.

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.

De forma semelhante 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 como se espera que seja com a quitosana, não interfere diretamente no metabolismo de lipídios, sendo este mais intimamente relacionado à situação fisiológica do animal.

Segundo estudo de Duffield et al. (2008b), o qual avaliou os efeitos da monensina no metabolismo de vacas leiteiras constataram que esta não exerce efeito sob as concentrações de

colesterol total. Corroborando com estes resultados, Da Silva et al. (2007) avaliou a suplementação de monensina em dose de 20 mg/kg MS em vacas no início de lactação e não encontraram nenhum efeito sobre o colesterol total, colesterol-HDL e triglicérides, no entanto observou efeito da monensina sobre a concentração plasmática de colesterol-LDL em relação à ração controle.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 LOCAL, INSTALAÇÕES E ANIMAIS

A fase experimental e coleta de dados do presente estudo foram conduzidas no Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), em Pirassununga, no período de 01 de Março de 2011 a 31 de Julho de 2011.

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.

Neste estudo, foram utilizadas 16 vacas da raça Holandesa, multíparas, pesando em média 610 kg e possuindo respectivamente 60, 81, 102, 123 dias em lactação ao início de cada período experimental em que era iniciado o fornecimento das dietas experimentais.

Os animais foram alojados em estábulo tipo “free-stall”, em baias individuais, sendo ordenhados mecanicamente duas vezes ao dia. Foram selecionados animais que apresentaram características semelhantes entre si, para melhor distribuição nos tratamentos avaliados.

5.2 DELINEAMENTO E DIETAS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 quadrados latinos 4x4, contemporâneos e balanceados. O experimento foi constituído por quatro períodos, com duração de 21 dias cada um, sendo os 14 primeiros de adaptação às dietas e os demais para avaliar as variáveis mensuradas. Os animais foram alimentados com quatro dietas durante o período experimental, formuladas para serem isonitrogenadas e isocalóricas, de forma a atenderem as exigências nutricionais de vacas em lactação com aproximadamente 580 kg de peso corporal, com produção diária de leite de 30,0 kg e com 3,5% de gordura, conforme recomendações do NRC (2001). Foi utilizada dieta na proporção volumoso:concentrado de 50:50.

Foi utilizado o modelo de distribuição em quadrado latino nos quais os animais receberam as seguintes rações experimentais: 1) Controle (Q0), composto 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 dose diária de quitosana de cada grupo experimental foi adicionada ao concentrado, e fornecida na alimentação da manhã e da tarde. As respectivas rações e água foram fornecidos “ad libitum” durante todo período experimental. O volumoso utilizado durante o experimento foi a silagem de milho.

5.3 ANÁLISE DE ALIMENTOS

Diariamente foram feitas pesagens das quantidades dos volumosos e concentrados fornecidos e das sobras de cada tratamento, para estimativa do consumo. Os animais foram arraçoados duas vezes ao dia, às 7:00 e às 14:00 horas, de acordo com o consumo de matéria seca no dia anterior, de forma a ser mantido um percentual de sobras das dietas, diariamente, entre 5 e 10% do fornecido para não haver limitação de consumo.

As duas porções constituintes da ração, concentrado e volumoso, foram misturadas no cocho e fornecidas na forma de dieta completa. Após o preparo da mistura no cocho, as amostras dos alimentos fornecidos foram coletadas e armazenadas a -20°C.

As análises bromatológica e bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Bromatologia e Fisiologia localizado no LPBL / VNP / 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 1, 2 e 3.

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 AOAC (2000)..

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

Ingredientes (%)	Concentrado	Ração
Silagem de Milho	-	50,00
Milho moído	47,58	23,79
Farelo de soja	29,00	14,50
Grão de soja	16,02	8,01
Ureia	0,70	0,35
Sulfato de amônia	0,20	0,10
Bicarbonato de sódio	1,60	0,80
Óxido de magnésio	0,18	0,09
Calcário	0,28	0,14
Mistura Mineral ¹	3,96	1,98
Sal comum	0,48	0,24

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 alimentos da ração

Nutrientes	SM ⁶	FS ⁷	MM ⁸	GS ⁹
Matéria seca (MS) ¹	33,18	89,21	88,98	91,42
Matéria orgânica (MO) ²	93,37	94,17	98,40	94,80
Proteína bruta (PB) ²	5,94	49,87	9,97	37,63
Nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) ³	31,25	4,88	9,53	17,50
Nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) ³	15,83	6,29	10,21	8,61
Extrato etéreo (EE) ²	3,55	2,44	2,34	19,31
Carboidratos não fibrosos (CNF) ²	32,57	29,14	74,56	18,68
Fibra em detergente neutro (FDN) ²	51,31	12,73	11,53	18,12
Fibra em detergente ácido (FDA) ²	36,33	10,68	4,50	13,55
Fibra em detergente ácido indigestível (FDAi) ²	19,85	0,92	0,80	2,78
Lignina ²	6,52	0,62	1,03	2,32
Matéria mineral (MM) ²	6,63	5,83	1,60	5,20
Nutrientes digestíveis totais (NDT) ⁴	62,54	78,21	83,83	99,31
Energia líquida (EL) ⁴	1,41	1,80	1,93	2,34
Energia bruta (EB) ⁵	3878,63	4116,00	3888,50	5003,50

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

³Valores expressos em porcentagem do Nitrogênio Total; ⁴Valores estimados pelas equações do NRC (2001); ⁵Obtido com auxílio de bomba calorimétrica; ⁶SM: silagem de milho; ⁷FS: Farelo de soja; ⁸Milho moído; ⁹GS: Grão de soja

Tabela 3- Composição bromatológica do concentrado e da ração.

Nutriente	Concentrado	Ração
Matéria seca (MS) ¹	90,03	61,61
Matéria orgânica (MO) ²	89,54	91,45
Proteína bruta (PB) ²	27,19	16,57
Nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) ³	8,06	11,95
Nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) ³	8,75	20,00
Extrato etéreo (EE) ²	4,92	4,23
Carboidratos não fibrosos (CNF) ²	45,18	38,87
Fibra em detergente neutro (FDN) ²	12,25	31,78
Fibra em detergente ácido (FDA) ²	8,14	22,23
Fibra em detergente ácido indigestível (FDAi) ²	0,80	10,33
Lignina ²	1,04	3,78
Matéria mineral (MM) ²	10,46	8,55
Nutrientes digestíveis totais (NDT) ⁴	76,51	69,52
Energia líquida (EL) ⁴	1,75	1,58

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

³Valores expressos em porcentagem do Nitrogênio Total; ⁴Valores estimados pelas equações do NRC (2001);

A quitosana utilizada em todo o experimento apresentou as seguintes especificações técnicas: densidade aparente 0,64 g/ml, cinzas totais 2,0% máximo, pH 7,0-9,0, viscosidade <200 cPs e grau de desacetilação 95%. (Polymar Indústria e Cia. Imp. e Exp. LTDA, Brasil).

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

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 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®.

5.4 DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL

Para estimativa da digestibilidade aparente total dos nutrientes e da matéria seca, as amostras de fezes foram coletadas no 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 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.

A excreção total de fezes de cada animal foi estimada 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°C/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.

5.5 FERMENTAÇÃO RUMINAL

Para avaliação dos parâmetros de fermentação ruminal, as amostras de líquido ruminal foram coletadas com a utilização de sonda esofágica três horas após a alimentação da manhã. Logo após a coleta foram determinados os valores de pH ruminal utilizando peagmetro. As amostras foram armazenadas em caixas térmicas e encaminhadas ao Laboratório de Fisiologia e Bromatologia do LPBL / VNP / 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 Gás 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.

5.6 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. As amostras utilizadas para análise de alantoína no leite foram coletadas de dois dias seguidos, sendo provenientes das

duas ordenhas diárias. Uma alíquota de 10 mL de leite foi diluída com 5 mL de ácido tricloroacético a 25%, sendo filtrada em papel-filtro e congelada para posterior determinação dos níveis de ureia e alantoína no leite desproteinizado. Alíquotas de 50 mL de urina (amostra *spot*) foram obtidas de todas as vacas no 16º dia do período experimental, aproximadamente 4 horas após a alimentação, durante micção estimulada por massagem na vulva. 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. Uma amostra de urina pura foi armazenada para determinação dos compostos nitrogenados totais, de ureia e creatinina.

As concentrações de creatinina foram determinadas por meio de kits comerciais (Laborlab®), utilizando reação enzimática calorimétrica cinética em aparelho SBA-200 CELM®. 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*, segundo Oliveira et al. (2001).

A excreção urinária diária de creatinina foi estimada a partir da excreção média diária, estabelecida de 24,05 mg/Kg de peso vivo para vacas leiteiras (CHIZZOTTI, 2004). Dessa forma, com a excreção média diária de creatinina e a concentração de creatinina (mg/dL) na amostra *spot* de urina, foi estimado o volume total diário de urina, em litros por vaca/dia. Os níveis de alantoína na urina e os de ácido úrico na urina e alantoína do leite foram determinados 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 e da quantidade de alantoína excretada no leite, 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).

Foram avaliadas também as purinas absorvidas, considerando-se a excreção endógena de $0,512 \cdot PV^{0,75}$ e a recuperação de 0,70 encontradas por González-Ronquillo et al. (2003). 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.

5.7 BALANÇO DE ENERGIA

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 Havartine 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 (HAVARTINE; ALLEN, 2006).

O consumo de energia líquida (CEL), os valores de energia líquida de produção (ELP), energia líquida de ganho (ELg), e mudança de peso de corpo vazio (MPCV) foram calculados de acordo com as equações do NRC (2001), 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: $EM \text{ (Mcal/Kg)} = [1,01 \times \{(\%CNF/100) \times 4,2 + (\%FDN/100) \times 4,2 + (\%PB/100) \times 5,6 + (\%AG/100) \times 9,4 - 0,3\} - 0,45] + 0,0046 \times (EE - 3,0)$.

Para o cálculo de energia digestível (ED) dos suplementos de gordura com e sem glicerol foram utilizadas as seguintes fórmulas: Com glicerol $ED \text{ (Mcal/dia)} = [9,4 \times DAG \times 0,9 \times (EE/100)] + (4,3 \times 0,1 \times (EE/100))$; Sem glicerol $ED \text{ (Mcal/dia)} = 9,4 \times DAG \times (EE/100)$, onde: DAG = digestibilidade dos ácidos graxos.

Os valores de energia líquida de produção (ELp) foram calculados segundo a fórmula: $ELp \text{ (Mcal/dia)} = \text{produção de leite (Kg)} \times (0,0929 \times G\% + 0,0563 \times PV\% + 0,0395 \times \text{lactose}\%)$ onde: G%=teor de gordura no leite; pv=teor de proteína verdadeira do leite.

A mudança de peso de corpo vazio (MPCV) foi calculada a partir do peso vivo (PV) onde: $PCV = 0,817 \times PV$. A energia líquida de ganho foi calculada através da fórmula: $ELg = 1,42 EM - 0,174 \times EM + 0,0122 \times EM \times 1,65$.

A eficiência de utilização de energia foi calculada de acordo com Harvatine e Allen (2006) da seguinte forma: Eficiência produção de leite = $EL(\text{consumo}) - EL(\text{ganho PV}) - EL(\text{leite})$; Eficiência lactação = $EL(\text{produção de leite} + EL(\text{ganho de PV}) / \text{Consumo de ED}$.

5.8 BALANÇO DE NITROGÊNIO

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 todas as vacas no 16º dia de cada período experimental, quatro horas após a alimentação matinal, durante micção estimulada por massagem na vulva. 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 ureia 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 (mg/dL) = creatinina (mg/dL) * 0,020 * 50 (BIGGS e 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*, segundo Oliveira et al. (2001). A excreção urinária diária de creatinina foi estimada a partir da proposição de 24,05 mg/Kg de peso vivo (PV) (CHIZZOTTI, 2004). 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 vaca/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 e leite foram determinados de acordo com as metodologias descritas por Silva e Queiroz (2002), onde a quantidade em gramas de nitrogênio para cada 100 mL de urina ou leite foi obtido dividindo-se o valor de proteína bruta das amostras pelo fator 6,25 para as amostras de urina e do fator 6,38 para as amostras de leite.

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

5.9 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

As vacas foram ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia, as 6:30 e às 15:30 horas, sendo a produção de leite registrada diariamente durante todo o período experimental. A produção de leite foi corrigida para 3,5% de gordura (PLC) segundo fórmula de Sklan et al. (1992), onde $PLC = (0,432 + 0,1625 * \text{teor de gordura do leite}) * \text{Kg de leite}$.

As amostras utilizadas para análise da composição do leite foram obtidas no 16º de cada período experimental, sendo cada amostra proveniente das duas ordenhas diárias. Foram determinados os teores de gordura, proteína e lactose. Para a determinação da gordura no leite foram utilizadas amostras a fresco, segundo a metodologia descrita por Gerber (COELHO; ROCHA, 1977) no Laboratório de Tecnologia de Produtos de Origem Animal do VNP-FMVZ-USP. Também foram realizadas as análises no leite de nitrogênio total (NT) e lactose utilizando o equipamento LACTOSCAN no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP. Para determinação da ureia e nitrogênio uréico no leite, as amostras de leite foram desproteinizadas da mesma forma que as amostras utilizadas na análise da alantoína. As análises da concentração de ureia no leite desproteinado 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®). A concentração de nitrogênio uréico no leite foi determinada indiretamente por meio da seguinte fórmula: Nitrogênio uréico = ureia (mg/dL)/2,14.

5.10 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE

As amostras de leite utilizadas para avaliar perfil de ácidos graxos foram obtidas no 16º dia de cada período experimental, cada uma das amostras proveniente de duas ordenhas diárias. Para o processo de extração, as amostras foram centrifugadas a 17.800 x g por 30 minutos a 4°C e próximo a 19.300 x g por 20 minutos a 4°C, de acordo com Feng et al. (2004). A gordura separada (300-400 mg) foi metilada e os ésteres metílicos foram formados de acordo com Kramer et al. (1997). Dois padrões internos C18:0 e C19:0 foram utilizados para corrigir as perdas durante o processo de metilação.

A extração da gordura dos alimentos foi realizada de acordo com o método de Folch et al. (1957) e de metilação realizada de acordo com Kramer et al. (1997). Os lipídeos foram extraídos por homogeneização da amostra com uma solução de clorofórmio e metanol 2:1. Em seguida os lipídeos foram isolados após a adição de solução de NaCl a 1,5%.

Os ácidos graxos foram quantificados por cromatografia gasosa (GC Shimatzu 2010, com injeção automática), usando coluna capilar SP-2560 (100m × 0,25mm de diâmetro com 0,02 mm de espessura, Supelco, Bellefonte, PA). A temperatura inicial foi de 70°C por 4 minutos (13°C/minuto) até chegar a 175°C, mantendo por 27 minutos. Depois, um novo aumento de 4 °C/minuto, foi iniciado até 215 °C, mantendo durante 31 minutos. Hidrogênio (H₂) foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 40 cm/s. Durante o processo de identificação foram utilizados quatro padrões: standard C4-C24 de ácidos graxos (Supelco ® TM 37), ácido vacênico C18:1 trans-11 (V038-1G, Sigma®), C18 CLA:2 trans-10, cis-12 (UC-61M 100mg), CLA e C18:2 cis-9, trans-11 (UC-60M 100mg), (NU-CHEK-PREP EUA ®) para identificação dos ácidos graxos que são formados durante a biohidrogenação de ácidos graxos insaturados.

5.11 PARÂMETROS SANGUÍNEOS

As coletas de sangue foram realizadas no 19º dia de cada período experimental por punção da veia e/ou artéria coccígea, anteriormente ao fornecimento das rações no período da manhã. As amostras foram coletadas em tubos com vácuo (vacutainer) de 10 mL para dosagem dos parâmetros sanguíneos glicose, colesterol total, colesterol-HDL, proteínas totais, albumina,

ureia e nitrogênio uréico, as enzimas aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamil transferase (GTA), no soro.

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

As 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®).

5.12 AVALIAÇÃO DO ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E PESO CORPORAL

O escore de condição corporal (ECC) e o peso corporal foram avaliados no sétimo dia de adaptação e no final de cada período experimental, para avaliação da variação de peso. O peso dos animais foi correspondente à média de duas pesagens sucessivas, feitas antes do fornecimento das alimentações e após as ordenhas durante dois dias. Para o cálculo da variação de ECC e de peso corporal, foram considerados os pesos do sétimo dia de adaptação e do final de cada período experimental. As mensurações do ECC foram realizadas segundo metodologia proposta por Edmonson et al. (1989).

5.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram submetidos ao SAS (Version 9.3, SAS Institute, Cary, NC 2010), verificando a normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias pelo PROC UNIVARIATE.

Os dados foram analisados, pelo PROC MIXED de acordo com a seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + Q_i + A_j + P_y + T_k + e_{ijk}$$

onde: Y_{ijk} = variável dependente, μ = media geral, Q_i = efeito de quadrado ($i = 1$ to 4), A_j = efeito de animal ($j = 1$ to 16), P_y = efeito do período ($y = 1$ to 4), T_k = efeito do tratamento ($k = 1$ to 4), e e_{ijk} = erro. Efeito aleatório $A_j(Q_i)$ = interação animal quadrado. Os graus de liberdade calculados foram realizados de acordo com o método satterthwaite ($ddfm = satterth$).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e regressão polinomial pelo comando PROC MIXED do SAS, versão 9.0 (SAS, 2009), adotando-se nível de significância de 5%. As médias foram ajustadas pelo LSMEANS e analisadas pelo teste de Tukey ajustado do PROC MIXED.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CONSUMO MATÉRIA SECA E NUTRIENTES

Os resultados referentes ao consumo matéria seca e nutrientes, de acordo com as dietas experimentais, podem ser observados na (Tabela 4). Não foi observado efeito ($P>0,05$) para o consumo em kg/dia de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo, fibra detergente neutro, carboidratos não fibrosos e nutrientes digestíveis totais. Igualmente, não encontrou-se efeito ($P>0,05$) sobre o consumo em porcentagem de peso vivo de matéria seca e fibra detergente neutro. Também, não encontrou-se efeito ($P>0,05$) para o consumo de energia líquida de lactação.

Tabela 4 – Médias ajustadas e erro padrão da média (EPM) dos consumos de matéria seca e nutrientes em função das dietas experimentais

Variável	Tratamentos ¹				Média	EPM	P ²	
	Q0	Q50	Q100	Q150			L	Q
Consumo (Kg/dia)								
Matéria Seca	24,49	24,82	24,26	24,07	24,41	0,44	0,343	0,545
Matéria Orgânica	22,40	22,71	22,19	21,99	22,32	0,41	0,321	0,516
Proteína Bruta	4,03	4,11	4,03	4,03	4,05	0,07	0,768	0,614
Extrato Etéreo	1,06	1,08	1,05	1,05	1,06	0,02	0,575	0,542
Fibra em Detergente Neutro	7,72	7,78	7,63	7,56	7,67	0,16	0,354	0,655
Carboidrato Não Fibroso	9,81	9,97	9,72	9,62	9,78	0,19	0,260	0,420
Nutrientes Digestíveis Totais	17,04	17,31	16,87	16,71	16,98	0,30	0,285	0,458
Mcal/dia								
Energia Líquida de Lactação	38,80	39,42	38,43	38,05	38,68	0,68	0,281	0,452
Consumo (% PV) ³								
Matéria Seca	3,96	4,01	3,92	3,89	3,95	0,07	0,370	0,560
Fibra em Detergente Neutro	1,26	1,24	1,26	1,23	1,25	0,02	0,417	0,770

¹Tratamentos Q0, Q50, Q100 e Q150 se referem à inclusão de Quitosana na dose de 0, 50, 100 e 150 mg/kg de peso corporal, respectivamente. ²Probabilidades de resposta linear (L) ou quadrática (Q). ³PV: peso vivo.

^{a,b}Médias seguidas por sobrescritos distintos diferem ($P \leq 0.05$) ao teste de Tukey ajustado pelo Proc Mixed.

Partindo do pressuposto de que a quitosana possui características de modulação da fermentação ruminal e potencial efeito em alterar a população microbiana, surgem questionamentos sobre o mecanismo de ação deste aditivo, a respeito de modificações dos processos digestivos e consumo de nutrientes. É evidente a escassez de dados na literatura do

efeito da quitosana sobre o consumo de matéria seca e nutrientes. Goiri et al. (2010) trabalharam com ovinos e investigaram os efeitos da quitosana na fermentação ruminal e cecal, obtendo entre diversos dados, valores de consumo e digestibilidade. Quatro ovelhas secas fistulados no rúmen (62 kg PV) foram alimentados com duas refeições iguais às 08:00 e das 17:00 h diária utilizando feno de alfafa e ração concentrada (50:50, com base na MS), formulado para atender 1,2 vezes suas necessidades energéticas de manutenção. As ovelhas foram alojados em baias individuais "Tie Stall" e distribuídos aleatoriamente em dois tratamentos: Controle (sem aditivo) (CTR), ou quitosana (CHI) (grau deacetilação > 95%, a viscosidade <500 mPa; Trades SA, Barcelona, Espanha). Os animais foram tratados com CHI na dose de 136 mg/kg de PV de CHI por dia, através da cânula ruminal, antes da refeição da manhã, enquanto os animais tratados com CTR não receberam nenhum aditivo. Cada período do estudo, em delineamento crossover, durou 19 dias, consistindo de nove dias para adaptação à dieta (d 1-9), seguido de 10 dias para a mensuração das variáveis (d 10 a 19). Os autores concluíram que a inclusão de quitosana na dieta em ovelhas não alterou o consumo dos animais, justificando com base na avaliação sobre a digestibilidade, a qual o tratamento CHI não exerceu forte efeito, pois apenas houve ligeira queda na digestibilidade aparente total da FDN da ração.

Araújo (2011) investigaram diferentes concentrações de quitosana na dieta de novilhos nelore canulados no rúmen sobre o consumo e digestibilidade aparente total da matéria seca e nutrientes. Foram utilizados 8 novilhos canulados da raça Nelore. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 quadrados latinos 4 x 4 e avaliadas 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. Houve efeito quadrático com maiores valores sobre o consumo de FDN, expressos em kg/dia e porcentagem de peso vivo (PV) para o tratamento Q50 e Q100 ($P < 0,05$), justificando tal evidência através do aumento linear na digestibilidade do FDN ($P < 0,05$), resultando num incremento de 7,01% (Q0 vs. Q150).

Analisando as informações disponíveis na literatura observa-se que as alterações de consumo em vacas são suplementadas com monensina dependem do nível de fornecimento deste ionóforo nas rações. Symanowski et al. (1999) utilizaram monensina na concentração de 0, 8, 16 e 24 mg/kg MS e observaram redução de consumo nos dois últimos níveis avaliados. De forma similar, McClary et al. (2005) avaliaram diferentes doses de monensina (0, 7, 15 e 22 mg/kg MS) para vacas leiteiras e observaram que nos dois últimos níveis de utilização, houve redução de consumo.

A utilização de 15 a 24 mg/kg MS de monensina sódica nas rações de vacas leiteiras no terço médio de lactação parece ser a dose limite de fornecimento a qual pode haver alguma alteração no consumo. Doses acima de 35 mg/kg MS de monensina se relacionam com forte redução de consumo em vacas no terço médio da lactação.

No presente estudo, a inclusão de quitosana nos tratamentos não afetou ($P > 0,05$) o consumo, fazendo-se dessa maneira necessário reavaliar se as doses utilizadas foram satisfatórias ou se requer a utilização de maiores quantidades do aditivo.

6.2 DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL

Os resultados referentes digestibilidade aparente total, de acordo com as dietas experimentais, podem ser observados na (Tabela 5). Houve efeito quadrático ($P < 0,05$) das dietas experimentais sobre a digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica e fibra em detergente neutro. Para as variáveis matéria seca, matéria orgânica e fibra em detergente neutro foi observado maior coeficiente de digestibilidade aparente total quando incluído 50 mg/kg PV de quitosana. Por fim, observou-se também, efeito linear crescente ($P < 0,05$) sobre a digestibilidade da proteína bruta.

Tabela 5 – Médias ajustadas e erro padrão da média (EPM) para os coeficientes de digestibilidade aparentes totais da matéria seca e nutrientes em função das dietas experimentais

Variável	Tratamentos ¹				Média	EPM	P ²	
	Q0	Q50	Q100	Q150			L	Q
	Digestibilidade Aparente total %							
Materia Seca	67,22 ^b	70,91 ^a	69,51 ^{ab}	69,25 ^{ab}	69,22	0,77	0,277	0,045
Matéria Orgânica	67,99 ^b	71,88 ^a	70,61 ^{ab}	70,06 ^{ab}	70,13	0,81	0,250	0,025
Proteína Bruta	78,79 ^b	80,92 ^{ab}	81,29 ^{ab}	81,53 ^a	80,63	0,57	0,010	0,183
Extrato Etéreo	86,90	87,87	87,70	87,36	87,46	0,41	0,689	0,332
Fibra em Detergente Neutro	56,44 ^b	62,13 ^a	60,28 ^{ab}	58,84 ^{ab}	59,42	0,93	0,364	0,010
Carboidrato Não Fibroso	71,20	73,22	71,65	71,98	72,01	1,04	0,904	0,564
NDT observado	67,10	69,92	68,18	68,40	68,40	0,71	0,644	0,219

¹Tratamentos Q0, Q50, Q100 e Q150 se referem à inclusão de Quitosana na dose de 0, 50, 100 e 150 mg/kg de peso corporal, respectivamente; ²Probabilidades de resposta linear (L) ou quadrática (Q); ^{a,b}Médias seguidas por sobrescritos distintos diferem ($P \leq 0,05$) ao teste de Tukey ajustado pelo Proc Mixed.

A inclusão de quitosana na dose de 50 mg/kg PV na dieta resultou melhor digestibilidade ($P < 0,05$) da MS, MO e FDN. 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 digestibilidade da MS (NRC, 1996).

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 variação da digestibilidade de FDN com seu uso pode depender da fonte de fibra utilizada, assim como da composição da dieta (SPEARS, 1990).

Araújo (2011) investigaram diferentes concentrações de quitosana na dieta de novilhos nelore canulados no rúmen sobre a digestibilidade aparente total da matéria seca e nutrientes. Reforçando os resultados obtidos no presente estudo, Araújo (2011) obtiveram resultados similares, onde inclusão de quitosana na dieta proporcionou aumento linear crescente ($P < 0,05$) da digestibilidade da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), FDN e nutrientes digestíveis totais (NDT).

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, os dados do presente estudo não corroboram com os obtidos por Goiri et al. (2009c), sendo que a natureza do substrato fermentável assim como a dose de quitosana pode influenciar esse coeficiente.

Frente ao efeito linear crescente obtido para a variável proteína bruta, o maior coeficiente de digestibilidade foi observado para o tratamento de maior inclusão de quitosana, sendo este, de 150mg/kg PV. Analisando a fermentação ruminal sobre o aspecto de atuação dos ionóforos, sabe-se que esses possuem a característica de afetarem o desenvolvimento de bactérias que promovem proteólise e deaminação de aminoácidos, acarretando em diminuição da degradação proteica nesse compartimento, permitindo, dessa maneira, que ocorra maior biodisponibilidade desses aminoácidos no intestino delgado, possibilitando que ocorra uma maior digestão pós-ruminal.

Fundamentando esta teoria encontra-se resultados como o de Rodrigues et al. (2001), o qual verificou que ao utilizar monensina houve incremento na 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).

Toda a informação em questão leva a conclusão de que a alteração da microbiota ruminal e por conseguinte dos processos digestivos através da inclusão dos vários níveis de quitosana geram incremento aos coeficientes de digestibilidade dos nutrientes da ração.

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.

Para as demais variáveis extrato etéreo (EE), carboidrato não fibroso (CNF) e nutrientes digestivos totais (NDT), não se observou efeito ($P>0,05$) sobre os coeficientes de digestibilidade aparente total.

O potencial efeito da quitosana em modular a fermentação ruminal e modificar a população microbiana no rúmen podem justificar os resultados obtidos no que se refere a digestibilidade dos alimentos.

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.

6.3 FERMENTAÇÃO RUMINAL

Os resultados referentes a fermentação ruminal de acordo com as dietas experimentais, podem ser observados na (tabela 6). Não houve efeito ($P>0,05$) das rações experimentais sobre os valores de pH e N-NH₃ ruminal no tempo de coleta avaliado (Tabela 6). Os valores encontrados foram próximos às médias consideradas normais, de 5,9 a 7,0, para otimização da taxa de digestão ruminal e da degradação da parede celular da fibra, sugeridas por Furlan et al. (2006). Igualmente, não encontrou-se efeito ($P>0,05$) sobre a concentração em mmol/L e em porcentagem das variáveis Ácido acético, propiônico e butírico. A relação acético:propiônico não foi afetada pelas proporções molares de acético e propiônico apresentando-se semelhantes entre as rações experimentais.

Diferentemente dos resultados obtidos no presente experimento, Araújo et al. (2011) investigando diferentes concentrações de quitosana na dieta de novilhos nelore canulados no rúmen encontrando resultados significativos ($P<0,05$) em todos os parâmetros de fermentação avaliados, cujos resultados foram influenciados pelo tempo após alimentação ($P<0,05$). Os principais resultados obtidos por Araújo (2011) foram redução na concentração de N-NH₃ no

tratamento Q150, alteração das proporções molares de AGCC individualmente e crescente incremento nas concentrações e porcentagens molares de propionato (mmol/L) à medida que se elevou as concentrações de quitosana na dieta.

Em consequência, houve diminuição da relação acetato: propionato, principalmente para o tratamento Q150. Os autores justificaram que há 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 realça grande 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).

Tabela 6 – Parâmetros de fermentação ruminal em função das dietas experimentais

Parâmetros	Rações experimentais ¹				Média	EPM	P ²	
	Q0	Q50	Q100	Q150			L	Q
pH	6,85	6,85	6,87	6,78	6,84	0,65	0,612	0,657
N-NH3	15,64	13,22	12,67	15,15	14,17	0,04	0,733	0,068
<i>mmol/L</i>								
Acético	104,82	97,90	91,23	97,86	97,95	2,77	0,249	0,206
Propiônico	31,09	32,28	26,24	30,82	30,11	1,29	0,530	0,488
Butírico	16,04	16,01	14,93	15,29	15,57	0,44	0,433	0,838
(%)								
Acético	69,16	65,90	68,84	68,12	68,01	0,01	0,978	0,425
Propiônico	20,19	23,17	19,91	21,22	21,12	0,01	0,983	0,665
Butírico	10,68	10,88	11,26	10,68	10,88	0,00	0,841	0,330
Rel C2/C3	3,49	3,32	3,50	3,27	3,40	0,08	0,353	0,763

¹Tratamentos Q0, Q50, Q100 e Q150 se referem à inclusão de Quitosana na dose de 0, 50, 100 e 150 mg/kg de peso corporal, respectivamente. ²Probabilidades de resposta linear (L) ou quadrática (Q); ³ Relação Acetato:Propionato; ^{a,b}Médias seguidas por sobrescritos distintos diferem ($P \leq 0.05$) ao teste de Tukey ajustado pelo Proc Mixed.

Ao avaliar os efeitos da monensina, bactérias que produzem ácido láctico, acético, butírico, fórmico e hidrogênio são suscetíveis aos ionóforos, enquanto que as produtoras de ácido succínico e propiônico e aquelas que fermentam lactato apresentam-se resistentes. Dawson e Boling (1983) determinaram o número de bactérias totais e resistentes a monensina no rúmen de bezerros alimentados com dietas com e sem monensina. O número total de bactérias não

diferiu quando a monensina foi adicionada a dieta. No entanto, 63,6% da população nos animais suplementados com monensina foram resistentes a esse composto, comparado com 32,8% nos animais não-suplementados. Como resultado dessa alteração na população microbiana há uma mudança também nos produtos finais da fermentação, em geral com uma menor relação acetato:propionato.

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

De acordo com Sauer et al. (1998), vacas em lactação que nunca haviam sido suplementadas com monensina, tiveram redução na produção de metano de 10% a 21% ao longo de 65 dias de suplementação com monensina. Após 161 dias sem suplementação, os mesmos animais receberam novamente monensina e observou-se pequenos efeitos na produção de metano, de +1% a -11%. Esse mesmo comportamento foi observado na produção de leite, consumo de alimento, gordura do leite, relação dos ácidos graxos voláteis e composição dos ácidos graxos do leite. Os autores relacionam esses resultados a possíveis mudanças adaptativas da microbiota ruminal a monensina ao longo do tempo.

No entanto, no presente trabalho a inclusão de quitosana nos tratamentos não afetou ($P > 0,05$) as variáveis de fermentação ruminal, fazendo-se dessa maneira necessário reavaliar se as doses utilizadas foram satisfatórias ou se requer a utilização de maiores quantidades do aditivo. Entre os principais questionamentos destaca-se a suposição de que a dose utilizada dilui-se no rumem, não atingindo o conteúdo do órgão por completo tornando parcial a atuação do aditivo sobre as bactérias fundamentais a fermentação ruminal. Dessa maneira, sugere-se solucionar tal impasse, combinando menor grau de deacetilação com acréscimo a dose de quitosana utilizada em dietas de vacas leiteiras

6.4 SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA

Os resultados referentes a síntese de proteína microbiana, de acordo com as dietas experimentais, podem ser observados na (Tabela 7). Não houve diferença ($P > 0,05$) nas

excreções diárias em mmol/L e mmol/dia de alantoína na urina e no leite, e ácido úrico na urina e para a produção de urina em L/dia, para as rações experimentais (Tabela 7). De forma semelhante, não houve diferença nas concentrações ($P>0,05$) das purinas totais, derivados de purinas e purinas absorvíveis em mmol/dia, e também não foi observada diferença ($P>0,05$) para a produção de nitrogênio microbiano e proteína bruta microbiana, em g/dia, entre as rações experimentais (Tabela 9). Da mesma maneira não foi observada diferença ($P>0,05$) na eficiência da síntese de proteína microbiana.

Tabela 7 – Médias ajustadas e erro padrão da média (EPM) da síntese de proteína microbiana em função das dietas.

Parâmetros ³	Rações experimentais ¹				Média	EPM	<i>P</i> ²	
	Q0	Q50	Q100	Q150			L	Q
<i>mmol/L</i>								
Al-leite	0,03	0,04	0,04	0,02	0,03	0,01	0,624	0,276
Al-urina	20,74	22,08	19,42	20,76	20,75	0,69	0,574	0,998
Ác-úrico	1,38	1,39	1,29	1,41	1,37	0,08	0,961	0,670
<i>mmol/dia</i>								
Al-leite	1,06	1,31	1,30	1,08	1,18	0,10	0,963	0,227
Al-urina	382,60	392,53	374,78	371,57	380,37	8,18	0,355	0,592
Ác-úrico	25,57	24,56	24,60	25,11	24,96	1,30	0,902	0,757
Pt	409,37	418,37	400,58	397,79	406,53	7,79	0,316	0,613
Alan:Pt	93,30	93,42	93,41	93,26	93,35	0,39	0,971	0,847
Pabs	462,56	472,68	452,14	448,46	458,96	9,21	0,316	0,620
<i>g/dia</i>								
N mic	291,12	297,50	284,57	282,25	288,86	5,80	0,316	0,620
Pb mic	1819,57	1859,35	1778,57	1764,06	1805,39	36,24	0,316	0,620
<i>g Pbmic/Kg NDT</i>								
Eficiência	106,48	107,33	106,82	105,75	106,60	1,44	0,836	0,741
<i>L/dia</i>								
Urina	19,36	18,49	20,36	18,34	19,14	0,56	0,741	0,481

¹Tratamentos Q0, Q50, Q100 e Q150 se referem à inclusão de Quitosana na dose de 0, 50, 100 e 150 mg/kg de peso corporal, respectivamente; ²Probabilidades de resposta linear (L) ou quadrática (Q); ³Alantoína no leite (Al-leite), alantoína na urina (Al-urina), ácido úrico (Ác-úrico), purinas totais (Pt), derivados de purinas (Dp), purinas absorvíveis (Pabs), nitrogênio microbiano (N mic), proteína microbiana (Pb mic); ^{a,b}Médias seguidas por sobrescritos distintos diferem ($P \leq 0,05$) ao teste de Tukey ajustado pelo Proc Mixed.

Os resultados supracitados revelam, portanto, não haver efeito da quitosana sobre a síntese de proteína microbiana ruminal com a utilização da quitosana. 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 - NH_3 , peptídeo e aminoácidos), com o objetivo de atingir a máxima eficiência microbiana.

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.

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-Suíço.

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.

O uso de monensina tem provocado alterações também no metabolismo do N. Em geral, observa-se redução na concentração de amônia ruminal, tanto *in vitro* com *in vivo*. Pesquisas para caracterizar o efeito da monensina no metabolismo do N mostraram que a degradação da proteína, o acúmulo de amônia e o N microbiano foram reduzidos em incubações *in vitro* com monensina (VAN NEVEL; DEMEYER, 1977; WHETSTONE et al., 1981).

Duas espécies de bactérias identificadas pela grande capacidade de produção de amônia ruminal (RUSSELL et al., 1988), apesar de gram-negativas, mostraram-se sensíveis a monensina.

6.5 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

Os resultados referentes produção e composição do leite, de acordo com as dietas experimentais, podem ser observados na (Tabela 8). Não houve diferença ($P > 0,05$) para produção de leite, produção de leite corrigida, gordura e proteína do leite (kg/dia e porcentagem) de acordo com os níveis crescentes de quitosana na dieta (Tabela 8).

Esse resultado indica que possivelmente o aporte de nutrientes para o animal e especialmente para a glândula mamária não foi limitado pelos níveis crescentes de inclusão de

quitosana nas rações experimentais. Também, se faz necessário recordar que não foi observado nenhum incremento na produção.

Gandra et al. (2009) avaliando diferentes níveis de utilização de monensina sódica na ração de vacas em lactação e seus efeitos sobre a produção e composição do leite. Utilizando 12 vacas da raça Holandesa, distribuídas em quatro quadrados latinos 3x3 balanceados obteve ao nível de 24 mg/kg MS, melhor desempenho do que as vacas submetidas à ração controle, produzindo em média mais 0,66 kg/dia ou 2,7% de leite.

Duffield et al. (2008a) concluíram que a adição de monensina na ração de vacas leiteiras tem potencial para aumentar a produção de leite em 0,70 kg/dia, aumentando também a eficiência de produção de leite em 2,5%, dados semelhantes aos obtidos no presente trabalho. Gallardo et al. (2006) também relataram efeito positivo da adição de monensina, aumentando a produção de leite em 4,0% em relação à ração controle (27,7 vs. 26,6 kg/dia, respectivamente). Ramanzin et al. (1997); Zahra et al. (2006) e Martineau et al. (2007) não observaram efeito da adição de monensina sódica nas rações sobre a produção de leite de vacas em lactação.

Os teores de gordura e proteína do leite diminuíram quando a monensina foi suplementada em vacas em lactação nos trabalhos de Phipps et al. (2000) e Ruiz et al. (2001) e Broderick (2004). Em estudos nos quais a monensina reduziu os teores de gordura e proteína do leite paralelamente houve aumento expressivo na produção de leite, sugerindo assim que o efeito de diluição foi em parte responsável pelas mudanças na composição do leite (PHIPPS et al., 2000).

Tabela 8 – Desempenho produtivo de acordo com as dietas experimentais

Variável	Tratamentos ¹				Média	EPM	P ²	
	Q0	Q50	Q100	Q150			L	Q
	<i>kg/dia</i>							
Produção de leite	29,71	29,38	29,46	29,85	29,60	0,51	0,734	0,266
Produção de Leite Corrigida	26,11	26,23	27,00	27,31	26,66	0,55	0,115	0,877
Gordura	0,82	0,83	0,87	0,89	0,85	0,02	0,162	0,907
Proteína	0,90	0,89	0,90	0,94	0,91	0,01	0,275	0,245
	<i>%</i>							
Gordura, %	2,75	2,86	2,98	2,97	2,89	0,08	0,193	0,646
Proteína, %	3,07	3,08	3,06	3,16	3,09	0,02	0,251	0,349
	<i>mg/dL</i>							
Uréia Leite	17,58 ^b	18,42 ^b	18,48 ^{ab}	22,16 ^a	19,16	0,55	0,003	0,150
NUL ³	8,20 ^b	8,59 ^b	8,63 ^b	10,33 ^a	8,94	0,25	0,003	0,153

¹Tratamentos Q0, Q50, Q100 e Q150 se referem à inclusão de Quitosana na dose de 0, 50, 100 e 150 mg/kg de peso corporal, respectivamente. ²Probabilidades de resposta linear (L) ou quadrática (Q). ³Nitrogênio Ureico no Leite ^{a,b}Médias seguidas por sobrescritos distintos diferem ($P \leq 0.05$) ao teste de Tukey ajustado pelo Proc Mixed.

No entanto, foi observado diferença ($P < 0,05$) para o as variáveis ureia e nitrogênio ureico no leite. O aumento das concentrações de quitosana nas dietas aumentou as concentrações sanguíneas de ureia e consequentemente de nitrogênio ureico no dos animais suplementados. Este evento justifica-se ao observar que houve efeito linear crescente ($P < 0,05$) para as variáveis uréia e nitrogênio ureico no soro.

Em decorrência ao intenso metabolismo hepático dos extratos nitrogenados, há o acúmulo de ureia e nitrogênio ureico no soro dos animais do presente estudo. A ureia sanguínea, por seu baixo peso molecular, atravessa o epitélio alveolar da glândula mamária difundindo-se no leite, existindo uma alta correlação entre as concentrações de uréia no sangue e no leite de uma vaca.

A concentração sanguínea de ureia está em relação direta com o aporte proteico da ração, bem como da relação energia: proteína. Valores altos de ureia no sangue dos animais são encontrados em rebanhos que utilizam dietas com excessivo aporte protéico ou com um déficit de energia.

A manutenção dos níveis de uréia é importante para que não ocorram gastos energéticos com sua excreção pela urina e as alterações nos níveis de uréia plasmática podem estar associadas diretamente ao consumo de alimento (MOSCARDINI et al, 1998), fato não evidenciado pelos animais desse experimento.

6.6 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NO LEITE

Os resultados referentes a composição dos ácidos graxos do leite, de acordo com as dietas experimentais, podem ser observados na (Tabela 9). Não foi observado efeito da inclusão de quitosana na dieta dos animais ($P > 0,05$) sobre as concentrações no leite da maioria dos ácidos graxos avaliados. Houve efeito linear crescente para as concentrações dos ácidos graxos, butírico (C4:0), cáprico (C10:0), láurico (C12:0) e efeito linear crescente para as concentrações dos ácido graxo araquídico (C20:0). A inclusão de quitosana causou efeito quadrático ($P < 0,05$) sobre as concentrações dos ácidos palmítico (C16:0) e oléico cis-9 (C18:1).

Os ácidos graxos de 4 a 16 carbonos são provenientes da glândula mamária através da síntese de novo sendo cerca de 45 a 60% do conteúdo total de ácidos graxos da gordura do leite. Através da síntese de novo são sintetizado todos os ácidos graxos de 4 a 14 carbonos e metade dos de 16 carbonos. Os ácidos graxos saturados são responsáveis por aproximadamente 70% do conteúdo total, sendo o mais abundante o C16, sendo seu conteúdo de 30%

aproximadamente. Aproximadamente 25% são mono-insaturados sendo o mais abundante o C18:1 (23,8%). Os poli-insaturados correspondem aproximadamente 2,3%, sendo os mais importantes o C18:2 (1,7%) e C18:3 (0,7%) (CHILLIARD et al., 2007).

Foi observado efeito linear decrescente ($P<0,05$) para as concentrações dos ácidos graxos de cadeia curta ($<C16$), sendo encontradas menores concentrações de AG em dietas que houveram à inclusão de quitosana em relação a dieta controle. Diferentemente, as concentrações de ácidos graxos de cadeia longa ($>C16$) foram maiores ($P<0,05$) para as dietas em que houveram inclusão de quitosana em relação a dieta controle.

Foi observado efeito quadrático ($P<0,05$) das dietas experimentais sobre a concentração total dos ácidos graxos de cadeia com 18 carbonos (C18), onde foi observado maior concentração de AG quando incluído 100 mg/kg PV de quitosana. Igualmente, também foi observado efeito quadrático ($P<0,076$) para o total de AG insaturados (C18 instaurado), o qual verifica-se, numericamente, maior concentração para a dieta com 100 mg/kg PV de quitosana.

A dieta experimental contendo 100 mg/kg PV de quitosana apresentou maior relação de ácidos graxos insaturados:saturados ($P<0,05$) do que as demais. Foi observado efeito quadrático ($P<0,05$) para a relação do total de ácidos graxos insaturados:saturados, de forma que ocorreu maior valor para a inclusão de 100 mg/kg PV de quitosana na ração.

Somado a esta observação, verifica-se também efeito quadrático ($P<0,05$) na concentração total de ácidos graxos insaturados, no qual, ocorreu maior concentração de insaturados também ao nível de 100 mg/kg PV. Diferentemente, observou-se efeito quadrático ($P<0,05$) sobre a concentração total de ácidos graxos saturados, no entanto, houve tendência ($P=0,064$) em diminuir a concentração de ácidos graxos saturados quando incluído 100 mg/kg PV de quitosana na ração. Isso mostra que dietas contendo quitosana alteram a concentração de ácidos graxos totais do leite, aumentando a quantidade de AG insaturados.

Os resultados envolvendo as concentrações dos isômeros C18:1 Oléico cis-9 justificam-se pelo poder modulador da fermentação ruminal que a quitosana apresenta, havendo pequena biohidrogenação ruminal do grão de soja, superando a capacidade de hidrogenação dos microorganismos ruminais, proporcionando assim a biohidrogenação parcial e formação de isômeros que possam ter efeito negativo na porcentagem de gordura no leite, como o CLA trans-10, cis-12, fato este não observado neste estudo. É necessário enfatizar que o grão de soja apresenta significativo poder de proteção contra a biohidrogenação ruminal (BARLETTA et al., 2010) contribuindo para o incremento dos AG insaturados no leite.

Tabela 9 – Médias ajustadas e erro padrão da média (EPM) para o perfil de ácidos graxos (g/100g de AG) da gordura do leite de acordo com as dietas experimentais

Ácido Graxo	Tamanho da Cadeia	Rações Experimentais ¹				Média	EPM	<i>P</i> ²	
		Q0	Q50	Q100	Q150			L	Q
AG g/100g do total AG									
Butírico	C4:0	0,92	1,12	0,70	0,66	0,85	0,07	0,073	0,405
Capróico	C6:0	1,40	1,53	1,41	1,42	1,44	0,05	0,889	0,490
Caprílico	C8:0	1,22	1,20	1,12	1,29	1,21	0,04	0,701	0,226
Cáprico	C10:0	3,15 ^a	3,00 ^{ab}	2,78 ^{ab}	2,56 ^b	2,87	0,07	0,003	0,814
Laúrico	C12:0	3,69 ^a	3,50 ^{ab}	3,19 ^{ab}	3,01 ^b	3,35	0,09	0,005	0,965
Mirístico	C14:0	11,45	11,37	10,48	11,20	11,13	0,13	0,167	0,125
Pentadecílico	C15:0	0,13	0,14	0,18	0,14	0,15	0,01	0,249	0,207
Palmitico	C16:0	32,28	29,91	29,14	31,88	30,80	0,51	0,655	0,012
Palmitoléico	C16:1	0,96	0,89	1,04	0,90	0,95	0,02	0,896	0,455
Heptadecanóico	C17:0	0,28	0,27	0,26	0,28	0,27	0,01	0,894	0,287
Estearico	C18:0	12,31	13,92	14,61	14,02	13,71	0,35	0,076	0,126
Vacênico trans-11	C18:1	0,43	0,47	0,43	0,40	0,43	0,02	0,454	0,404
Oléico cis-9	C18:1	21,28	23,17	24,12	22,45	22,76	0,42	0,215	0,026
Linoléico cis	C18:2	2,94	3,03	3,14	2,95	3,01	0,07	0,836	0,296
Linolênico	C18:3	,	,	,	,		0,02	,	,
Araquídico	C20:0	0,09 ^b	0,12 ^b	0,11 ^{ab}	0,12 ^a	0,11	<0,01	0,019	0,284
Araquidônico	C20:4	,	,	,	,		,	,	,
CLA ³ cis-9, trans-11		0,19	0,21	0,19	0,20	0,20	<0,01	0,862	0,367
C16									
>C16		76,62 ^b	77,22 ^{ab}	79,20 ^a	78,47 ^{ab}	77,88	0,34	0,006	0,257
<C16		23,35 ^a	22,76 ^{ab}	20,77 ^b	21,52 ^{ab}	22,10	0,34	0,007	0,254
Total C18		36,88 ^b	40,68 ^{ab}	42,43 ^a	39,95 ^{ab}	39,98	0,71	0,081	0,026
Sat ⁴ C18:0		12,31	13,92	14,61	14,02	13,71	0,35	0,076	0,126
Ins ⁵ C18:0		24,57	26,75	27,80	25,93	26,26	0,46	0,185	0,021
Ins/sat C18:0		2,11	1,98	1,91	1,89	1,97	0,05	0,086	0,540
Total									
Sat ⁴		68,02	66,73	64,70	67,56	66,75	0,49	0,407	0,026
Ins ⁵		26,37 ^b	28,43 ^{ab}	29,66 ^a	27,66 ^{ab}	28,03	0,47	0,188	0,022
Relação Ins/Sat		0,39 ^b	0,43 ^{ab}	0,46 ^a	0,41 ^{ab}	0,42	0,01	0,246	0,024

¹Tratamentos Q0, Q50, Q100 e Q150 se referem à inclusão de Quitosana na dose de 0, 50, 100 e 150 mg/kg de peso corporal, respectivamente. ²Probabilidades de resposta linear (L) ou quadrática (Q); ³CLA: Ácido linoléico conjugado; ⁴Sat: Saturado; ⁵Ins: Insaturado. ^{a,b}Médias seguidas por sobrescritos distintos diferem ($P \leq 0.05$) ao teste de Tukey ajustado pelo Proc Mixed.

Somado a esta evidência, devemos argumentar que o poder modulador da fermentação ruminal que a quitosana possui pode alterar o metabolismo, dos AG ao nível ruminal. Desta maneira, alterações na população bacteriana presente no rúmen pode também gerar alterações no perfil de AG encontrados no leite. O primeiro passo do metabolismo de lipídeos no rúmen

consiste na lipólise, o qual converte AG esterificados em ácidos graxos livres. A hidrólise é predominantemente realizada pelas bactérias ruminais, sendo geralmente alta (>85%) e podendo ser influenciada por alguns fatores, como o nível de gordura na dieta, pH ruminal e a utilização de ionóforos, que podem inibir a atividade e crescimento de bactérias (DOREAU; CHILLIARD, 1997; HARFOOT; HAZLEWOOD, 1997).

6.7 BALANÇO DE ENERGIA

Os resultados referentes ao balanço de energia, de acordo com as dietas experimentais, podem ser observados na (Tabela 10). 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 produção de energia líquida de lactação (ELL) e energia líquida de ganho (ELG), não sofreram diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$). No entanto, foi observado efeito linear crescente ($P < 0,05$) da mudança de peso corporal vazio (MPCV). 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 na relação energia líquida de produção (ELp) sobre consumo energia digestível (CED) após inclusão do aditivo ($P > 0,05$) na dieta. No entanto, foi observado efeito quadrático ($P < 0,05$) para a eficiência energética sobre a variável energia líquida de lactação (ELL) sobre Consumo de energia digestível (CED).

Esse modelo de cálculo foi escolhido por ser o mais utilizado cálculo de balanço de energia e por eliminar os erros de aumento de ganho de peso vivo que podem superestimar o aumento nas exigências de manutenção (HARVATINE; ALLEN, 2006). O peso metabólico pode ser usado para prever as exigências de energia de manutenção entre animais diferindo no peso vivo, mas não estimar as mudanças nas exigências de energia líquida de manutenção com ganho de peso, pois há variações na composição corporal dos animais estudados (NRC, 2001).

Araújo et al. (2011) investigaram diferentes concentrações de quitosana na dieta de novilhos nelore canulados no rúmen mas não encontrou efeito das concentrações de quitosana utilizadas sobre o balanço de energia dos animais, assim como não foram constatadas diferenças para a eficiência energética com a inclusão do aditivo.

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

Tabela 10 - Médias ajustadas e erro padrão da média (EPM) para o balanço de energia em função das dietas experimentais

Parâmetros	Rações experimentais ¹				Média	EPM	P ²	
	Q0	Q50	Q100	Q150			L	Q
Consumo								
EB ³ (Mcal/dia)	94,59	95,86	93,69	93,00	94,29	1,704	0,344	0,344
ED ⁴ (Mcal/dia)	63,50	67,91	65,08	64,36	65,21	1,371	0,970	0,082
EL ⁵ (Mcal/dia)	38,80	39,42	38,43	38,05	38,68	0,685	0,281	0,452
Produção								
EL _L ⁶ (Mcal/dia)	19,47	19,24	19,33	19,54	19,40	0,330	0,757	0,288
MPCV ⁷ (kg/dia)	-5,57	-3,47	2,63	3,76	-0,66	1,748	0,024	0,881
ELg ⁸ (g)	9,53	10,15	9,32	8,60	9,40	0,510	0,137	0,214
Balanço de energia								
EL	9,80	10,04	9,77	9,92	9,88	0,081	0,776	0,608
Eficiência energética								
EL _P ⁹ /CED	0,46	0,43	0,44	0,44	0,44	0,005	0,170	0,090
EL _L /CED	0,31	0,29	0,30	0,31	0,30	0,006	0,752	0,011

¹Tratamentos Q0, Q50, Q100 e Q150 se referem à inclusão de Quitosana na dose de 0, 50, 100 e 150 mg/kg de peso corporal, respectivamente. ²Probabilidades de resposta linear (L) ou quadrática (Q); ³Consumo de Energia Bruta (CEB); ⁴Consumo de Energia Digestível (CED); ⁵Consumo de Energia Líquida (CEL); ⁶Energia Líquida Lactação (EL_L); ⁷Mudança de peso corporal vazio (MPCV); ⁸Energia Líquida Ganho (EL_G); ⁹Energia Líquida Produção (EL_P); ^{a,b}Médias seguidas por sobrescritos distintos diferem ($P \leq 0.05$) ao teste de Tukey ajustado pelo Proc Mixed.

No entanto com monensina, Gandra et al. (2009) avaliaram diferentes níveis de utilização de monensina sódica na ração de vacas em lactação e seus efeitos sobre o balanço de energia e encontraram efeito linear das rações experimentais para o consumo de energia bruta, digestível, metabolizável e líquida, e para produção de energia líquida de ganho. O autor justifica que estes resultados observados são conseqüências da diminuição do consumo de matéria seca e do aumento da produção de leite em função dos níveis de monensina. Resultados semelhantes foram encontrados por Ramanzin et al. (1997); Eifert et al. (2005) e Duffield et al. (2008a).

6.8 BALANÇO DE NITROGÊNIO

Os valores médios e os coeficientes de variação para os consumos de compostos nitrogenados totais (NT), a excreção de compostos nitrogenados totais nas fezes (N-fecal), na urina (N-urina) e no leite (N-leite), o balanço de nitrogênio (BN) e a eficiência de utilização de nitrogênio obtidas para as rações experimentais são apresentados na (Tabela 11).

Não foi observado efeito ($P>0,05$) para consumo de nitrogênio, excreção de N-Urina e N-Leite (g/dia). Diferentemente, houve efeito linear decrescente ($P<0,05$) para a variável excreção de N-Fecal (g/dia) e para a variável excreção de N-Fecal (% Nitrogênio Total). Houve efeito quadrático ($P<0,05$) das dietas experimentais para a variável excreção de N-Leite (% Nitrogênio Total). No entanto, não houve efeito ($P>0,05$) para excreção de N-Urina (% Nitrogênio Total).

Tabela 11 - Médias ajustadas e erro padrão da média (EPM) para balanço de nitrogênio em função das dietas experimentais

Variável	Rações experimentais ¹				Média	EPM	P ²	
	Q0	Q50	Q100	Q150			L	Q
Consumo (g/dia)								
Nitrogênio Total	645,33	655,07	639,83	638,45	644,67	10,79	0,466	0,612
Excreção (g/dia)								
N-Fecal	137,36	126,37	120,39	120,48	126,15	4,52	0,024	0,305
N-Urinário	283,73	300,28	289,03	290,40	290,86	5,48	0,760	0,241
N-Leite	142,23	141,20	141,59	147,44	143,12	2,21	0,242	0,260
Balanço (g/dia)								
Nitrogênio	82,14	87,55	88,55	79,96	84,55	4,13	0,823	0,211
Excreção (% Nitrogênio Total)								
N-Fecal	21,22	19,14	18,83	18,66	19,46	0,57	0,016	0,189
N-Urinário	43,85	45,90	45,13	45,60	45,12	0,30	0,071	0,152
N-Leite	22,30 ^{ab}	21,68 ^b	22,35 ^{ab}	23,40 ^a	22,43	0,39	0,031	0,042
Balanço (% Nitrogênio Total)								
Nitrogênio	12,64	13,34	13,70	12,27	12,99	0,57	0,846	0,219
g Nitrogênio no Leite/g Nitrogênio Consumido								
Eficiência	0,223 ^{ab}	0,217 ^b	0,224 ^{ab}	0,234 ^a	0,225	0,004	0,031	0,045

¹Tratamentos Q0, Q50, Q100 e Q150 se referem à inclusão de Quitosana na dose de 0, 50, 100 e 150 mg/kg de peso corporal, respectivamente. ²Probabilidades de resposta linear (L) ou quadrática (Q); ^{a,b}Médias seguidas por sobrescritos distintos diferem ($P \leq 0,05$) ao teste de Tukey ajustado pelo Proc Mixed.

Os melhores resultados observados sobre a variável excreção de N-Fecal (g/dia e % de Nitrogênio Total) das rações suplementadas com quitosana é possivelmente devido a melhor utilização do nitrogênio na forma de aminoácidos disponíveis em nível intestinal decorrente das mudanças na fermentação ruminal provocada pelo ionóforo. Esta afirmação solidifica-se ao verificar melhoras significativas na digestibilidade da proteína bruta na Tabela 5.

Analizando os resultados do presente estudo, verifica-se nos animais tratados com quitosana elevadas concentrações de ureia e nitrogênio ureico no soro levando conseqüentemente em incremento na ureia e nitrogênio ureico do leite (Tabelas 8 e 12). Em conseqüência a esses eventos, ocorre maior concentração dessa variável nas amostras de leite dos animais tratados com quitosana.

Os balanços de nitrogênio em g/dia e % NT não apresentaram efeito ($P>0,05$). Ainda, foi demonstrado efeito quadrático ($P<0,05$) das dietas experimentais sobre a eficiência de utilização de nitrogênio.

Analizando os resultados em conjunto, a melhor eficiência de utilização do nitrogênio na ração entre 100 e 150 mg/kg PV de quitosana, sugere que este nível de inclusão seja o ideal para vacas no terço médio de lactação.

A suplementação com quitosana aumenta a digestibilidade da proteína bruta e disponibiliza aminoácidos para absorção no intestino delgado, assim ocorre incremento de aminoácidos para a gliconeogênese ocasionando em melhoria da eficiência de uso de nitrogênio.

Aumento na digestibilidade aparente do nitrogênio e redução na perda de nitrogênio fecal também foram relatados por Ruiz et al. (2001) em estudo no qual forneceram monensina a vacas leiteiras alimentadas com dietas à base de forragem fresca com monensina (350 mg/vaca/dia). Patil e Honmode (1994). No entanto, ao administrarem monensina (0, 11 e 22 mg/kg) a cordeiros da raça Malpura em pastejo suplementados com concentrado, verificaram que a retenção de nitrogênio foi maior nos animais que receberam 22 mg de monensina, seguidos daqueles que receberam 11 e 0 mg.

Plaizier et al. (2000), ao fornecerem monensina em cápsula de liberação controlada a vacas leiteiras, observaram que, após o parto, a monensina aumentou a digestibilidade aparente do nitrogênio e melhorou o balanço de nitrogênio de -77,8 para -44,9 g/dia.

6.9 PARÂMETROS SANGUÍNEOS

Os resultados referentes aos parâmetros sanguíneos, de acordo com as dietas experimentais, podem ser observados na (Tabela 12). Foi observado efeito linear crescente ($P < 0,05$) para as variáveis uréia e nitrogênio ureico no soro. Para as variáveis glicose, colesterol, C-HDL, proteínas totais albumina, AST e GGT, não foi observado diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos.

Duas linhas de raciocínio devem ser levadas em consideração ao analisar os resultados referentes à uréia e nitrogênio ureico no soro. Primeiramente, sabe-se que a concentração de amônia no rúmen é função do equilíbrio entre as taxas de produção e absorção (BRODERICK et al., 1991). A hidrólise das proteínas alimentares, que liberam peptídeos, aminoácidos e amônia, pode ultrapassar a capacidade de assimilação de nitrogênio pelos microrganismos, fator este que gera acúmulo de amônia no líquido ruminal. Sua absorção é feita por difusão passiva através da parede ruminal (NOLAN, 1993) e está intimamente ligada à concentração de sua forma não ionizada no fluido ruminal (potencialmente absorvível), sendo portanto função de sua concentração total e do pH do meio (SIDONS et al., 1985², apud NOLAN, 1993). Essa amônia produzida em níveis normais é absorvida pelo epitélio ruminal, metabolizada no fígado e convertida em ureia, podendo ser reciclada pela saliva e/ou excretada pela urina. A intensidade da hidrólise depende da solubilidade e da característica estrutural da proteína, além do tipo de processamento (físico ou químico) que o alimento é submetido e do nível de consumo do animal, que influencia a velocidade de passagem e, conseqüentemente, o tempo de permanência do alimento no rúmen. Desta maneira, a maior digestão da proteína bruta ultrapassou a capacidade de assimilação de nitrogênio pelos microrganismos ruminais, fator este que levou ao acúmulo de amônia no líquido ruminal. Por difusão passiva através da parede ruminal, a amônia é transportada pelo sistema porta para o fígado, onde é intensamente metabolizada, pois sua forma livre é imensamente tóxica para o animal gerando como produto final a ureia a qual uma parte pode ser excretada por via renal e uma fração volta ao rúmen através da saliva, ou por difusão na parede ruminal reintegrando-se ao ciclo. Devido a este intenso metabolismo há o acúmulo de ureia e nitrogênio ureico no soro dos animais do presente estudo.

No entanto, no presente trabalho, não podemos fundamentar de forma concreta as justificativas dos resultados obtidos apenas sobre a teoria supracitada, visto que, não houve

efeito ($P>0,05$) das rações experimentais sobre os valores de pH e N-NH₃ ruminal no tempo de coleta avaliado (Tabela 6). Num enfoque inicial, a justificativa para esse resultado, fundamenta-se no mecanismo de ação dos ionóforos, pois esses possuem a capacidade de afetar negativamente três espécies de bactérias produtoras de amônia. Russell et al. (1988) e Chen e Russell (1989) acreditam que a monensina reduz a produção ruminal de amônia pela inibição da pequena população de bactérias gram-positivas, fermentadoras obrigatórias de aminoácidos e com alta capacidade de produção de amônia. As estirpes C, SR e F, bactérias com alta atividade de desaminação, foram descobertas e reportadas por Russell et al. (1988) e Chen e Russell (1989). Em 1993, com base no seqüenciamento do RNA ribossômico, elas foram denominadas *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii* e *Clostridium aminophilum*, respectivamente (PASTER et al., 1993). Diante dos resultados obtidos no presente estudo, torna-se difícil afirmar que de fato isto ocorreu, pois avaliamos apenas um ponto isolado da fermentação ruminal ao coletarmos amostras de líquido ruminal uma única vez após três horas do fornecimento da ração. Também não foram efetuadas análises para isolamento e identificação bacteriana, a qual pudéssemos afirmar realmente que houve alteração no perfil bacteriano presente no rumem. Dessa maneira, é importante ressaltar que a quitosana pode não ter efetivado o mesmo efeito encontrado com o uso de monensina, possibilitando que essas populações de bactérias produtoras de amônia permaneçam inalteradas, contribuindo desta forma para o incremento de ureia e nitrogênio ureico no soro dos animais.

Tabela 12 – Parâmetros Sanguíneos de acordo com as dietas experimentais

Variável	Tratamentos ¹				Média	EPM	P ²	
	Q0	Q50	Q100	Q150			L	Q
	mg/dL							
Glicose	63,80	64,04	64,43	60,64	63,23	0,92	0,137	0,141
Colesterol	206,28	208,50	211,86	212,16	209,70	4,40	0,182	0,781
C-HDL ³	82,81	91,87	84,77	85,45	86,23	2,08	0,964	0,314
Uréia Soro	38,59	40,16	41,94	44,35	41,26	1,05	0,011	0,789
NUS	18,03	18,76	19,61	20,73	19,28	0,49	0,011	0,789
	g/L							
Proteínas Totais	5,69	5,72	5,84	5,85	5,78	0,07	0,319	0,937
Albumina	5,69	5,72	5,84	5,85	5,78	0,02	0,319	0,937
	U/L							
AST ⁴	64,39	66,63	64,92	67,26	65,80	1,35	0,327	0,974
GGT ⁵	7,01	6,57	5,97	6,58	6,53	0,19	0,151	0,075

¹Tratamentos Q0, Q50, Q100 e Q150 se referem à inclusão de Quitosana na dose de 0, 50, 100 e 150 mg/kg de peso corporal, respectivamente. ²Probabilidades de resposta linear (L) ou quadrática (Q); ³C-HDL: Colesterol – lipoproteína de alta densidade; ⁴ NUS: Nitrogênio uréico no soro; ⁵AST: aspartato aminotransferase; ⁶ GGT: gama glutamil transferase; ^{a,b}Médias seguidas por sobrescritos distintos diferem ($P \leq 0.05$) ao teste de Tukey ajustado pelo Proc Mixed.

Em decorrência um único ponto de coleta de líquido ruminal, surge uma segunda linha de raciocínio que deve ser colocada em prova. Ao analisar a crescente concentração nos resultados referentes à uréia e nitrogênio ureico no soro, deve-se considerar os efeitos da quitosana sobre a população bacteriana capaz de degradar proteínas e deaminar aminoácidos provenientes da dieta.

Frente ao efeito linear crescente ($P < 0,05$) obtido para a variável proteína bruta (Tabela 5), o maior coeficiente de digestibilidade foi observado para o tratamento de maior inclusão de quitosana, sendo este de 150 mg/kg PV. Analisando a fermentação ruminal sobre o aspecto de atuação dos ionóforos, sabe-se que esses possuem a característica de afetarem o desenvolvimento de bactérias que promovem proteólise e deaminação de aminoácidos, acarretando em diminuição da degradação proteica nesse compartimento, permitindo, dessa maneira que ocorra uma maior biodisponibilidade desses aminoácidos no intestino delgado, possibilitando dessa maneira que ocorra uma maior digestão e absorção desses, no ambiente pós-ruminal. Desta maneira, a disponibilização de uma maior quantidade de extratos nitrogenados no sistema porta gera um incremento no metabolismo hepático, responsável este por elevar os níveis de uréia e nitrogênio ureico plasmático.

Fundamentando esta teoria, encontra-se resultados como o de Rodrigues et al. (2001) o qual verificou que ao utilizar monensina, houve incremento na 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).

De forma semelhante aos resultados deste estudo, Garcia-Rodriguez et al. (2011) observaram 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.

Por outro lado, encontra-se na literatura resultados distintos ao presente estudo cujo há o conhecimento da eficácia do uso de ionóforos no controle das bactérias proteolíticas e deaminadoras de aminoácidos cujo leva a uma redução significativa na produção de amônia, quando utilizado criteriosamente, levando em consideração principalmente dose utilizada, categoria e estado fisiológico do animal e relação volumoso:concentrado. Exemplo desses estudos Plaizier et al. (2000) observaram, em vacas leiteiras, que o fornecimento de monensina em cápsula de liberação controlada promovia queda na concentração de amônia ruminal de 5,4 para 3,2 mg/dL no pré-parto e de 6,0 para 4,9 mg/dL, no pós-parto. O autor relata que houve incremento na síntese de proteína microbiana causada pela adição da monensina cuja aumentou

a proporção de proteína na dieta. Tal justificativa é coerente pois a assimilação de nitrogênio pelos microrganismos ruminais, leva a redução das concentrações amônia ruminal e causando diretamente redução nos níveis plasmáticos dessa.

Mc. Guffey et al. (2001) relataram que a monensina diminui a deaminação de aminoácidos e a produção de amônia ruminal refletindo na também diminuição do nitrogênio ureico plasmático.

Dados de literatura também descrevem redução significativas da amônia ruminal, após a inclusão de monensina, descritas por Yang e Russell (1993); Mbanzamihigo et al. (1996); Hegazy e Elias (1997) e Rogers et al. (1997).

7 CONCLUSÕES

A utilização de quitosana como aditivo modulador da fermentação ruminal na dieta de vacas leiteiras no terço médio de lactação, tendo como volumoso a silagem de milho, não alterou o consumo de alimentos e o desempenho produtivo, no entanto, houve melhora na digestibilidade aparente total da matéria seca e nutrientes, assim como também na eficiência de uso de nitrogênio.

8 IMPLICAÇÕES

Em decorrência dos resultados obtidos no presente estudo, torna-se necessário intensificar as pesquisas com o intuito de viabilizar a utilização da quitosana na nutrição de ruminantes.

No presente estudo, a inclusão de quitosana nos tratamentos não afetou as variáveis de consumo, fazendo-se dessa maneira necessário avaliar qual o melhor nível de inclusão do aditivo na alimentação de vacas leiteiras de média e alta produção. Entre os principais questionamentos, destaca-se a suposição de que a quantidade utilizada possa ser inferior a necessária, pois as doses utilizadas neste estudo fundamentou-se no trabalho de Araújo, et al. (2013 – Manuscript ID: E-2012-5340.R3 - Journal of Animal Science)- utilizaram animais da raça nelore, os quais, possuem menor volume ruminal e taxa de passagem ruminal inferior, características essas que podem ser responsáveis pelas significativas diferenças nos resultados obtidos neste trabalho. As diferenças anatômicas e fisiológicas entre os animais estudados implicam diretamente no tempo de permanência do aditivo dentro do rúmen. Dessa maneira não pode-se afirmar que a quitosana tenha tempo de atuação efetiva sobre toda a digesta contida no compartimento ruminal, como ocorre no trabalho de Araújo, et al (2013).

Por fim, analisando aspectos de fermentação ruminal em conjunto com a síntese de proteína microbiana ruminal, pesquisas devem objetivar técnicas de isolamento e identificação bacteriana respondendo em que magnitude a inclusão da quitosana na dieta causa alteração no perfil bacteriano presente no rúmen ao ponto de causar efetivamente seleção de bactérias gram-negativas implicando, dessa maneira, em menor atividade de bactérias proteolíticas e deaminadoras sobre a digesta ruminal.

REFERÊNCIAS

- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. 17th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington., VA.
- AJUN, W.; YAN, S.; LI, G.; HUILI, L. Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and *in vitro* release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 566–574, 2009.
- AGUDELO, J. H.; LINDEMANN, M. D.; CROMWELL, G. L.; NEWMAN, M. C.; NIMMO, R. D. Virginiamycin improves phosphorus digestibility and utilization by growing-finishing pigs fed a phosphorous deficient, corn soybean diet. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 85, p. 2173-2182, 2007.
- ALI HAIMOUD, D.; VERNAY, M.; BAYOURTHE, C.; MONCOULON, R... Avoparcin and monensin effects on the digestion of nutrients in dairy cows fed a mixed diet. **Canadian Journal of Animal Science** v. 75, p. 379–385.1995
- 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.
- ALZAHAL,O; ODONGO, N. E.; MUTSVANGWA, T.; OR-RASHID, M. M.; DUFFIELD, T. F.; BAGG, R.; P. DICK, P.; G. VESSIE, G., MCBRIDE, B. W. Effects of monensin and dietary soybean oil on milk fat percentage and milk fatty acid profile in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science** v. 91, p. 1166-1174, 2008
- ARAÚJO, A. P. C.; VENTURELLI, B. C., SANTOS, M. C. B., GARDINAL, R. , CALOMENI, G. D., FREITAS, J. E. , BARLETTA, R. V.,GANDRA, J. R. AND RENNO, F. P. Effect of different levels of chitosan in Nellore steers diet. 2013 (Manuscript ID: E-2012-5340.R3 - **Journal of Animal Science** – Artigo Aceito para Publicação).
- ARAÚJO, A. P. C. **Efeito de diferentes concentrações de quitosana na dieta de novilhos Nelore**. [Effect of different levels of chitosan in Nellore steers diet]. 2011. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.
- 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.

AUSTIC, R.E.; SMITH, J.B. Interaction of ionophores with nutrients. In: GEORGIA NUTRITION CONFERENCE, 1980, Athens. **Proceedings...** Athens: The University of Georgia, 1980. GA. 2-10.

BAGG, R.; VESSIE, G. H.; DICK, C. P.; DUFFIELD, T.; WILSON, J. B.; ARAMINI, J. J. Milk residues and performance of lactating dairy cows administered high doses of monensin. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 69, p. 180–185. 2005.

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.

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

BECKETT, S.; LEAN, I.; DYSON, R.; TRANTER, W.; WADE, L. Effects of monensin on the reproduction, health, and milk production of dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.81, p.1563–1573. 1998

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.

BELL, J. A.; GRIINARI, J. M. ; KENNELLY, J. J. Effect of safflower oil, flaxseed oil, monensin, and vitamin E on concentration of conjugated linoleic acid in bovine milk fat. **Journal of Dairy Science** v.89, p.733– 748. 2006

BENCHAAR, C.; PETIT, H. V.; BERTHIAUME, R. Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 4352–4364. 2006

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.

BERTO, D. A. **Levedura seca de destilaria de álcool de cana-de-açúcar (Saccharomyces cerevisiae) na alimentação de leitões em recria**. 1985. 132 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Escola Superior de Agricultura —Luiz de Queiroz- Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1985

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

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. **International 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.

CALLAWAY, T. R.; EDRINGTON, T. S.; RYCHLIK, J. L.; GENOVESE, K. J.; POOLE, T. L.; JUNG, Y. S.; BISCHOFF, K. M.; ANDERSON, R. C.; NISBET, D. J. Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, Wymondham, v. 4, n. 1, p. 43-51, 2003.

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.

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 antimicrobianos promotores del crecimiento como aditivos: efectos sobre la producción animal, situación legal y perspectivas de futuro. **Información Veterinaria**, v. 238, p. 35–45, 2002.

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, G.; RUSSELL, J. B. More monensin-sensitive, ammonia producing bacteria from the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1052-1057, 1989.

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**. Bucksburn, 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-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 1124-1128, 1998.

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

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

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.

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.

COCITO, C. Antibiotics of the virginiamycin family, inhibitors which contain synergistic components. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 43, p. 145-192, 1979.

COE, M. L.; NAGARAJA, T. G.; SUN, Y. D.; WALLACE, N.; TOWNE, E. G.; KEMP, K. E.; HUTCHESON, J. P. Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet and during an induced acidosis, **Journal of Animal Science**, Savoy, v.77, p. 2259-2268, 1999.

COELHO, D. T.; ROCHA, J. A. A. **Práticas de processamento de produtos animais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1977. 79 p.

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.

CROOY, P.; DeNEY, R. J. Virginiamycin: nomenclature. Crooy. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 25, p. 371, 1972.

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

DANMAP. **Danish veterinary and food administration**. 1999, 2000, 2001, 2002. Disponível em: <www.vetinst.dk>. Acesso em: 24 mar. 2008.

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**, Champaign, v. 52, n. 2, p. 418-26, 1981.

DeSOMER, P.; VAN DIJCK, P. A preliminary report on antibiotic number 899, a streptogramin-like substance. **Antibiotics and Chemotherapy**, Washington, v. 5, p. 11, 1955.

DiGIAMBATTISTA, M.; CHINALI, G.; COCITO, C. The molecular basis of the inhibitory activities of type A and type B synergimycins and related antibiotics on ribosomes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 24, p. 485–507, 1989.

DONOHU, A. L. Biochemical studies on the fate of monensin in animals and in the environment. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 58, p. 1528-1539, 1984.

DUBUC, J.; DUTREMBLAY, D.; BRODEUR, M.; DUFFIELD, T.; BAGG, R.; BARIL, J.; DESCÔTEAUX, L. A randomized herd-level field study of dietary interactions with monensin on milk fat percentage in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 777–781. 2000

DUFFIELD, T. F.; BAGG, R. N. Use of ionophores in lactating dairy cattle: a review. **Canadian Veterinary Journal**, v. 41, p. 388–394. 2000

DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; SANDALS, D. Effect of a monensin controlled release capsule on cow health and reproductive performance. **Journal of Dairy Science** v. 82, p. 2377-2388. 1999

DUFFIELD, T.; BAGG, R.; KELTON, D.; DICK, P.; WILSON, J. A field study of dietary interactions with monensin on milk fat percentage in lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 4161–4166. 2003

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

DUFFIELD, T. F.; RABIEE, A. R.; LEAN, I. J. A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part1. Metabolic effects. **Journal of Dairy Science**. v. 91, p. 1334–1346. 2008b

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.

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

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

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

ERASMUS, L. J.; COERTZEL, R. F.; LEVITON, M. N.; CHEVAUX, E. A meta-analysis of the effect of monensin or live yeast or a combination thereof on performance of beef cattle. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 87, 2009. Supplement, 2. Abstract T220.

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.

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.

FELLNER, V.; SAUER, F. D.; KRAMER, J. K. G. Effect of nigericin, monensin, and tetronasin on biohydrogenation in continuous flow-through ruminal fermenters. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 921-928, 1997.

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

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal Biology Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497–509, 1957.

FUJIHARA, T.; ØRSKOV, E. R.; REEDS, P. J. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. **Journal of Agricultural Science**, v. 109, n. 1, p. 7-12, 1987

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

GANDRA, J. R. **Avaliação do uso de monensina sódica em rações de vacas leiteiras: desempenho produtivo e resíduos no leite.** 2009. 93 f. Dissertação (Mestrado em

Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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.

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.

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

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

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.

GOES, R. H. T. B.; ALVES, D. D.; VALADARES FILHO, S. C.; MARSON, É. P. Utilização de aditivos alimentares microbianos na alimentação de bovinos de corte e leite: Revisão. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoológicas**, v. 8, n. 1, p. 47- 56, 2005.

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.

GREEN, B. L.; McBRIDE, B. W.; SANDALS, D. The impact of a monensin controlled-release capsule on sub clinical ketosis in the transition dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 323-333. 1999

GRINARI, J. M.; DWYER, D. A.; MCGUIRE, M. A. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p.1251-1261, 1998.

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.

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.

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

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.

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.

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

IVES, S. E.; TITGEMEYER, E. C.; NAGARAJA, T. G.; DelBARRIO, A.; BINDEL, D. J.; HOLLIS, L. C. Effects of virginiamycin and monensin plus tylosin on ruminal protein metabolism in steers fed corn-based finishing diets with or without wet corn gluten feed. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 80, p. 3005-3015, 2002

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

JENKINS, T. C.; BRIDGES JR, W. C. Protection of fatty acids against ruminal biohydrogenation in cattle. **European Journal of Lipids Science Technologie**, v. 109, p. 778-789, 2007.

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.

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.

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.

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 chitosanolytic with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. **The Biochemical Journal**, v. 391, p. 167–175, 2005.

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.

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.

LEITE, L. C.; LANNA, D. P. D. Avanços no estudo do metabolismo de lipídeos: Perfil da gordura depositada na carne ou secretada no leite de ruminantes. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL AVANÇOS EM TÉCNICAS DE PESQUISA EM NUTRIÇÃO DE RUMINANTES, Pirassununga v. 1, p. 147-164, 2009.

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 Compatible 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.

LOYOLA, V. R.; PAULE, B. J. A. Utilização de aditivos em rações de bovinos: aspectos regulatórios e de segurança alimentar. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 8., 2006, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2006. 373 p.

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.

MACKINTOSH, E. D.; PHIPPS, R. H.; SUTTON, J. D. The effects of monensin and diet composition on methane production using the *in vitro* semicontinuous rumen simulation technique (Rusitec). **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 208, 1997.

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.

MATOS, B.C. Uso de aditivos na pecuária leiteira: revisão. **PUBVET**, Londrina, v. 2, n. 9, 2008. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/artigos_det.asp?artigo=320>. Acesso em: 03 ago. 2011.

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.

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.

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

MILLEN, D. D.; PACHECO, R. D. L.; ARRIGONI, M. D. B. A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 87, p. 3427-3439, 2009.

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.; 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.

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.

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

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

- 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.
- 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.
- NAGARAJA, T. G.; TAYLOR, M. B. Susceptibility and resistance of ruminal bacteria to antimicrobial feed additives. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, p. 1620, 1987.
- NETO, J. P. Aspectos de farmacocinética e de toxicologia; possíveis impactos na qualidade da proteína de origem animal. O uso adequado de antimicrobianos como aditivos na alimentação animal. In: SIMPÓSIO DE RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS, 2003, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 2003. p. 23-27.
- 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.; 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- OBA, M.; ALLEN, M. S. Dose-response effects of intraruminal infusion of propionate on feeding behavior of lactating cows in early or midlactation. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2922–2931. 2003
- OELKER, E.R.; REVENEAU, C.; FIRKINS, J. L. Interaction of molasses and monensin in alfalfa hay or corn silage-based diets on rumen fermentation, total tract digestibility,

and milk production by Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 270–285, 2009

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.

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

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.

OSBORN, B. S. **Effects of live cultures of Lactobacillus acidophilus on performance and carcass characteristics on finishing beef steers**. 2004. 57 p. Tese (Mestrado em Ciências) Texas Tech University, Lubbock, Texas, 57p. 2004.

OVCHINNIKOV, J. A. Physico chemical basis of ion transport through biological membranes: Ionophores and ion channels. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 94, p. 321-336, 1979.

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.

PAGE, S. W. Mode of action. In: PAGE, S.W. (Ed.). **The role of enteric antibiotics in livestock production**. Canberra: Avcare, 2003. p.1-2, 2-14.

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

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

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

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.

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

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

PRESSMAN, B. C. Biological applications of ionophores. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 45, p. 501-530, 1976.

PRESTON, R. L. Management of high concentrate diets in feedlot. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO INTENSIVA DE GADO DE CORTE, 1998. Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 1998. p.82-91.

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.

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.

REIS, R. A.; MORAIS, J. A. S.; SIQUEIRA, G. R. Aditivos alternativos para a alimentação de Ruminantes. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 2., São Paulo. **Anais...** São Paulo: CBNA, 2006. p. 1-40.

RENNÓ, L. N.; VALADARES, R. F. D.; LEÃO, M. I.; VALADARES FILHO, S. C.; SILVA, J. F. C.; CECON, P. R.; DIAS, H. L. C.; 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.

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

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.

ROGERS, J. A.; BRANINE, M. E.; MILLER, C. R.; WRAY, M. I.; BARTLE, S. J.; PRESTON, R. L.; GILL, D. R.; PRITCHARD, R. H.; STILBORN, R. P.; BECHTOL, D. T. Effects of dietary virginiamycin on performance and liver abscess incidence in feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 73, p. 9-2, 1995.

ROMANAZZI, G.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A. Short hypobaric treatments potentiate the effect of chitosan in reducing storage decay of sweet cherries. **Postharvest 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. 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. A proposed model of monensin action in inhibiting ruminal bacteria growth: effects on ion flux and proton motive force. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 64, p. 1519-1525, 1987.

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

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.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n.1, p. 1-16, 2006.

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.

SANTOS, M. C. B. **Desempenho produtivo e resíduos no leite de vacas suplementadas com monensina sódica nas rações**. [Productive performance and milk residues in dairy cows supplemented of sodic monensin in the rations]. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

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

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

SAUER, F. D.; FELLNER, V.; KINSMAN, R. Methane output and lactation response in Holstein cattle with monensin or unsaturated fat added to the diet. **Journal Animal Science**, v.76, p.906-914. 1998.

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

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

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

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

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.

SKLAN, D.; ASHKENAZI, R.; BRUN, A.; Devorin, A.; Tabori, K. Fatty acids, calcium soaps of fatty acids, and cottonseeds fed to high yielding cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2463-2472, 1992

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.

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

SPISSO, B. F. **Inocuidade de alimentos de origem animal: determinação de resíduos de ionóforos poliéteres, macrolídeos e lincosamidas em ovos e de tetraciclina em leite por clae-em/em.** 2010. 132 p. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

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.

STEWART, L. L.; KIM, B. G.; GRAMM, B. R.; NIMMO, R. D.; STEIN, H. H. Effect of the virginiamycin on the apparent ileal digestibility of amino acids by growing pigs. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 88, p. 1718-1724, 2010.

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.; SUZUKI, 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. Potential environmental benefits of ionophores in ruminants diets. **Journal of Environmental Quality**, v. 32, p. 1591-1602, 2003.

THANOU, 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.

TSAL, 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 alfalfa 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.

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.

VANDERHAEGHE, H.; PARMENTIER, G. The structure of factor S of staphylomycin. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 82, p. 4414, 1960.

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

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

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.

WITTEWER, F.; REYES, J. M.; OPTIZ, H. Determinación de urea en muestras de leche de rebaños bovinos para el diagnóstico de desbalance nutricional. **Archive. Medicine Vet.** 25, p. 165-172, 1993

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 derivate 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, 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.

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

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.