TIAGO ANTONIO DEL VALLE

**Quitosana associada a fonte de lipídeos na alimentação de vacas em
lactação**

Pirassununga, SP

2014

TIAGO ANTONIO DEL VALLE

Quitosana associada a fonte de lipídeos na alimentação de vacas em lactação

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

De acordo: _____

Orientador

Pirassununga

2014

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

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2936
FMVZ

Del Valle, Tiago Antonio
Quitosana associada a fonte de lipídeos na alimentação de vacas em lactação / Tiago Antonio Del
Valle. -- 2014.
69 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Palma Rennó.

1. Aditivo. 2. Digestibilidade. 3. Eficiência. 4. Leite. 5. Rúmen. 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 "Avaliação de quitosana associada a fonte de gordura na alimentação de vacas em lactação", protocolado sob o nº 3057/2013, utilizando 24 (vinte e quatro) vacas, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, foi aprovado em reunião de 26/6/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Chitosan associated with fat source in dairy cows diets", protocol number 3057/2013, utilizing 24 (twenty four) cows, under the responsibility Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, was approved in the meeting of day 6/26/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 27 de junho de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: DEL VALLE, Tiago Antonio

Título: **Quitosana associada a fonte de lipídeos na alimentação de vacas em lactação**

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: 14 / 03 / 2014

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTO

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus que me deu condições para que eu pudesse realizar este trabalho.

À minha família, que sempre me apoiou em todas as minhas decisões. Meus pais Celina e João Carlos que sempre foram a minha sustentação. Às minhas irmãs Carla e Aline pelo companheirismo. Ao Eder e à Isabela, pelo apoio.

Ao Prof. Francisco Palma Rennó, que acreditou no meu trabalho e em mim, antes mesmo que eu acreditasse nele, além de todo o apoio intelectual, financeiro e motivacional, me proporcionou um grande avanço como pessoa.

Aos colegas de pós-graduação Élmeson Ferreira de Jesus, Pablo de Paiva, Gustavo Almeida, Jefferson Gandra, Rafael Barletta, Vitor Bettero, Emiliana Santana Batista, Taíssa Canaes, Filipe Zanferari e José Esler de Freitas Júnior, que foram grandes companheiros e incentivadores, além de sempre me ajudarem nas decisões mais difíceis.

Aos alunos de iniciação científica Artur Gabriel Vilas Boas Costa, Guilherme Cabral e Fernanda dos Santos, sem os quais este trabalho não teria sido realizado.

Aos demais colegas de pós-graduação Cybele Araújo, Rodrigo Gardinal, Gustavo Calomeni, Cristian Martins, Thiago da Silva, Lenita Camargo, Thiago Vendramini e Caio Takyia pelo companheirismo.

Aos funcionários do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite, meus grandes amigos, Diogo Martinelli, Lucas Santos, Paulo da Silva, Felipe e Carlos Schimith.

Aos estagiários e alunos de iniciação científica que sempre me acompanharam durante toda a minha estadia no LPBL e que com certeza, fizeram de mim uma pessoa melhor, além de terem colaborado bastante neste trabalho: Vitor Galvão, Andres Vargas Moñoz, Marjorye Kametani, Carlos Consentini, Humberto Diniz, Gabriel Rodriguez, Karla de Oliveira (Pink), Tayla (Coisa), Izabelle Jardim, Jéssica Bertoni, Mariana Rentas, Jesus Cardoso, Tiago Ronimar, Bruna Gomes, Brenda Alcântara, Julia Ribas e Barbara Bertizola, Jovani Lopes, Elton Araújo, Natasha Crippa, Juliana Rosa e aos demais estagiários das turmas 77 e 78 da FMVZ-USP.

Ao Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite por fornecer todas as condições estruturais e financeiras para a realização deste projeto.

Ao Departamento de Nutrição e Produção Animal e ao Programa de Pós-graduação em Nutrição e Produção Animal, pelas oportunidades, conhecimento compartilhado e amizades cultivadas.

À FAPESP e ao CAPES pelo apoio financeiro.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e à Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realizar este sonho.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais (João Carlos e Celina) e ao Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL), que permitiram minha vida e por terem acreditado no meu potencial.

A eles dedico este trabalho como forma de gratidão por tudo o que fizeram em minha vida.

RESUMO

DEL VALLE, T. A. **Quitosana associada a fonte de lipídeos na alimentação de vacas em lactação.** [Chitosan associated to fat source in the diet of lactating cows]. 2014. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

Objetivou-se avaliar os efeitos da inclusão de quitosana e óleo de soja nas dietas de vacas leiteiras no terço médio da 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 e os balanços de energia e de nitrogênio. Foram utilizadas 24 vacas da raça Holandesa, sendo quatro canuladas no rúmen e 20 não canuladas, com $581,2 \pm 73,6$ kg de PC, DEL médio de $174,7 \pm 53,1$ e produção de leite inicial de $36,14 \pm 5,32$ kg de leite por dia, que foram distribuídas em seis Quadrados Latinos balanceados e contemporâneos, para receber uma das quatro dietas experimentais, obtidas pela combinação dos fatores quitosana (aproximadamente 150 mg/kg de peso corporal) e óleo de soja (3,3% da MS da dieta): C controle; Q quitosana; O óleo de soja e QO quitosana associada ao óleo de soja. Foi observada interação entre os fatores avaliados para o consumo de MS, MO, PB, FDN, CNF e NDT. O consumo foi reduzido pela inclusão de quitosana nas dietas sem óleo, enquanto que, na presença deste, a quitosana não influenciou o consumo. A inclusão de óleo de soja reduziu o consumo de MS, MO, PB, FDN, CNF e NDT e aumentou o consumo de EE, independentemente da inclusão de quitosana na dieta. A inclusão de quitosana aumentou os coeficientes de digestibilidade (CD) da MS, MO e PB e não alterou o CDFDN. O CDEE foi alterado positivamente pela inclusão de óleo de soja na dieta. Tanto a inclusão de quitosana quanto a de óleo de soja aumentaram o colesterol total sérico. Na ureia plasmática foi observada interação, onde a concentração maior foi observada na dieta Q em relação a C, não diferindo entre as dietas contendo óleo de soja (O e QO). As concentrações de AST foram influenciadas positivamente pela suplementação de óleo de soja nas dietas. Observou-se interação para eficiência de utilização da energia e do nitrogênio, onde observou-se aumento pela inclusão quitosana nas dietas sem óleo de soja e reduziram quando da inclusão em dietas contendo óleo. As inclusões de quitosana e de óleo de soja não influenciaram a síntese de proteína microbiana ruminal. A inclusão de óleo de soja aumentou a concentração de propionato e reduziu acetato e consequentemente a relação C2:C3, no rúmen. A produção de leite

não foi influenciada pela inclusão de quitosana na dietas sem óleo de soja e foi reduzida quando esta foi realizada em dietas contendo óleo de soja. A eficiência de conversão da MS consumida em leite foi reduzida nas dietas contendo óleo e aumentada nas dietas sem óleo de soja, pela inclusão de quitosana. Assim, considerando principalmente o desempenho produtivo dos animais, a inclusão de quitosana nas dietas de vacas leiteiras no terço médio de lactação é viável, desde que esta não esteja associada a suplementação com fontes de lipídeos.

Palavras-chave: Aditivo. Digestibilidade. Eficiência. Leite. Rúmen.

ABSTRACT

DEL VALLE, T. A. **Chitosan associated to fat source in the diet of lactating cows.** [Quitosana associada a fonte de lipídeos na alimentação de vacas em lactação]. 2014. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

The aim of this study was to evaluate the effects of addition of chitosan in the diets of dairy cows in lactation, containing or not soybean oil, over intake, and total apparent digestibility of dry matter and nutrients, ruminal fermentation and microbial protein synthesis, milk yield and composition, concentrations of blood parameters and energy and nitrogen balances. 24 Holstein cows were used, four rumen cannulated and 20 non-cannulated with 581.2 ± 73.6 kg of BW, DIM average of 174.7 ± 53.1 and $36,14 \pm 5,32$ kg per day of initial milk yield which were distributed in six Latin squares balanced and contemporary to receive one of four diets, that were obtained by a combination of factors chitosan (approximately 150 mg / kg body weight) and soybean oil (3.3% of diet DM): control (C), chitosan (Q), soybean oil (O) and chitosan associated with soybean oil (QO). Diets The consumption was reduced by the addition of chitosan in the diets without oil, whereas the presence of this, the chitosan does not affect the intake. The addition of soybean oil reduced the intake of DM, OM, CP, NDF, NFC and TDN and increased consumption of EE, regardless of the addition of chitosan in the diet. The addition of chitosan increased the digestibility coefficients (DC) of DM, OM and CP and did not alter the NDFDC. The EEDC was changed positively by addition of soybean oil in the diet. Both the addition of chitosan as soybean oil increased the total serum cholesterol. In plasma urea interaction, where the highest concentration was observed in the diet Q over C, did not differ between diets containing soybean oil (O and QO) was observed. AST concentrations were affected by supplementation of soybean oil in the diets. Observed interaction for efficient use of energy and nitrogen, which showed increase by adding chitosan in diets without soybean oil and reduced upon addition in diets containing oil. The experimental diets did not affect the synthesis of rumen microbial protein. The addition of soybean oil increased the concentration of propionate and acetate and thus reduced the ratio C2:C3 rumen. Milk production was not affected by the addition of chitosan in the diets without soybean oil, and was reduced on diets containing soybean oil. The conversion efficiency of DM intake in milk was reduced in diets containing oil and increased in diets without soybean oil,

adding the chitosan. Thus, considering mainly the productive performance of the animals, the addition of chitosan in the diets of dairy cows in mid lactating is feasible, provided that this is not associated with supplementation with lipid sources.

Keywords: Additive. Digestibility. Efficiency. Milk. Rumen.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição das dietas experimentais, contendo quitosana e/ou soja de soja, fornecidas a vacas da raça Holandesa no médio de lactação.	32
Tabela 2 -	Composição bromatológica dos alimentos utilizados nas dietas experimentais	33
Tabela 3 -	Composição químico bromatológica das dietas experimentais, contendo quitosana e/ou soja de soja, fornecidas à vacas da raça Holandesa no médio de lactação.	33
Tabela 4 -	Consumo e digestibilidade da matéria seca e de nutrientes de vacas da raça Holandesa, no terço médio de lactação, alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja.....	42
Tabela 5 -	Variáveis sanguíneas de vacas da raça Holandesa no terço médio de lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja	47
Tabela 6 -	Balanço de energia de vacas da raça Holandesa, no terço médio de lactação, alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja	49
Tabela 7 -	Balanço de Nitrogênio de vacas da raça Holandesa, no terço médio de lactação, alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja	51
Tabela 8 -	Síntese de proteína microbiana de vacas da raça Holandesa, no terço médio de lactação, alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja.....	53
Tabela 9 -	Fermentação ruminal de vacas da raça Holandesa, no terço médio de lactação, alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja	55
Tabela 10 -	Produção e composição do leite de vacas da raça Holandesa, no terço médio de lactação, alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeitos da inclusão de quitosana e de óleo de soja nas dietas de vacas da raça Holandesa, no terço médio de lactação sobre a variável consumo de matéria seca.....	43
Figura 2 - Efeitos da inclusão de quitosana e de óleo de soja nas dietas de vacas da raça Holandesa, no terço médio de lactação sobre a concentração plasmática de ureia	48
Figura 3 - Efeitos da inclusão de quitosana e de óleo de soja nas dietas de vacas da raça Holandesa, no terço médio de lactação sobre eficiência de uso da energia, obtida pela relação entre EL_L e CED	50
Figura 4 - Efeitos da inclusão de quitosana e de óleo de soja nas dietas de vacas da raça Holandesa, no terço médio de lactação sobre a secreção de nitrogênio no leite em relação ao nitrogênio total consumido.....	52
Figura 5 - Concentrações ruminais de acetato em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas da raça Holandesa, alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja	56
Figura 6 - Concentrações ruminais de propionato em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas da raça Holandesa, alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja	56
Figura 7 - Concentrações ruminais de butirato em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas da raça Holandesa, alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja	57
Figura 8 - Concentrações ruminais de ácidos graxos de cadeia curta em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas da raça Holandesa, alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja	57
Figura 9 - pH ruminal em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas da raça Holandesa, alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja	58
Figura 10 - Concentrações ruminais de $N-NH_3$ em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas da raça Holandesa, alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja	58
Figura 11 - Efeitos da inclusão de quitosana e de óleo de soja nas dietas de vacas da raça Holandesa, no terço médio de lactação sobre a produção de leite	61

Figura 12 - Efeitos da inclusão de quitosana e de óleo de soja nas dietas de vacas da raça Holandesa, no terço médio de lactação sobre a eficiência produtiva, obtida pela razão entre a produção de leite e o consumo de matéria seca....62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	HIPÓTESE E OBJETIVOS	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	19
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	LOCAL E ANIMAIS	30
4.2	DELINEAMENTO E DIETAS EXPERIMENTAIS	30
4.3	CONSUMO DE MATÉRIA SECA E NUTRIENTES	31
4.4	DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL	34
4.5	PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE	35
4.6	FERMENTAÇÃO RUMINAL	35
4.7	SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA	37
4.8	BALANÇO DE ENERGIA	38
4.9	BALANÇO DE NITROGÊNIO	39
4.10	PARÂMETROS SANGUÍNEOS	40
4.11	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	CONSUMO E DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL	42
5.2	PARÂMETROS SANGUÍNEOS	46
5.3	BALANÇO DE ENERGIA	49
5.4	BALANÇO DE NITROGÊNIO	51
5.5	SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA	52
5.6	FERMENTAÇÃO RUMINAL	54
5.7	PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE	59
6	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

Os processos produtivos nas diferentes áreas de atuação humana têm sido repensados, considerando conceitos de sustentabilidade. Estudar os efeitos ambientais, sociais e econômicos da adoção de novas tecnologias têm sido o foco do desenvolvimento, almejando processos mais sustentáveis.

Na produção animal não é diferente. Diversas tecnologias têm sido desenvolvidas ao longo dos últimos anos com o objetivo de aumentar a produtividade animal. Para isso, buscou-se o melhoramento genético, o aprimoramento das técnicas de manejo e o desenvolvimento de diferentes estratégias nutricionais para atender as exigências de animais cada vez mais produtivos.

Na bovinocultura, diferentemente da avicultura e da suinocultura, pouco ainda tem sido feito com o objetivo de melhorar a eficiência de aproveitamento dos alimentos por meio do melhoramento genético. A capacidade dos animais de converter alimentos de baixo valor nutricional em alimentos de alta qualidade, com eficiência, tem sido um dos objetivos da nutrição de ruminantes.

Uma das estratégias mais utilizadas é a inclusão de aditivos na dieta com o intuito de modular a fermentação ruminal e otimizar o processo digestivo. Os aditivos mais utilizados atualmente, no entanto, são em sua maioria, substâncias com atividade antimicrobiana, destacando-se os antimicrobianos ionóforos.

Na pecuária moderna, a sustentabilidade social e ambiental pode ser comprometida pelo uso indiscriminado de antimicrobianos na alimentação animal. Esta tendência tem sido confirmada pelas alterações da legislação da União Européia (UE) com relação ao uso destas substâncias. Considerando o princípio da precaução, em 2006, a UE banuiu o uso de promotores de crescimento na alimentação animal. Com a influência dos países europeus sobre os principais mercados consumidores de produtos de origem animal, é claro que estas decisões tendem a ser cada vez mais frequentes, haja vista a proibição do uso de substâncias com atividade anabolizante hormonal em bovinos, no Brasil, pela Instrução Normativa nº 55, de 2011.

Desenvolver opções naturais que promovam efeitos similares aos aditivos utilizados e estabelecer as particularidades de utilização é um dos objetivos atuais da pesquisa em nutrição animal e ao que este trabalho também se propõe.

Diversos aditivos têm sido utilizados com este propósito, como os óleos essenciais, taninos e as leveduras. Goiri et al. (2009a) propôs a utilização de quitosana como modulador da fermentação ruminal e do processo digestivo. A quitosana é um biopolímero atóxico e biodegradável que tem ganhado diversas aplicações na medicina e na conservação de alimentos, principalmente pelas suas atividades antimicrobianas. Obtida pela desacetilação da quitina, biopolímero mais abundante da natureza após a celulose, é importante componente do exoesqueleto de insetos e crustáceos, sua atividade antimicrobiana é dependente do grau de desacetilação da molécula e das condições do meio.

Na alimentação humana a quitosana foi utilizada por muito tempo como inibidor da absorção de gordura, havendo ainda hoje, diversos produtos comerciais a base de quitosana utilizadas como auxiliares em programas de emagrecimento, sendo atribuído a esta substância a capacidade de se complexar com lipídeos, reduzindo a absorção e os níveis séricos de colesterol.

Desta forma, no presente trabalho, avaliou-se a capacidade dos lipídeos, especialmente na forma livre, de modular a fermentação ruminal e na possibilidade destes de interagir com a quitosana, não somente quanto ao processo fermentativo ruminal, como também na digestibilidade intestinal de nutrientes, parâmetros sanguíneos e desempenho produtivo, quando a inclusão de quitosana foi realizada em dietas com baixos ou altos teores de extrato etéreo.

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

A hipótese a ser avaliada no presente trabalho é a de que as concentrações de extrato etéreo da dieta basal podem melhorar as respostas sobre consumo, digestão, metabolismo e desempenho produtivo à inclusão de quitosana como aditivo na alimentação de vacas leiteiras no terço médio de lactação.

Objetivou-se avaliar os efeitos da inclusão combinada de quitosana e de óleo de soja nas dietas de vacas leiteiras no terço médio da 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 e os balanços de energia e de nitrogênio.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Nas últimas décadas a produção leiteira tem passado por profundas transformações, no mundo todo. Segundo Vandehaar e St-Pierre (2006), nos últimos 100 anos, nos Estados Unidos, a produção de leite por vaca mais que quadruplicou e este aumento pode ser atribuído ao aumento do potencial genético e à evolução da nutrição e do manejo. Neste contexto, desenvolver estratégias nutricionais que facilitem o atendimento desta demanda nutricional crescente, respeitando os conceitos de sustentabilidade econômica, social e ambiental é fundamental.

O conhecimento do ecossistema ruminal permitiu ao longo desta evolução, constatar que a heterogeneidade dos microrganismos ruminais é grande. Logo, a resistência a substâncias alopáticas, o substrato de crescimento e os produtos do seu metabolismo também são variáveis entre as diferentes populações de microrganismos.

Russell e Houlihan (2003) relatam que após a Segunda Guerra Mundial, experimentos demonstraram que aves suplementadas com *Streptomyces aureofaciens* tiveram um crescimento mais eficiente, o qual foi atribuído, inicialmente, ao suprimento simultâneo de vitamina B12. Quando a clortetraciclina, obtida a partir deste microrganismo foi avaliada e os resultados obtidos foram similares aos obtidos inicialmente, esta teoria não foi mais aceita. O mecanismo de ação desta substância não era conhecido, mas esta foi a precursora na utilização de promotores de crescimento na alimentação animal.

Na década de 60 alguns trabalhos passaram a avaliar o efeito da inclusão de óleos essenciais sobre a fermentação ruminal. Óleos essenciais são metabólitos secundários de plantas, como saponinas e taninos que apresentam propriedades antimicrobianas (BENCHAAAR et al., 2008). Borchers (1965¹ - apud BENCHAAAR et al., 2008, p. 215) observou que a adição de timol (óleo de orégano) resultou em acúmulo de aminoácidos e redução de amônia no rúmen, indicando que este óleo essencial inibe deaminação ruminal pela inibição de bactérias que realizam este processo.

Em meados dos anos 1970, o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou nova classe de antimicrobianos, os ionóforos, para utilização em bovinos. O ionóforo monensina, inicialmente desenvolvido para ser anticoccidiostático na produção de frangos, quando utilizado na alimentação de ruminantes aumentou a eficiência destes animais por alterar a

¹ BORCHERS, R. Proteolytic activity of rumen fluid in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 24, p. 1033-1038, 1965.

fermentação ruminal. Depois, se descobriu que a monensina reduz a relação acetato:propionato e a produção de metano (THORNTON; OWENS, 1981), a degradabilidade ruminal da proteína (RUSSEL; STROBEL, 1989), além de aumentar o pH ruminal de animais alimentados com dietas de alto concentrado, prevenindo desordens metabólicas (NAGARAJA et al., 1997).

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

Duffield et al. (2008a), em outro trabalho metanalítico, avaliaram os efeitos metabólicos da monensina sódica e observaram que a monensina aumenta a glicemia em 3% e a concentração sérica de ureia em 6%, sem influenciar as concentrações de colesterol, insulina e cálcio no sangue e de ureia no leite. Gandra et al. (2010), avaliando concentrações crescentes de monensina sódica nas dietas de vacas leiteiras no terço médio de lactação, observaram redução linear do consumo e resposta quadrática sobre a produção de leite, resultando na maior eficiência produtiva quando a dose utilizada foi de 24 mg/kg de matéria seca da dieta.

No rúmen os ionóforos atuam em nível de membrana celular das bactérias, alterando seu transporte de íons (RUSSELL; HOULIHAN, 2003). Segundo estes autores, a ligação do ionóforo aos canais de membrana e o desenvolvimento da sua ação dependem da forma que a molécula se encontra. Moléculas ionizadas tem capacidade reduzida de se ligar a estes receptores. As diferenças na estrutura de membrana de bactérias gram-positiva e negativa explicam as diferenças dos efeitos dos ionóforos sobre estas. As bactérias gram-negativas possuem camada lipídica externa que contém porinas (canais de proteínas) com tamanho limite de aproximadamente 600 Dalton. Os ionóforos geralmente são maiores 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, assim, penetrar livremente na membrana celular.

A maioria dos microrganismos ruminais mantém alta concentração intracelular de potássio, eliminando para o exterior sódio e outros prótons (HAROLD, 1986). A

concentração de sódio no rúmen, é de 2 a 10 vezes maior que a concentração de potássio (DURAND; KAWASHIMA, 1980). Com ação dos ionóforos, há influxo de sódio e outros íons de carga positiva, que faz com que a célula entre num ciclo fútil para manter seu potencial de membrana, evitando o influxo de água e o rompimento (RUSSELL; HOULIHAN, 2003).

Um outro grupo de microrganismos, muitas vezes desconsiderado e que é sabidamente sensível à ação da monensina sódica é o grupo dos protozoários. Segundo Williams e Coleman (1997), eles são responsáveis por até 37% da metanogênese que ocorre no rúmen, sendo a inibição do seu crescimento interessante sob o ponto de vista do metabolismo energético ruminal.

Eugene et al. (2004), revisando a literatura, observaram que animais defaunados, ou seja, livres de protozoários, apresentam redução da digestibilidade da matéria orgânica e da FDN, além de maior taxa de passagem do nitrogênio microbiano, com aumento da eficiência de síntese microbiana e da concentração de propionato e redução das concentrações ruminais de amônia e de butirato.

Segundo Guan et al. (2006), o efeito inibidor da monensina sobre o crescimento de protozoários é transitório, persistindo por até 3-4 semanas após o início do fornecimento do ionóforo. Fontes de lipídeos insaturadas, como o óleo de soja, também apresentam propriedades defaunadoras (MOSS et al., 2000) e têm a capacidade de interferir na atividade de bactérias gram-positivas, à semelhança dos ionóforos.

Yang e Russell (1993) verificaram que a monensina leva a redução de, aproximadamente 10 vezes na quantidade de bactérias que utilizam exclusivamente peptídeos e aminoácidos como substrato de crescimento. Desse modo, a monensina inibe a atividade das bactérias fermentadoras de aminoácidos, entre outras, e, conseqüentemente, reduz a deaminação e o nível de amônia ruminal, elevando a concentração de proteína bacteriana no fluido ruminal e o suprimento de aminoácidos para o animal.

Outros importantes componentes utilizados na alimentação de ruminantes e que tem potencial de modificar a microbiota ruminal são os lipídeos. Utilizados, inicialmente, exclusivamente com o objetivo de aumentar a densidade energética das dietas e reduzir seu incremento calórico, os lipídeos também tem potencial de influenciar o crescimento de microrganismos, especialmente no processo de biohidrogenação (JENKINS, 1993).

De acordo com Jenkins e Jenny (1992) e Jenkins (1993), o processo de digestão de lipídeos em ruminantes pode ser resumido por duas principais etapas: lipólise e biohidrogenação de ácidos graxos insaturados. A biohidrogenação pode ser considerada

processo de autodefesa dos microrganismos ruminais, que convertem ácidos graxos insaturados (C18:2 e C18:3) em ácidos graxos saturados, menos tóxicos à população microbiana ruminal (PALMQUIST; MATTOS, 2006). Além disso, esse processo reduz o fluxo intestinal de ácidos graxos poli-insaturados para o duodeno e contribui para o acúmulo de isômeros do ácido linoleico conjugado (CLA), *cis* e *trans*, em produtos derivados de ruminantes. A hidrólise, realizada pelas bactérias ruminais, atinge grande parte dos ácidos graxos poli-insaturados, mas pode ser influenciada por diversos fatores, como o nível de lipídeos da dieta, pH ruminal e a utilização de aditivos, como os ionóforos, que podem inibir a atividade e o crescimento das bactérias (DOREU; CHILLIARD, 1997). Assim, a manipulação da fermentação ruminal surge como alternativa aos processos de suplementação convencionais, promovendo um aumento na proporção de ácidos graxos poli-insaturados que chegam ao duodeno.

O aumento da concentração de ácidos graxos insaturados na dieta, assim como dos intermediários do processo de biohidrogenação tem grande potencial de influenciar na fermentação ruminal (JENKINS, 1993). Existem pelo menos dez mecanismos pelos quais estes compostos podem alterar a função de membrana de células eucarióticas e assim influenciar no crescimento dos microrganismos ruminais (GUTKNECHT, 1988).

Os efeitos dos intermediários do processo de biohidrogenação, especialmente o isômero do ácido linoleico conjugado (*trans*10 e *cis*12), têm sido tradicionalmente associados com redução dos teores de gordura no leite (BAUMAN; GRINARI, 2001). Os resultados da suplementação de lipídeos na dieta de vacas leiteiras, são extremamente variáveis, na dependência da fonte utilizada, método de processamento, teor na dieta e fase de lactação dos animais (PALMQUIST; JENKINS, 1980).

Bactérias lipolíticas e algumas bactérias que atuam no processo de biohidrogenação são gram-positivas (HARFOOT; HAZLEWOOD, 1988). Aditivos com potencial de ação sobre gram-positivas, como a monensina, podem assim inibir estes processos, aumentando a proporção de ácidos graxos insaturados no rúmen e os isômeros do ácido linoleico que chegam ao duodeno.

Os resultados apresentados por Duffield et al. (2008b) com relação ao perfil de ácidos graxos e a redução do teor de gordura no leite, sugerem que a monensina também pode influenciar no processo de biohidrogenação, assim como o aumento do aporte dietético de ácidos graxos insaturados (NRC, 2001). Segundo Silvestre et al. (2011), a suplementação com ácidos graxos poli-insaturados e a consequente alteração do perfil de ácidos graxos da digesta

que chega ao abomaso também tem implicações positivas sobre a função imune de vacas no período de transição.

Além disso, a alteração do perfil de ácidos graxos no leite pode trazer efeitos positivos à saúde humana. Benjamin e Spener (2009) citaram que apesar de a dose não estar estabelecida, o consumo de isômeros do ácido linoleico é importante, uma vez que este pode estar envolvido com efeitos benéficos à saúde humana, como redução da obesidade, da aterosclerose, além dos efeitos anticarcinogênicos, antidiabéticos, apoptóticos e imunomodulador.

Assim, passou-se a estudar os efeitos da associação destes ingredientes nas dietas de vacas em lactação, pensando-se não somente no desempenho produtivo, como também nos potenciais efeitos benéficos sobre a fermentação ruminal, saúde animal e perfil de ácidos graxos no leite.

Eifert et al. (2005b) trabalharam com vacas de média produção, no início de lactação e observaram que as respostas a inclusão de monensina não foram influenciadas pela suplementação do óleo de soja, embora este último tenha comprometido o desempenho dos animais, prejudicando a produção de leite corrigida e a composição do leite. O perfil de ácidos graxos foi influenciado principalmente pela suplementação de óleo, independentemente da adição de monensina (EIFERT et al., 2006).

Avaliando a ocorrência de 11 gêneros de protozoários ciliados no rúmen de vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo óleo de soja e monensina, Martinele et al. (2008) não observaram interação significativa entre os fatores avaliados sobre a contagem de protozoários totais e por gêneros. Tanto a monensina quanto o óleo de soja reduziram a contagem total de protozoários.

Eifert et al. (2005a), avaliando a suplementação com óleo de soja (4% da MS) e monensina sódica (33 ppm) na dieta de vacas leiteiras lactantes observaram que a presença do óleo reduziu o consumo de matéria seca, mas resultou em similar consumo de NDT. A digestibilidade aparente total dos nutrientes, o pH ruminal, a eficiência de síntese microbiana e a produção total de ácidos graxos de cadeia curta não foram influenciados pelas dietas experimentais. A concentração de N-NH_3 ruminal apresentou interação, sendo menor apenas para a dieta contendo somente óleo. A relação acetato:propionato foi reduzida tanto pela presença de óleo quanto pela presença de monensina. Estes autores concluíram então que a combinação de óleo e monensina atua sobre a mesma população microbiana e a sensibilidade à ação da monensina é aumentada na presença de óleo.

AlZhaal et al. (2008) trabalharam com vacas no terço médio de lactação e avaliaram o efeito da inclusão de monensina em dietas com diferentes concentrações de óleo de soja. Não foram observados efeitos sobre a produção de leite, no entanto, o teor de gordura foi influenciado negativamente pela inclusão de óleo e pela inclusão de monensina, o que ocorreu principalmente pela inclusão conjunta. Os autores associam esta redução do teor de gordura ao aumento do CLA *trans*-10, *cis*-12.

He et al. (2012), estudaram monensina e diferentes combinações de ácido oléico e linoléico na dieta de vacas em lactação e não observaram qualquer interação do aditivo com os lipídeos no desempenho produtivo. A composição do leite foi similar, no entanto, o teor de C18:1 *trans* 10 apresentou interação positiva para a inclusão conjunta das fontes avaliadas.

Nos últimos anos, no entanto, baseando-se no conceito de que a resistência de antibióticos em humanos poderia ser influenciada pelo uso rotineiro destes na alimentação animal, e adotando o princípio da precaução, a União Européia banuiu a utilização de antibióticos e promotores de crescimento na alimentação animal, após 30 anos (Regulamentação 1831/2003/EC).

Apesar de no Brasil ainda haver três ionóforos autorizados para serem utilizados como aditivos na alimentação de bovinos (lasalocida, monensina sódica e salinomicina sódica) (BRASIL, 2008), as pressões externas devem aumentar, seguindo tendência do influente mercado Europeu.

Considerando o efeito benéfico da utilização deste aditivo na alimentação animal, diferentes aditivos e componentes de dietas alternativos tem sido pesquisados pela comunidade científica e pela indústria para promover efeitos similares a ionóforos, notadamente a monensina sódica. Dentre estes aditivos, é importante citar a utilização de leveduras (DESNOYERS et al., 2009; ROBINSON; ERASMUS, 2009), de óleos essenciais anteriormente citados (BENCHAAAR et al., 2008) e da quitosana, tema deste trabalho.

As propriedades antimicrobianas da quitosana foram inicialmente descritas por Allan e Hardwiger (1979). Recentemente foi proposto por Goiri et al. (2009a) a utilização de quitosana para modular a fermentação e digestão ruminal. A quitosana (polímero N-acetil-D-glicosamina) é um biopolímero natural derivado da desacetilação da quitina (GOIRI et al., 2009a). A quitina por sua vez é o biopolímero mais abundante da natureza após a celulose, 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 (KONG et al., 2010). Talvez os usos mais

estudados recentemente sejam na engenharia de alimentos, especialmente no desenvolvimento de embalagens (KONG et al., 2010). Senel et al. (2004) em ampla revisão de literatura descreveram diversas 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 na indústria farmacêutica.

Por muitos anos a quitosana foi utilizada como inibidora da digestão de lipídeos e consequentemente redutora do nível de colesterol sérico, sendo utilizada como auxiliar em programas de emagrecimento humano. Zhang et al. (2008), trabalhando com ratos, observaram redução na digestibilidade do extrato etéreo e da colesterolemia quando os animais foram submetidas às dietas com baixo ou alto nível de lipídeos. Os autores sugerem que esta poderia ser boa estratégia para reduzir a incidência de doenças coronárias em humanos.

Benediktsdóttir et al. (2014), no entanto, revisando trabalhos na literatura publicados nas últimas duas décadas que avaliaram a aplicação de quitosana com o intuito de aumentar a permeabilidade de marcadores em membranas mucosas, visando a aplicação desta como facilitador da absorção de fármacos utilizados por via oral, observaram que, dependendo das condições de ambiente, a quitosana tem a capacidade de aumentar a absorção, embora o mecanismo de ação ainda não esteja estabelecido.

A quitosana tem sido avaliada também na produção de aminoácidos protegidos. Nas condições do pH ruminal as cargas positivas do grupo amino da quitosana podem interagir eletrostaticamente com o grupo carboxil dos aminoácidos, protegendo-os da degradação ruminal (CHIANG et al., 2009).

A atividade antimicrobiana da quitosana é bem reconhecida contra diversas bactérias e fungos, e é influenciada por diversos fatores, que podem ser classificados como intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos envolvem carga elétrica, peso molecular, pKa, grau de desacetilação, concentração, afinidade por solventes orgânicos e propriedades quelantes. Os fatores extrínsecos estão relacionados ao microrganismo, o estado físico da quitosana e as características do meio, como pH, temperatura e tempo de reação (KONG et al., 2010).

Segundo Senel et al. (2004), a quitosana geralmente exerce efeito bactericida mais forte sobre bactérias gram-positivas quando comparado com gram-negativas. O mecanismo de ação, no entanto, não é conhecido. Kong et al. (2010) sugere que a estrutura policatiónica da molécula é fundamental para que esta se ligue aos polissacarídeos de membrana e às proteínas de superfície celular das bactérias Gram-negativas e assim desempenhe suas funções.

Quando o pH do ambiente está acima do pKa da quitosana, efeitos hidrofóbico e quelante, em vez de efeito eletrostático, são responsáveis pela atividade antimicrobiana da quitosana (KONG et al., 2010). As moléculas grandes de quitosana tendem a agir diretamente sobre a parede celular, quelando metais traços da parede celular e assim alterando sua composição, comprometendo sua solubilidade. Partículas muito pequenas de quitosana podem adentrar a célula e inibir a síntese de RNAm.

Goiri et al. (2008) avaliaram a utilização de diferentes especificações de quitosana sobre a digestão ruminal *in vitro*, utilizando a silagem de milho como volumoso. Observou-se que a quitosana com mais de 95% de desacetilação alterou a digestão ruminal *in vitro*, reduzindo a digestibilidade da matéria orgânica (DIVMO) e a concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Em relação à proporção molar dos AGCC, foi observada redução de acetato e aumento na concentração de propionato.

Posteriormente, Goiri et al. (2009b) em estudo dose-resposta *in vitro* avaliaram a digestão e fermentação ruminal em substratos com diferentes relações volumoso:concentrado, adicionados de doses crescentes de quitosanas com diferentes graus de desacetilação. Quando avaliaram 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 DIVMO e da concentração de butirato. Em relação ao propionato, houve marcante aumento de sua concentração com o aumento da dose de quitosana, e redução na relação acetato:propionato.

No estudo com média proporção de forragem (50%), Goiri et al. (2009b) 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, nas dietas com alta proporção de forragem, houve efeito da dose de quitosana com aumento da proporção molar de propionato e redução da relação acetato:propionato. Ainda, nas dietas com baixa proporção de forragem (20%) o aumento da dose de quitosana resultou em redução da DIVMO e da proporção molar de acetato, butirato e AGCR, na qual foi observado também marcante redução na produção de metano. Novamente os autores observaram aumento na proporção molar de propionato e redução da relação acetato:propionato. Os efeitos observados foram semelhantes para as diferentes quitosanas utilizadas. A quitosana com menor grau de desacetilação, no entanto, foi menos eficiente em alterar a produção de propionato. Os resultados de Goiri et al. (2009b) 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.

Goiri et al. (2009c) avaliaram a utilização de duas doses de quitosana na fermentação *in vitro* de uma dieta com 50% de feno de alfafa e 50% de concentrado, utilizando a técnica de simulação de rúmen (Rusitec[®]), e compararam com a utilização de monensina sódica. A utilização de quitosana, nas duas doses, reduziu a produção total de gases e diferentemente da monensina, reduziu a produção de metano. Além disso, a maior dose de quitosana reduziu a produção de metano por grama de matéria seca desaparecida, e também foi o único tratamento que diminuiu a concentração de N-NH₃. Não foi observada alteração no total de AGCC para monensina e quitosana, porém a proporção molar de propionato foi aumentada, independentemente do aditivo. Ainda, Goiri et al. (2009c) citaram que a utilização de quitosana e monensina reduziu a relação acetato:propionato, porém 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, independente da dose utilizada. Os autores concluíram que a adição de quitosana exerce efeito nos processos fermentativos no rúmen, o que pode melhorar a eficiência de utilização de energia *in vitro*, e este efeito foi mantido durante todo o período experimental sem nenhuma adaptação aparente dos microrganismos presentes.

Todos os resultados acima descritos de estudos com quitosana em ruminantes se referem a experimentos conduzidos *in vitro*, sendo necessária a avaliação da quitosana em estudos *in vivo*.

Desta forma, o estudo de Goiri et al. (2010a) foi o primeiro experimento que utilizou animais e quitosana como aditivo para avaliar se há alteração na fermentação ruminal. Neste estudo, Goiri et al. (2010a) utilizaram quatro ovelhas não lactantes canuladas no rúmen, alimentadas com dieta 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*, não foi observado efeito da quitosana sobre o total de AGCC e proporção molar de acetato, porém houve aumento da proporção molar de propionato e redução da relação acetato:propionato e na concentração de N-NH₃. Nas fezes, a quitosana diminuiu o total de AGCC e a proporção molar de acetato e butirato, mas aumentou a de propionato. Novamente houve redução da relação acetato:propionato. Não houve efeito da quitosana sobre o consumo e a digestibilidade da matéria orgânica, proteína bruta e extrato etéreo, porém, segundo os autores, foi observada redução da digestibilidade da fibra. Desta forma, segundo estes autores, a quitosana altera a

fermentação ruminal favorecendo o uso mais eficiente da energia, sem, no entanto, reduzir a digestibilidade da matéria orgânica.

Posteriormente, Araújo (2011), trabalhando com novilhos Nelore canulados no rúmen, não observaram diferença no consumo de matéria seca com a inclusão de concentrações crescentes de quitosana nas dietas. Apenas para o consumo de FDN observou-se efeito quadrático, com maior consumo de FDN entre a dose de 50 e 100 mg/kg de PV. A digestibilidade da MS e da MO apresentou resposta linear crescente, enquanto que a digestibilidade do EE e dos carboidratos totais não apresentou diferença significativa.

Com relação aos parâmetros ruminais, Araújo (2011) observaram que o pH ruminal não apresentou diferença entre as dietas experimentais, porém foi observado efeito quadrático para a concentração de amônia, com redução para a dose de 150 mg/kg de peso vivo. Não houve alteração da produção de proteína microbiana ruminal, nem na concentração total de AGCC, assim como reportaram Goiri et al. (2010a). Araújo (2011) também observou redução da proporção molar de acetato, com aumento da proporção de propionato, indicando que o uso da quitosana altera a fermentação ruminal, priorizando rotas energeticamente mais eficientes. Não houve diferenças no balanço de energia e proteína, embora a glicemia tenha apresentado resposta linear crescente.

Mingoti (2013) avaliou a inclusão de diferentes doses de quitosana na dieta de vacas leiteiras, com produção média de 30 kg de leite por dia, no terço médio de lactação e observou aumento linear na digestibilidade da matéria seca e nutrientes, com melhoria da eficiência do uso de nitrogênio, apesar de não ter sido observado diferença na produção de leite. Observou também redução linear da concentração de ácidos graxos de cadeia curta (<16C) e aumento dos ácidos graxos de cadeia longa no leite com o aumento da dose de quitosana. Houve efeito quadrático para a concentração total de ácidos graxos de 18 carbonos e ácidos graxos insaturados, sendo que na dose de 100mg/kg observou-se a maior relação insaturados:saturados.

Os resultados observados com o uso de quitosana quando comparados com monensina sugerem efeito similar ou mais potente em promover melhor eficiência de utilização de energia no ecossistema ruminal, conforme os estudos de Goiri et al. (2010a); Araújo (2011) e Mingoti (2013).

Ainda, Goiri et al. (2010b) em estudo *in vitro* avaliaram a inclusão de quitosana em dietas a base de óleo de girassol e farelo de canola como fontes de gordura e observaram que a quitosana é eficiente em inibir a biohidrogenação *in vitro*, aumentando os ácidos graxos C18:1 t11 e proporção total de CLA, e reduzindo a proporção de ácidos graxos saturados,

independentemente da fonte de ácidos graxos utilizada. Foi observada redução de ácidos graxos C18:0 e aumento de C18:1 total, C18:1 t11, CLA total, c9t11 CLA e da relação C18:1 t11/C18:0. Comparando as fontes de gordura, quando se usou farelo de canola, apenas o ácido graxo C16:0 apresentou redução. A inclusão de quitosana aumentou as proporções de C18:1 c9, C18:1 c11, e CLA t10c12 somente quando farelo de canola foi utilizado.

Analisando os estudos *in vitro* e *in vivo* que avaliaram quitosana e seus efeitos sobre a fermentação ruminal e digestão, observa-se que existe grande potencial a ser explorado na utilização de quitosana na alimentação de ruminantes, seja para a produção de leite ou carne. Porém, não foram encontrados na literatura resultados de pesquisas *in vivo* com bovinos e também avaliações de desempenho com animais em produção quando seu uso esteve associado à suplementação de lipídeos, especialmente avaliando o efeito da quitosana em modular a fermentação ruminal e influenciar no desempenho produtivo dos animais, sejam estes com aptidão para a produção de leite ou carne. Também, aparentemente, não foram avaliadas diferentes circunstâncias de alimentação, como diferentes volumosos e concentrados utilizados na bovinocultura brasileira.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL E ANIMAIS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), em Pirassununga, no período de 15 de novembro de 2012 a 06 de fevereiro de 2013.

A localização geográfica do LPBL é 21° 57' 28" de latitude sul, 47° 27' 21" de longitude oeste e altitude de 635 metros. O clima da região é tropical, com temperatura média durante o experimento de 24,16° C. As temperaturas máximas e mínimas médias diárias foram de 31,07 e 19,31° C, respectivamente. A umidade relativa do ar média foi de 79,26% e a velocidade do vento de 0,93 km/h.

Foram utilizadas 24 vacas da raça Holandesa, multíparas, com peso médio de $581,2 \pm 73,6$ kg, com dias em lactação médio de $174,7 \pm 53,1$ e produção de leite de $36,14 \pm 5,32$ kg de leite por dia no início do experimento. Dentre os 24 animais havia quatro vacas canuladas no rúmen que foram utilizadas para avaliação da fermentação ruminal. Os animais foram alojados em estábulo tipo “free-stall”, com ventilação forçada, em baias individuais de 17,5m² de área e providas de camas de areia, sendo ordenhados mecanicamente duas vezes ao dia, as 6h00 e as 16h00.

4.2 DELINEAMENTO E DIETAS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos em seis Quadrados Latino 4x4, balanceados e contemporâneos. A produção de leite, dias em lactação e PV ao início do experimento foram utilizados para alocar os animais aos quadrados, buscando reduzir a variabilidade dentro de cada Quadrado Latino. Para as variáveis ruminais foram utilizadas apenas as vacas canuladas no rúmen, as quais foram alocadas em um mesmo grupo.

Cada período experimental teve a duração de 21 dias, sendo os 14 primeiros de adaptação às dietas e os demais para coleta de amostras. Os animais foram alimentados com quatro dietas durante o período experimental, formuladas para serem isonitrogenadas e

atenderem as exigências nutricionais de vacas em lactação de 580 kg de peso corporal, com produção diária de leite de 35,0 kg, com 3,5% de gordura, e 120 dias em lactação, conforme recomendações do NRC (2001).

As dietas experimentais diferiam quanto a inclusão de óleo de soja e a inclusão de quitosana, configurando um arranjo de tratamentos em esquema fatorial 2 x 2. Os tratamentos foram então obtidos pela combinação destes fatores, como segue: 1) Controle (C), sem suplementação de óleo de soja e sem a inclusão de quitosana na dieta; 2) Quitosana (Q), dieta sem a suplementação de óleo de soja e com inclusão de quitosana; 3) Óleo de soja (O), com inclusão de 3,3% de óleo de soja na MS da dieta e sem a inclusão de quitosana; 4) QO, com a inclusão 3,3% de óleo de soja na MS da dieta e com a inclusão de quitosana. O volumoso utilizado foi a silagem de milho, compondo 50% da matéria seca da dieta. A quitosana foi adicionada aos concentrados das dietas no teor de 0,8% da matéria seca, com o objetivo de atingir um consumo de 150 mg/kg de PV. Esta dose foi estabelecida a partir dos resultados obtidos por Mingotti (2013) e Araújo (2011).

4.3 CONSUMO DE MATÉRIA SECA E NUTRIENTES

Diariamente foram feitas pesagens das quantidades dos volumosos e concentrados fornecidos e das sobras de cada animal, para estimativa do consumo. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, às 7h00 e às 14h00, de acordo com o consumo no dia anterior, de forma a ser mantido percentual de sobras das dietas entre 5 e 10% do fornecido, para que não houvesse limitação de consumo.

Às 6h00, os animais eram conduzidos para ordenha, as sobras retiradas e pesadas e ambos, concentrado e volumoso eram pesados, em duas porções, para serem fornecidas aos animais nos dois fornecimentos diários. No fornecimento, o concentrado e o volumoso eram homogeneizados no cocho, e fornecidos na forma de dieta completa. Amostras das sobras de cada animal e ingredientes da dieta fornecida eram coletadas durante todo o período de avaliação de consumo, perfazendo amostra composta dos diferentes dias, que após coletada e eram armazenadas a -20° C.

As análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Bromatologia localizado nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite. A proporção

dos ingredientes na dieta, assim como a respectiva composição bromatológica das dietas e ingredientes encontram-se nas tabelas 1, 2 e 3.

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

A quitosana utilizada em todo o experimento foi adquirida junto à Polymar Ciência e Nutrição S/A[®] (Fortaleza, Ceará, Brasil) e apresentou as seguintes especificações técnicas: densidade aparente 0,33 g/mL, pH 8,81, viscosidade <200 cPs e grau de desacetilação de 86,6%.

Tabela 1- Composição das dietas experimentais, contendo quitosana e/ou soja de soja, fornecidas a vacas da raça Holandesa no médio de lactação

Ingredientes (%MS)	Dietas experimentais ¹			
	C	Q	O	QO
Silagem de milho	50,00	50,00	50,00	50,00
Milho moído	28,18	27,95	24,18	23,99
Óleo de soja	-	-	3,30	3,27
Farelo de soja	19,10	18,95	19,80	19,64
Quitosana	-	0,40	-	0,40
Bicarbonato de sódio	0,80	0,79	0,80	0,79
Ureia	0,32	0,32	0,32	0,32
Sulfato de amônia	0,10	0,10	0,10	0,10
Fosfato Bicalcico	0,30	0,30	0,30	0,30
Calcáreo	0,70	0,69	0,70	0,69
Mistura mineral ²	0,20	0,20	0,20	0,20
Sal comum	0,30	0,30	0,30	0,30

¹C: Controle; Q: Quitosana; O: Óleo de Soja; QO: Quitosana e Óleo de Soja. ²Contém em 1kg do produto: 125mg de Co, 5625mg de Cu, 9mg de S, 312 mg de I, 5000 mg de Fe, 18125 mg de Mn, 144 mg de Se, 23750 mg de Zn, 2000 UI de Vit A, 500 UI de Vit D e 12500 UI de Vit E.

Tabela 2 - Composição bromatológica dos alimentos utilizados nas dietas experimentais

Composição química	SM ¹	FS ²	MM ³	Q ⁴
Matéria seca ⁵	37,78	88,20	87,75	88,32
Matéria orgânica ⁶	96,31	93,11	98,06	96,09
Proteína bruta ⁶	7,67	50,48	9,53	43,80
Proteína insolúvel em detergente neutro ⁶	2,03	2,05	1,45	-
Proteína insolúvel em detergente ácido ⁶	0,25	1,20	0,66	-
Extrato etéreo ⁶	2,85	2,05	4,60	-
Carboidratos não fibrosos ⁶	30,08	25,06	69,48	-
Fibra em detergente neutro ⁶	55,71	15,52	14,46	-
FDNcp ⁷	51,70	12,54	12,76	-
Fibra em detergente ácido ⁶	31,93	9,57	4,04	-
Fibra em detergente ácido indigestível ⁶	9,75	0,86	1,08	-
Lignina ⁶	5,25	1,57	1,78	-
Matéria mineral ⁶	3,69	6,89	1,94	3,91
Nutrientes digestíveis totais	66,17	78,96	87,43	-
Energia líquida (Mcal/kg)	1,50	1,81	2,02	-

¹Silagem de milho; ²Farelo de soja; ³Milho moído; ⁴Quitosana; ⁵porcentagem da matéria natural; ⁶porcentagem da matéria seca; ⁷Fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteínas.

Tabela 3 - Composição químico bromatológica das dietas experimentais, contendo quitosana e/ou soja de soja, fornecidas à vacas da raça Holandesa no médio de lactação

Composição química	Dietas experimentais ¹			
	C	Q	O	QO
Matéria seca ²	63,09	63,09	63,47	63,46
Matéria orgânica ³	93,92	93,93	93,96	93,97
Proteína bruta ³	17,24	17,31	17,15	17,22
Proteína insolúvel em detergente neutro ³	1,81	1,81	1,77	1,76
Proteína insolúvel em detergente ácido ³	0,54	0,54	0,52	0,52
Extrato etéreo ³	3,11	3,09	6,41	6,37
Carboidrato não fibroso ³	39,34	39,35	36,66	36,70
Fibra em detergente neutro ³	34,88	34,82	34,38	34,33
FDNcp ⁷	31,55	31,50	31,14	31,10
Fibra em detergente ácido ³	18,93	18,90	18,82	18,80
Fibra em detergente ácido indigestível ³	5,34	5,34	5,30	5,30
Lignina ³	3,43	3,42	3,36	3,36
Matéria mineral ³	6,08	6,07	6,04	6,03
Nutrientes digestíveis totais	72,70	72,39	76,00	75,67
Energia líquida (Mcal/kg)	1,66	1,66	1,75	1,74

¹C: Controle; Q: Quitosana; O: Óleo de Soja; QO: Quitosana e Óleo de Soja; ²porcentagem da matéria natural;

³porcentagem da matéria seca; ⁴Fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteínas.

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

Os nutrientes digestíveis totais foram calculados conforme equações de Weiss et al. (1992), descritas no NRC (2001), em que: $NDT = CNF_d + PB_d + (AG_d * 2,25) + FDN_d - 7$, onde PB_d , CNF_d , FDN_d e AG_d representam o total destes nutrientes digestíveis. Os teores de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente neutro livre de cinza e proteína (FDN_{cp}), e fibra detergente ácido (FDA) foram obtidos conforme método descrito por Van Soest et al. (1991), utilizando-se α -amilase e sem adição de sulfito de sódio na determinação do FDN, em Sistema Ankon[®]. O teor de energia líquida foi estimado através da equação estabelecida pelo NRC(2001), em que $EL (Mcal/kg) = 0,0245 * NDT (\%) - 0,12$.

4.4 DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL

Para estimativa da digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes, amostras de fezes foram coletadas, duas vezes ao dia, no 16º, 17º e 18º dias de cada período experimental. As amostras obtidas foram homogeneizadas para compor uma amostra composta de cada animal em cada período.

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

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

As amostras foram incubadas por 288 horas no rúmen de dois novilhos da raça Nelore, previamente adaptados com concentrado a base de farelo de soja e milho moído e volumoso a base de silagem de milho, de acordo com a metodologia adaptada por Casali et al. (2008).

Após a retirada do rúmen os sacos foram lavados com água corrente. Posteriormente, os sacos foram submetidos ao tratamento com detergente ácido (MERTENS, 2002) por uma hora, em equipamento analisador de fibra Ankon[®]. Após este período foram lavados com água quente e acetona e secos em estufa não ventilada (105°C/45 minutos), sendo retirados, acondicionados em dessecador (20 sacos/dessecador), e pesados obtendo-se ao final deste processo, a concentração de FDAi. Não foi feito qualquer ensaio para estimar a taxa de recuperação do indicador e esta foi considerada como sendo de 100%.

4.5 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

As vacas foram ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia, às 6h00 e às 16h00, sendo a produção de leite (PL) registrada diariamente durante todo o período experimental e a produção média considerada apenas dos últimos sete dias de cada período. A produção de leite foi corrigida para 3,5% de gordura (PLC) segundo fórmula de Sklan et al. (1992), onde $PLC = (0,432 + 0,163 * G\%) * PL$.

As amostras utilizadas para análise da composição do leite foram obtidas no 16º, 17º e 18º dias de cada período experimental, na qual cada amostra proveniente das duas ordenhas diárias, com amostragens proporcionais. Foram determinados os teores de gordura, proteína e lactose. Para a determinação da gordura no leite foram utilizadas amostras a fresco, segundo a metodologia de Gerber 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[®]. Para determinação da ureia e nitrogênio ureico no leite, as amostras de leite foram desproteinizadas. 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 (Bioclin[®], no equipamento SAB-200, da CELM[®]).

4.6 FERMENTAÇÃO RUMINAL

Para avaliação dos parâmetros de fermentação ruminal no 20º dia de cada período experimental amostras de líquido ruminal foram coletadas somente das vacas canuladas no rúmen, nos tempos zero, duas, quatro, seis, oito, dez e 12 horas após a alimentação da manhã.

Logo após a coleta foi determinado o pH do líquido ruminal, com a utilização de peagâmetro. As amostras foram armazenadas em caixas térmicas e encaminhadas ao Laboratório de Fermentabilidade Ruminal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP).

No laboratório as amostras foram centrifugadas a 2.000 x g por 15 minutos, 2 mL do sobrenadante foi colocado em tubo de ensaio e adicionando-se 0,4 mL de ácido fórmico P.A., arrolhado, identificado e armazenado a -20°C para determinação de AGCC. 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 AGCC foi a preconizada por Erwin et al. (1961), sendo utilizado cromatógrafo a gás (Modelo 9001 Gás Chromatograph, Marca Finnigan) equipado com coluna de vidro Capilar - Stabilwax de 30m de comprimento e 0.53mm de diâmetro interno. Os gases utilizados foram o Hélio como gás de arraste na vazão de 8,01 mL/minuto, ar sintético como gás comburente na vazão de 40 kPa, e hidrogênio como gás combustível na vazão de 60 kPa. A temperatura de operação utilizadas do injetor e do detector de ionização de chamas foram de 250°C e da coluna de separação de 145°C.

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

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.

4.7 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 consecutivos, 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 desproteínizado.

Alíquotas de 50 mL de urina (amostra *spot*) foram obtidas de todas as vacas no 16º e 17º dias de cada período experimental, aproximadamente 4 horas após a alimentação, durante micção estimulada por massagem. 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 (Bioclin[®]), utilizando reação enzimática colorimétrica cinética em aparelho SBA-200, da CELM[®]. O volume urinário total diário foi estimado dividindo-se as excreções urinárias diárias de creatinina, calculadas a partir do peso vivo, pelas concentrações 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 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. As concentrações de alantoína na urina e os de ácido úrico na urina e alantoína do leite foram determinadas pelo método colorimétrico, conforme metodologia de Fujihara et al. (1987)² apud Chen e Gomes (1992, p. 15)

A excreção total de derivados de purinas (DP) foi calculada pela soma do ácido úrico excretado na urina e da alantoína excretada no leite e na urina, ambos expressos em mmol/dia. As purinas microbianas absorvidas (Pabs, mmol/dia) foram calculadas por meio da equação:

² FUJIHARA, T.; ÆRSKOV, E. R.; REEDS, P. J.; KYLE, D. J. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. **The Journal of Agricultural Science**, v. 109, p. 7-12, 1987.

$P_{abs} = (DP - 0,385 \cdot PV^{0,75}) / 0,84$, em que 0,84 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados purina e $0,385 \cdot PV^{0,75}$, a excreção endógena de derivados de purina (CHEN; GOMES, 1992).

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 (N_{mic} , gN/dia) foi calculada com base nas purinas absorvidas (P_{abs} , mmol/dia), utilizando-se a equação (CHEN; GOMES, 1992): $N_{mic} = (70 \cdot P_{abs}) / (0,83 \cdot 0,134 \cdot 1.000)$, 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.

4.8 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 produto dos coeficientes de digestibilidade da matéria seca observados e dos consumos de energia bruta, de acordo com a energia nos ingredientes da dieta (HAVARTINE; ALLEN, 2006).

O consumo de energia líquida (CELI) foi calculado a partir dos teores de energia líquida nos alimentos e nas sobras, obtidos a partir da equação do NRC (2001), apresentada na seção consumo de matéria seca e nutrientes (1.3). A energia líquida de lactação foi estimada a partir da seguinte equação do NRC (2001): EL_L (Mcal/dia) = produção de leite (kg) $\times$ ($0,0929 \times G\% + 0,0547 \times P\% + 0,0395 \times L\%$), onde: G% é teor de gordura no leite; P% é o teor de proteína do leite e L% é o teor de lactose. A energia líquida de manutenção foi estimada, de acordo com o NRC (2001), como $EL_M = 0,08 \cdot PV^{0,75}$ e o balanço de energia (BE) obtido pela diferença entre o CELI e $EL_L + EL_M$.

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

4.9 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 e 17º dias de cada período experimental, quatro horas após a alimentação matinal, durante micção estimulada por massagem. As alíquotas de 50 mL de urina (amostra *spot*) foram filtradas 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 (Bioclin[®]), utilizando reação enzimática colorimétrica cinética em aparelho SBA-200 CELM[®]. Para a realização dessa análise, 100 µL de urina foram diluídos em 4.900 µL de água deionizada.

O volume urinário total diário de forma similar ao obtido para a síntese de proteína microbiana, 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). 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 foram determinados de acordo com as metodologias descritas pela AOAC (1990). Para as amostras de leite, o teor de nitrogênio foi obtido através do teor de proteína bruta da amostra, determinado com o LACTOSCAN[®], aplicando o fator 6,38 (NRC, 2001).

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

4.10 PARÂMETROS SANGUÍNEOS

As coletas de sangue foram realizadas no 15º dia de cada período experimental por punção da veia e/ou artéria coccígea, anteriormente ao fornecimento das dietas no período da manhã. As amostras foram coletadas em tubos com vácuo (vacutainer) de 10 mL para dosagem séricas de glicose, colesterol total, colesterol-HDL, proteínas totais, albumina, ureia, as enzimas aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamil transferase (GGT).

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

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

4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados que apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise de variância pelo PROC MIXED do (Statistical Analysis System for Windows 9.0 - SAS - SAS Institute Inc., Cary, EUA), de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijklm} = \mu + C_i + O_j + C_i * O_j + P_k + Q_l + A_m(Q_l) + e_{ijklm}$$

Em que: Y_{ijklm} é o valor observado no animal m, pertencente ao quadrado l, no k-ésimo período, no qual recebeu o nível i de quitosana e o j-ésimo nível de óleo de soja; μ = média geral; C_i = efeito fixo de quitosana (1GL); O_j = efeito fixo de óleo de soja (1GL); $C_i * O_j$ = Interação entre os efeitos de quitosana e óleo de soja (1GL); P_k = Efeito fixo de período (3GL); Q_l = efeito fixo de quadrado (5GL); $A_m(Q_l)$ = efeito aleatório de animal dentro do quadrado (18GL) e e_{ijklm} = erro experimental da parcela (76GL).

As médias foram ajustadas pelo LSMEANS e quando houve interação, esta foi desmembrada pela opção SLICE do PROC MIXED. A correção dos graus de liberdade foi feita pelo método de Kenward e Rogers (1997).

As variáveis avaliadas na fermentação ruminal (pH e concentrações de N-NH₃, Acétato, Propionato, Butírate e AGCC) foram analisadas como medidas repetidas no tempo, no PROC MIXED do SAS 9.0, de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijklm} = \mu + C_i + O_j + C_i * O_j + P_k + A_l + e_{ijkl} + T_m + T_m * C_i + T_m * O_j + T_m * C_i * O_j + T_m * P_k + T_m * A_l + e_{ijklm}$$

Em que: Y_{ijklm} é o valor observado no animal l, no m-ésimo tempo do k-ésimo período, no qual recebeu a i-ésimo nível de quitosana e o j-ésimo nível de óleo de soja na dieta; μ = média geral; D_i = efeito fixo de quitosana (1GL); O_j = efeito fixo de óleo de soja (1GL); $C_i * O_j$ = Interação entre os efeitos de quitosana e óleo de soja (1GL); P_k = efeito fixo de período (3GL); A_l = efeito aleatório de animal (3GL) e e_{ijk} = erro experimental da parcela (6GL), obtido pelo efeito da interação animal*dieta*período; T_m = efeito de tempo (6GL); $T_m * C_i$ = interação entre tempo e quitosana (6GL); $T_m * O_j$ = interação entre tempo e óleo (6GL); $T_m * C_i * O_j$ = interação entre os efeitos de tempo, quitosana e óleo (6GL); $T_m * P_k$ = interação entre tempo e período (18GL); $T_m * A_l$ = interação entre tempo e animal (18GL); e_{ijklm} = erro experimental da subparcela (36GL).

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONSUMO E DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL

Os resultados de consumo e digestibilidade aparente total em função das dietas experimentais são apresentados na tabela 4. Para o consumo de MS e MO, FDN, PB e CNF, e os consumos de FDN e MS, relativos ao peso vivo (PV), houve interação ($P < 0,05$) entre os efeitos da inclusão de óleo de soja e de quitosana. Para todas as variáveis citadas acima, como os teores dos nutrientes eram muito próximos nas diferentes dietas experimentais, os resultados são semelhantes aos observados para o consumo de MS, o qual foi analisado na (Figura 1).

Tabela 4 - Consumo e digestibilidade da matéria seca e de nutrientes de vacas da raça Holandesa, no terço médio de lactação, alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja

Variável	Tratamentos ¹				Média	EPM	Probabilidades (P)		
	C	Q	O	QO			Quitosana	Óleo	INT Q*O ²
Consumo (kg/dia)									
Matéria seca	22,55	21,21	19,98	20,06	20,95	0,40	0,020	<0,001	0,009
Matéria orgânica	21,20	19,95	18,80	18,87	19,70	0,38	0,020	<0,001	0,009
Proteína bruta	3,90	3,69	3,40	3,45	3,61	0,07	0,093	<0,001	0,009
FDN	7,82	7,32	6,79	6,83	7,19	0,15	0,027	<0,001	0,010
Extrato Etéreo	0,70	0,67	1,29	1,29	0,98	0,04	0,426	<0,001	0,489
CNF	8,94	8,41	7,44	7,43	8,06	0,16	0,006	<0,001	0,009
NDT	16,54	15,53	15,57	15,53	15,79	0,29	0,009	0,017	0,015
Consumo relativo ao peso (kg/100kg)									
Matéria seca	3,91	3,68	3,46	3,49	3,63	0,07	0,023	<0,001	0,003
FDN	1,35	1,27	1,18	1,19	1,25	0,02	0,017	<0,001	0,004
Coeficientes de digestibilidade aparente total (g/kg)									
Matéria seca	724,9	740,2	727,4	750,1	735,6	3,7	0,003	0,326	0,558
Matéria orgânica	736,2	748,5	736,6	759,4	745,2	3,9	0,010	0,394	0,425
FDN	600,6	598,9	584,4	602,8	596,7	5,3	0,341	0,479	0,253
Proteína Bruta	741,6	767,0	754,5	782,0	761,3	4,2	<0,001	0,055	0,881
Extrato etéreo	851,0	841,5	891,1	897,7	870,3	7,2	0,889	<0,001	0,443

¹C: Controle; Q: Quitosana; O: Óleo de Soja; QO: Quitosana e Óleo de Soja. ²Efeito da interação Quitosana*óleo de soja; *Médias ajustadas pelo LSMEANS do PROC MIXED do SAS 9.0.

Nas dietas sem a inclusão de óleo de soja, o uso da quitosana levou a redução do consumo de matéria seca e de nutrientes ($P < 0,05$). No entanto, com a suplementação de óleo, a quitosana não influenciou o consumo. Estes resultados observados ($P < 0,05$) de redução de CMS, CMO e CFDN com a inclusão de quitosana na dieta com baixo extrato etéreo diferem dos resultados apresentados por Araujo (2011) e Mingoti (2013), que não observaram alteração do consumo em função da inclusão de quitosana nas dietas.

Alzhaal et al. (2008) não observaram efeito da inclusão de óleo de soja e monensina sobre o consumo de matéria seca e nutrientes. Duffield et al. (2008b), no entanto, relataram que vacas suplementadas com monensina tem uma redução de 0,3 kg de matéria seca por dia. No presente estudo, a redução média observada com a inclusão de quitosana na ausência de óleo de soja foi de 6,0%, ou seja, 1,34 kg de matéria seca, o que pode estar relacionada melhor eficiência de aproveitamento energético da dieta.

Figura 1- Efeitos da inclusão de quitosana e de óleo de soja nas dietas de vacas da raça Holandesa, no terço médio de lactação sobre a variável consumo de matéria seca

A suplementação com óleo de soja levou a redução do consumo de matéria seca e de nutrientes quando esteve associada ou não a inclusão de quitosana. Segundo o NRC (2001), assumindo que a vaca consome para atender suas exigências energéticas, com a substituição parcial de carboidratos por lipídeos, têm-se adensamento energético da dieta e o animal passa a consumir menos para obter a mesma quantidade de energia. Os lipídeos podem ainda inibir a fermentação ruminal e a digestibilidade de fibra (PALMQUIST; JENKINS, 1980), aumentando o enchimento ruminal e reduzindo a taxa de passagem. Porém, este efeito de redução da digestibilidade da fibra não foi observado no presente trabalho.

O NRC (2001) cita que o perfil dos ácidos graxos da fonte de lipídeos usada na suplementação é importante na depressão do consumo. Vários estudos têm relatado efeito maior das fontes insaturadas, como o óleo de soja, em deprimir consumo de matéria seca que fontes saturadas. Smith et al. (1993) afirmaram ainda que quando a silagem de milho é utilizada como volumoso, em relação ao uso do feno de alfafa, tem-se efeito mais pronunciado da inibição do consumo de matéria seca, fermentação ruminal e digestibilidade da FDN, quando lipídeos são utilizados na alimentação.

Segundo o NRC (2001), o adensamento das dietas e a consequente melhoria do status energético dos animais só é efetivo quando a depressão do consumo associado a esta suplementação não é capaz de resultar em redução do consumo de energia. No presente trabalho, houve interação entre os efeitos da inclusão de óleo de soja e de quitosana sobre o consumo de NDT. A inclusão de quitosana resultou em redução do consumo apenas quando realizada na dieta sem a suplementação de óleo de soja ($P<0,05$).

Com a suplementação de óleo, observou-se aumento no consumo e na digestibilidade do extrato etéreo ($P<0,05$), resultado esperado em função do seu teor na dieta (Tabela 3). A concentração de lipídeos na dieta pode influenciar a digestibilidade do extrato etéreo (NRC, 2001). Segundo Wu et al. (1991), com a utilização de até 3% de lipídeos suplementares na dieta tem-se aumento da digestibilidade aparente deste nutriente. Este aumento sugere que o lipídeo suplementar tem digestibilidade maior que os lipídeos da dieta basal e o endógeno. O tamanho da cadeia do ácido graxo utilizado, assim como o grau de insaturação tem correlação positiva com a digestibilidade observada do extrato etéreo (NRC, 2001).

Eifert et al. (2005a) não observaram interação entre os efeitos de óleo e de monensina para as variáveis de consumo. A suplementação com óleo reduziu o consumo de matéria seca, tanto em valores absolutos quanto em valores relativos ao peso, sem influenciar o consumo de NDT. A digestibilidade dos nutrientes também não foi influenciada pelos tratamentos. Apenas a digestibilidade do extrato etéreo foi elevada com a utilização do óleo, assim como no presente trabalho.

Foi observado na digestibilidade efeito da quitosana, com menor influência da inclusão de óleo. Independentemente da inclusão de óleo, a quitosana aumentou ($P<0,05$) a digestibilidade da MS, MO e PB.

Estes resultados são muito semelhantes aos observados por Araújo (2011) e Mingoti (2013), sendo relatado por este último efeito quadrático das doses crescentes de quitosana sobre os coeficientes de digestibilidade da MS, MO e FDN. As médias observadas foram de 672,2 e 692,5; 679,9 e 700,6; 564,4 e 588,4 g/kg para a inclusão de 0 e 150 mg de quitosana

por quilograma de peso vivo, respectivamente. Araújo (2011) observou resposta linear às crescentes doses de quitosana nos coeficientes de digestibilidade da MS, MO, PB e FDN. As médias foram de 646,6 e 690,1; 666,6 e 707,2; 631,2 e 675,1; 566,2 e 605,9 g/kg para suplementação de 0 e 150 mg de quitosana por quilograma de PV, respectivamente.

O efeito positivo da quitosana sobre a digestibilidade aparente da matéria seca e nutrientes é, sem dúvida, um dos principais fatores que justificariam o seu uso como aditivo na alimentação de ruminantes. O aumento da digestibilidade ajuda a justificar a melhoria da eficiência de conversão da matéria seca consumida em leite observada para a dieta sem a inclusão de óleo de soja. O aumento da digestibilidade pela inclusão de quitosana nas dietas com óleo de soja, sem alteração no consumo, a princípio indicam maior absorção de nutrientes, a qual não se refletiu em desempenho produtivo (Tabela 10), em virtude da menor eficiência, provavelmente decorrente de alteração no metabolismo intermediário de nutrientes.

As diferenças no metabolismo intermediário podem estar associadas a alterações do metabolismo de minerais uma vez que estes são fundamentais na síntese de metaloenzimas, diretamente envolvidas no metabolismo animal. O NRC (2001) cita provável redução da digestibilidade de minerais, especialmente Ca, Mg e outros cátions com a suplementação de lipídeos na dieta de vacas em lactação pela formação de sais de ácidos graxos no rúmen e intestinos. Segundo Kurita (1998) a quitosana também tem alta capacidade quelante com vários íons metálicos, em condições ácidas, (incluindo Zn, Ni, Fe, Mg e Cu) sendo inclusive, utilizado por algumas indústrias para removê-los de algumas misturas. Kong et al. (2010) sugerem que esta capacidade quelante da quitosana pode ser a principal responsável pelo seu mecanismo de ação. A inclusão conjunta pode potencializar os efeitos negativos da carência de alguns minerais, comprometendo a eficiência de utilização dos nutrientes absorvidos.

Benediktsdóttir et al. (2014), em estudos *in vitro*, citaram que a quitosana pode atuar como facilitador da permeabilidade de epitélios, especialmente quando solúvel em água. Isso ocorre quando o pH do meio é menor que o pKa da quitosana, que é de 6,6, e seu grupamento amino está protonado. Os autores não esclarecem qual o possível mecanismo de ação e não se sabe ao certo se a quitosana atua por mecanismo transcelulares, paracelulares ou ambos. Esta característica tem sido explorada pela indústria farmacêutica, com o objetivo de aumentar a absorção de algumas drogas, quando utilizadas por via oral. O aumento da digestibilidade dos nutrientes, sem alteração da digestibilidade da fibra, observado no presente trabalho, sugere que este pode ser o mecanismo pelo qual a quitosana alterou os coeficientes de digestibilidade aparentes totais nos animais que a receberam na dieta.

Historicamente a quitosana foi utilizada com o objetivo de reduzir a digestibilidade, especialmente dos lipídeos da dieta, reduzindo os níveis de colesterol séricos em ratos, humanos e inclusive em aves (HIRANO et al., 1990). Huang et al. (2005), no entanto, relatam aumento da digestibilidade ileal de nutrientes em frangos de corte, e a associam a melhoria de desempenho. Estes autores citam ainda que a quitosana pode modular a função imune e que os resultados observados são em grande parte dependentes do tamanho da molécula, o qual tem relação direta com o mecanismo de ação.

As diferentes respostas observadas para a inclusão de quitosana na dieta de ruminantes podem estar relacionada às condições do ambiente intestinal. Segundo González et al. (2000), o pâncreas dos bovinos, diferentemente do pâncreas dos monogástricos, tem capacidade limitada de secretar bicarbonato, tornando o pH duodenal ácido (entre 3 e 5). Estas diferenças fisiológicas explicam parcialmente a variabilidade interespecífica das respostas em digestibilidade aparente com a inclusão de quitosana na dieta. O aumento da secreção de bile para a digestão dos lipídeos, associado à redução da taxa de passagem, em consequência da redução consumo, nas dietas suplementadas com óleo de soja também pode ser uma dos pontos chaves para explicar a redução da eficiência da utilização de quitosana nestas dietas.

5.2 PARÂMETROS SANGUÍNEOS

A glicemia das vacas não foi influenciada pelas dietas experimentais ($P>0,05$) (Tabela 5). Araújo (2011), no entanto, observou aumento linear na glicemia dos animais alimentados com doses crescentes de quitosana. As médias foram de 54,37 e 67,25 mg/dL para as dietas com 0 e 150 mg de quitosana por quilograma de peso vivo, respectivamente. Este mesmo autor não observou qualquer efeito das dietas sobre a concentração de colesterol total circulante. Garcia-Rodrigues et al. (2011) observaram aumento de 6,5% da glicemia de ovelhas lactantes suplementadas com quitosana.

Houve efeito aditivo da inclusão de óleo de soja e de quitosana para a concentração de colesterol plasmático, sugerindo que ambos os fatores influenciam positivamente o teor de colesterol. Segundo Duffield et al. (2008a), a inclusão de monensina não tem a capacidade de alterar o perfil lipídico plasmático de vacas em lactação, uma vez que não altera o colesterol total.

O aumento das concentrações de colesterol total e de HDL-colesterol no soro pode ser atribuído ao maior consumo de ácidos graxos nos animais que receberam as dietas suplementadas com óleo de soja. O aumento na concentração sérica de colesterol total das dietas suplementadas com quitosana é resultado inédito. Apesar de não observar efeito, Mingoti (2013) obteve médias de colesterol total (em mg/dL) de 206; 208; 212 e 212 para a inclusão de 0, 50, 100 e 150 mg de quitosana por kg de peso vivo. Araújo (2011) relata tendência a comportamento quadrático com os níveis crescentes de quitosana. As médias observadas para os tratamentos com 50, 100 e 150 mg de quitosana por kg de peso vivo foram 190, 216 e 221, respectivamente. É importante lembrar que em nenhum destes trabalhos foi observado efeito da inclusão de quitosana sobre o CMS.

Tabela 5- Variáveis sanguíneas de vacas da raça Holandesa no terço médio de lactação alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja

Variável	Tratamentos ¹				Média	EPM	Probabilidades (P)		
	C	Q	O	QO			Quitosana	Óleo	INT Q*O ²
	<i>mg/dL</i>								
Glicose	67,39	67,65	68,88	64,68	67,11	1,545	0,497	0,797	0,441
Colesterol	146,87	170,05	214,31	224,93	189,51	7,794	0,012	<0,001	0,341
C-HDL ³	57,41	57,68	63,61	65,22	60,98	1,563	0,679	0,003	0,767
Ureia	32,95	41,79	38,11	35,88	37,23	0,859	0,004	0,734	<0,001
	<i>g/L</i>								
Proteínas totais	8,35	8,90	8,74	8,80	8,69	0,130	0,251	0,591	0,351
Albumina	3,80	3,89	3,74	3,84	3,82	0,038	0,191	0,442	0,921
	<i>U/L</i>								
AST ⁴	59,06	57,20	66,95	64,89	61,69	1,959	0,506	0,010	0,972
GGT ⁵	35,90	37,70	37,31	38,69	37,19	1,003	0,191	0,320	0,863

¹C: Controle; Q: Quitosana; O: Óleo de Soja; QO: Quitosana e Óleo de Soja. ²Efeito da interação Quitosana*óleo de soja; ³Colesterol - lipoproteína de alta densidade; ⁴Aspartato aminotransferase; ⁵Gama glutamil transferase; *Médias ajustadas pelo LSMEANS do PROC MIXED do SAS 9.0.

A inclusão de quitosana, no entanto, não foi capaz de alterar a concentração de colesterol de alta densidade (HDL). A proteína total e a albumina séricas não foram influenciadas pelos tratamentos. Para a ureia sérica, no entanto, houve interação entre a inclusão de quitosana e óleo (Figura 2).

Os dados apresentados na figura 2 mostram que a inclusão de quitosana na ausência de óleo aumenta significativamente os teores de ureia plasmática, da mesma forma que Duffield et al. (2008a) observou para a inclusão de monensina na dieta de vacas em lactação.

Quando a inclusão de quitosana está associada a suplementação de óleo de soja, no entanto, a ureia plasmática não se altera ($P>0,05$). Quando se analisa o efeito de óleo, a diferença na resposta é ainda mais clara. Enquanto que na ausência de quitosana o óleo aumenta ($P<0,05$) a concentração plasmática de ureia, na presença, há redução dos níveis no sangue. Esta diferença pode estar associada à capacidade do óleo de soja de modificar a condição do ambiente ruminal, evitando que a quitosana se complexe com os aminoácidos.

Figura 2 - Efeitos da inclusão de quitosana e de óleo de soja nas dietas de vacas da raça Holandesa, no terço médio de lactação sobre a concentração plasmática de ureia

Com relação à dosagem das enzimas hepáticas, pode-se dizer que a suplementação com óleo de soja influenciou positivamente na atividade da enzima aspartato aminotransferase (AST). A enzima GGT, no entanto, não foi influenciada pelos tratamentos. Lassen (2007) relatou que a AST, assim como a sorbitol desidratase (SDH) e a glutamato desidrogenase (GLDH), tem sido utilizadas para identificar lesão hepática em ruminantes. Apesar de SDH e GLDH serem mais específicas para este propósito, as dificuldades laboratoriais fazem com que a enzima de escolha tenha sido a AST.

Como a atividade enzimática de AST responde tanto a lesão hepática quanto muscular, a avaliação de enzima músculo específica fez-se necessária para tentar identificar a presença de lesão hepática. O aumento da atividade de AST ($P<0,05$) para as dietas com óleo de soja, sem alteração na atividade de GGT ($P>0,05$), apesar dos valores encontrarem-se dentro dos valores de referência estabelecidos por Lassen (2007), estão relacionados aos maiores níveis de colesterol e de lipídeos circulantes observados nos animais alimentados com estas dietas, que podem ter relação com alteração da função hepática.

Os resultados observados para AST e GGT em função da inclusão de quitosana, independentemente da suplementação com óleo de soja reforçam a atoxicidade do aditivo e

demonstram segurança para sua utilização, assim como observaram Araújo (2011) e Mingoti (2013).

5.3 BALANÇO DE ENERGIA

Na tabela 6 são apresentados os resultados do balanço de energia em função das dietas experimentais. Para o consumo de energia, em todas as suas frações, observou-se efeito semelhante ao observado para o CMS. O consumo na dieta controle diferiu estatisticamente ($P < 0,05$) das dietas quitosana e também da dieta óleo e estas não diferiram ($P > 0,05$) da dieta quitosana e óleo.

Tabela 6 - Balanço de energia de vacas da raça Holandesa, no terço médio de lactação, alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja

Variável	Tratamentos ¹				Média	EPM	Probabilidades (P)		
	C	Q	O	QO			Quitosana	Óleo	INT. Q*O ²
Consumo (Mcal/dia)									
Energia Bruta	95,49	89,84	88,15	88,48	90,49	1,715	0,023	<0,001	0,011
Energia Digestível	69,12	66,51	63,97	66,17	66,44	1,233	0,813	0,002	0,007
Energia Metabolizável	57,37	55,21	53,10	54,92	55,15	1,023	0,813	0,002	0,007
Energia Líquida	37,90	35,58	35,30	35,21	36,00	0,672	0,008	0,001	0,014
Balanço (Mcal/dia)									
Energia Líquida	5,33	2,97	4,80	5,20	4,57	0,604	0,0734	0,122	0,013
Exigências de energia líquida (Mcal/dia)									
Lactação	23,09	23,13	21,04	20,59	21,96	0,418	0,638	<0,001	0,583
Mantença	9,47	9,47	9,45	9,43	9,46	0,091	0,768	0,289	0,661
Eficiências (Mcal/Mcal)									
EL _L /CED ³	0,34	0,36	0,34	0,32	0,34	0,007	0,753	0,008	0,004
EL _L +EL _M /CED ⁴	0,48	0,50	0,49	0,46	0,48	0,009	0,766	0,108	0,001

¹C: Controle; Q: Quitosana; O: Óleo de Soja; QO: Quitosana e Óleo de Soja. ²Efeito da interação Quitosana*óleo de soja; ³Exigência de energia líquida de lactação pelo consumo de energia digestível. ⁴Energia líquida de lactação e de manutenção pelo consumo de energia digestível; *Médias ajustadas pelo LSMEANS do SAS 9.0.

A energia líquida utilizada para a lactação foi menor nas dietas suplementadas com óleo de soja, à semelhança do que ocorreu com a produção de leite corrigida para gordura.

Esta redução é consequência da redução do teor de gordura no leite observada nas dietas contendo óleo e é semelhante ao resultado obtido por Eifert et al. (2005b).

Segundo Von Soosten et al. (2012), a síntese de gordura do leite representa grande proporção da exigência de energia de uma vaca leiteira especializada. Esta pode representar até 50% das exigências energéticas de uma vaca de alta produção e promover uma depressão desta síntese, a partir da utilização de isômeros do ácido linoleico conjugado pode ser estratégia interessante para promover o balanço energético positivo.

Araújo (2011) e Mingoti (2013) não observaram qualquer efeito da quitosana sobre as variáveis relacionadas ao balanço energético em bovinos de leite e corte, respectivamente.

Gandra et al. (2010) avaliaram diferentes teores de utilização de monensina sódica na dieta de vacas no terço médio de lactação e observaram redução linear do consumo de energia. Apesar de não observar qualquer alteração de peso corporal, os autores observaram ganho de eficiência, medida pela relação entre a energia líquida de lactação e o consumo de energia digestível. No presente trabalho, a eficiência de conversão de energia consumida em energia no leite foi aumentada pela ação da quitosana na dieta sem suplementação de óleo de soja ($P < 0,05$) e reduzida quando realizada em dieta que continham óleo de soja (Figura 3).

Figura 3 - Efeitos da inclusão de quitosana e de óleo de soja nas dietas de vacas da raça Holandesa, no terço médio de lactação sobre eficiência de uso da energia, obtida pela relação entre EL_L e CED

Eifert et al. (2005b) também observaram que a suplementação com óleo de soja reduziu a secreção de energia no leite, contribuindo para a melhoria do balanço energético e com isso as vacas recebendo óleo de soja ganharam mais peso que as vacas não suplementadas.

5.4 BALANÇO DE NITROGÊNIO

O consumo de nitrogênio total foi inibido pela inclusão de quitosana na dieta sem a suplementação de óleo de soja ($P<0,05$). Na dieta que continha óleo, o consumo de nitrogênio não foi influenciado pela quitosana.

Tabela 7- Balanço de Nitrogênio de vacas da raça Holandesa, no terço médio de lactação, alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja

Variável	Tratamentos ¹				Média	EPM	Probabilidades (P)		
	C	Q	O	QO			Quitosana	Óleo	INT.Q*O ²
<i>Consumo (g/dia)</i>									
Nitrogênio total	623,42	590,10	544,60	552,04	577,54	11,559	0,093	<0,001	0,009
<i>Excreção de N (g/dia)</i>									
Urinário	204,51	206,01	188,42	205,33	201,07	6,385	0,310	0,355	0,395
Fecal	161,93	137,18	133,52	121,56	138,55	3,983	<0,001	<0,001	0,183
Leite	157,75	159,86	158,68	150,44	156,68	2,821	0,236	0,102	0,047
<i>Balanço (g/dia)</i>									
Nitrogênio	99,22	87,06	63,98	74,71	81,24	8,859	0,943	0,021	0,257
<i>Excreção (% Nitrogênio total consumido)</i>									
Urinário	33,42	35,52	36,05	38,29	35,82	1,309	0,197	0,110	0,966
Fecal	25,84	23,30	24,55	21,80	23,87	0,423	<0,001	0,055	0,882
Leite	25,51	27,72	29,99	27,69	27,73	0,547	0,936	<0,001	<0,001
<i>Balanço (% Nitrogênio total consumido)</i>									
Nitrogênio	15,24	13,46	9,41	12,22	12,58	1,469	0,791	0,071	0,238

¹C: Controle; Q: Quitosana; O: Óleo de Soja; QO: Quitosana e Óleo de Soja. ²Efeito da interação Quitosana*óleo de soja.*Médias ajustadas pelo LSMEANS do SAS 9.0.

A excreção urinária de nitrogênio não foi influenciada pelos tratamentos. A excreção fecal, no entanto, respondeu de forma aditiva a inclusão do óleo e da quitosana. Tanto o óleo de soja quanto a quitosana reduziram ($P<0,05$) a excreção de nitrogênio nas fezes. Este efeitos estão relacionado à redução do consumo na dieta contendo óleo e a melhoria da digestibilidade das dietas contendo quitosana. A excreção fecal em relação ao consumo de nitrogênio não foi influenciada pela inclusão de óleo, reforçando que o menor volume excretado tem relação direta com o consumo.

A secreção de nitrogênio no leite, assim como a produção de leite e a produção de proteína no leite não foram influenciadas pela inclusão de quitosana nas dietas sem óleo e foram reduzida pelas inclusão de quitosana nas dietas contendo óleo de soja (Figura 11).

A secreção de nitrogênio no leite em relação ao nitrogênio total consumido, que é um dos indicadores de eficiência de utilização do nitrogênio foi influenciada por ambos os fatores avaliados, de forma dependente ($P < 0,05$). Na dieta sem suplementação de óleo, a quitosana aumentou a secreção via leite e, na dieta com óleo, a quitosana reduziu a excreção via leite, indicando alteração da eficiência, em resposta à quitosana, em função da inclusão da inclusão de óleo de soja na dieta.

Figura 4 - Efeitos da inclusão de quitosana e de óleo de soja nas dietas de vacas da raça Holandesa, no terço médio de lactação sobre a secreção de nitrogênio no leite em relação ao nitrogênio total consumido

5.5 SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA

Na tabela 8 são apresentados os resultados dos parâmetros da síntese de proteína microbiana. As únicas diferenças observadas foram para a suplementação de óleo de soja. Os animais suplementados com óleo, independentemente da inclusão de quitosana, tiveram maior excreção total de urina. Com isso, foi observada redução ($P < 0,05$) da concentração de ácido úrico e de alantoína na urina excretada. Apesar de estar dentro dos valores de referência, a excreção total de ácido úrico foi maior nas dietas sem a inclusão de óleo, o que refletiu em menor proporção de alantoína nas purinas totais nos animais nestas dietas.

Tabela 8 - Síntese de proteína microbiana de vacas da raça Holandesa, no terço médio de lactação, alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja

Variável	Tratamentos ¹				Média	EPM	Probabilidades (P)		
	C	Q	O	QO			Quitosana	Óleo	INT. Q*O ²
<i>L/dia</i>									
ETU ³	19,049	19,563	24,547	23,607	21,526	1,022	0,849	<0,001	0,518
Rel. Alant / Creat	2,162	2,213	2,285	2,275	2,234	0,070	0,846	0,388	0,772
<i>Mmol/L</i>									
Ácido Úrico	2,221	2,257	1,542	1,733	1,924	0,083	0,386	<0,001	0,553
Alantoína urina	19,535	18,918	15,820	17,666	17,936	0,710	0,548	0,018	0,232
Alantoína leite	0,062	0,061	0,070	0,060	0,063	0,003	0,128	0,301	0,203
<i>Mmol/dia</i>									
Ácido Úrico	37,659	40,228	33,653	34,968	36,605	1,269	0,373	0,036	0,773
Alantoína urina	334,410	349,580	363,510	362,330	352,460	12,249	0,693	0,240	0,644
Alantoína leite	2,029	2,033	2,290	1,869	2,055	0,111	0,119	0,715	0,112
Purinas totais	378,330	395,340	399,450	399,170	393,072	12,832	0,645	0,492	0,634
Purinas abs ⁴	391,510	411,490	416,430	416,190	408,905	14,969	0,644	0,488	0,636
<i>Porcentagem dos derivados purina</i>									
Alantoína	89,827	89,266	91,133	90,993	90,324	0,305	0,553	0,012	0,722
<i>g/dia</i>									
N microbiano	284,640	299,170	302,770	302,590	297,293	10,883	0,644	0,488	0,636
PB microbina	1779,010	1869,810	1892,290	1891,200	1858,080	68,019	0,644	0,488	0,636
<i>gPMic/gNDT</i>									
Eficiência	110,080	122,090	123,900	123,250	119,832	4,410	0,373	0,241	0,321

¹C: Controle; Q: Quitosana; O: Óleo de Soja; QO: Quitosana e Óleo de Soja. ²Efeito da interação Quitosana*óleo de soja; ³Excreção total de urina; ⁴Purinas absorvidas; *Médias ajustadas pelo LSMEANS do PROC MIXED do SAS 9.0.

A síntese de proteína microbiana tanto em valores absolutos (g) quanto em valor relativos ao consumo de NDT (g/kg), assim como a relação alantoína:creatinina, não foi influenciada pelos tratamentos (P>0,05). A eficiência de síntese de 119,83 g/ kg de NDT está de acordo com os valores de referência estabelecidos pelo NRC (2001). Fiorentini et al. (2013), no entanto, sugerem que a suplementação com grão de soja cru e integral ou com óleo de soja melhora a eficiência na síntese de proteína microbiana, quando em comparação com a suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos. Os autores associam este aumento da eficiência a inibição do crescimento de fungos e protozoários, os quais são menos eficientes.

Dewhurst et al. (2000) citaram que a suplementação com lipídeos, apesar destes não serem utilizados como fonte de energia para o crescimento microbiano, podem inibir o crescimento de certos microrganismos, reduzindo os custos de manutenção e aumentando a eficiência de crescimento microbiano. Dewhurst e Webster (1992) relataram redução da eficiência do crescimento microbiano quando da inclusão de antibióticos ionóforos. Segundo estes autores, esta redução estaria relacionada a maior energia despendida pelos microrganismos nos mecanismos fisiológicos buscando reestabelecer o potencial de membrana comprometido pelo uso do aditivo. Segundo Guan et al. (2006), no entanto, os ionóforos tem eficiência transitória, no início do fornecimento em inibir o crescimento de protozoários, o que pode tornar o processo fermentativo mais eficiente e aumentar a síntese de proteína microbiana.

5.6 FERMENTAÇÃO RUMINAL

Foi observada interação entre os efeitos de quitosana, óleo de soja e o tempo de avaliação para as variáveis pH e N-NH₃ ($P<0,05$).

Além do efeito de tempo, o pH diferiu entre as dietas óleo e controle, apenas no tempo oito horas após a alimentação, provavelmente em decorrência do maior consumo, especialmente de CNF, que levaram ao menor pH na dieta controle, logo após a segunda alimentação do dia (Figura 9).

Na Figura 10 foram estudados os efeitos da interação tripla sobre o N-NH₃ ruminal. Observa-se que a suplementação com óleo reduziu a concentração de N-NH₃ ruminal nos tempos quatro e seis horas após a alimentação nos animais que receberam dieta sem quitosana. A dieta quitosana e óleo também reduziu a concentração de N-NH₃ seis horas após a alimentação, em relação a dieta quitosana.

Goiri et al. (2010a) demonstraram que a concentração de N-NH₃ no líquido ruminal é reduzida pela inclusão de quitosana, da mesma forma que com a inclusão de monensina. As concentrações de N-NH₃ no líquido ruminal de ovelhas em lactação reduziram de 41,7 para 35,2 mg/dL com a inclusão de quitosana na dieta (GOIRI et al., 2010a).

Não se observou interação entre os fatores avaliados e o tempo para AGCC, a relação acetato:propionato e produção de acetato e propionato, em valores absolutos ou relativos a produção total de AGCC. Para estas variáveis, houve efeito do tempo independente das dietas.

A inclusão de óleo de soja nas dietas aumentou a concentração de propionato (Figura 6) e reduziu a concentração de acetato (Figura 5), em mmol/L e em proporção da concentração total de AGCC ($P<0,05$). Assim, a relação acetato:propionato foi reduzida com a inclusão de óleo de soja nas dietas (Tabela 9). A quitosana foi capaz apenas de reduzir a concentração de butirato, em alguns tempos, não influenciando nas demais variáveis estudadas (Figura 7).

Tabela 9 - Fermentação ruminal de vacas da raça Holandesa, no terço médio de lactação, alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja

Variáveis	Tratamentos				Média	EPM	Probabilidades (P)			
	C ¹	Q ²	O ³	QO ⁴			Quitosana	Óleo	Tempo	INT. Q*O ²
pH	6,34	6,46	6,43	6,48	6,43	0,048	0,353	0,580	<0,001	0,632
	<i>mg/dL</i>									
N-NH ₃	33,91	33,60	28,12	31,75	31,84	1,167	0,386	0,244	<0,001	0,443
	<i>AGCC (mmol/100mmol)</i>									
Acético (C2)	65,98	66,10	61,95	64,08	64,53	0,378	0,136	0,004	<0,001	0,235
Propiônico (C3)	21,09	21,51	24,83	24,02	22,86	0,327	0,564	0,001	0,005	0,545
Butírico (C4)	12,93	12,38	13,22	11,90	12,61	0,190	0,201	0,897	<0,001	0,522
	<i>AGCC (mmol/L)</i>									
Acético (C2)	85,24	80,87	73,65	72,98	78,19	1,523	0,182	0,002	<0,001	0,271
Propiônico (C3)	27,25	26,77	30,36	27,95	28,08	0,800	0,059	0,044	<0,001	0,672
Butírico (C4)	16,94	15,26	16,17	14,02	15,60	0,453	0,010	0,196	<0,001	0,922
C2:C3	3,17	3,13	2,56	2,74	2,90	0,053	0,395	0,001	<0,001	0,365
AGCC	129,43	122,91	120,18	114,96	121,87	2,545	0,111	0,061	<0,001	0,383

¹C: Controle; Q: Quitosana; O: Óleo de Soja; QO: Quitosana e óleo de soja. ²Efeito da interação quitosana*óleo; * Médias ajustadas pelo LSMEANS do PROC MIXED do SAS 9.0.

Houve redução da produção total de AGCC ($P=0,061$) e redução da relação molar de acetato e propionato ($P<0,05$) com a inclusão de óleo de soja. Como houve interação entre os fatores avaliados para CMS, era de se esperar que estas variáveis refletissem os resultados observados para o consumo. Na dieta sem a suplementação com óleo de soja, a redução da produção de AGCC pode ser associada a redução do consumo. Como não houve redução de consumo com a inclusão de quitosana nas dietas suplementadas com óleo de soja, pode-se supor que a síntese de AGCC por unidade de MO consumida foi inibida, em consequência da inibição da atividade microbiana.

Figura 5 - Concentrações ruminais de acetato em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas da raça Holandesa, alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja

Figura 6 - Concentrações ruminais de propionato em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas da raça Holandesa, alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja

Figura 7 - Concentrações ruminiais de butirato em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas da raça Holandesa, alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja

Dietas: Controle(.....), Quitosana(— •), Oleo de soja (— — —), quitosana e óleo de soja (—);
 Horário de fornecimento da alimentação (↑).

Figura 8 - Concentrações ruminiais de ácidos graxos de cadeia curta em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas da raça Holandesa, alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja

Dietas: Controle(.....), Quitosana(— •), Oleo de soja (— — —), quitosana e óleo de soja (—);
 Horário de fornecimento da alimentação (↑).

Figura 9- pH ruminal em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas da raça Holandesa, alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja

Figura 10 - Concentrações ruminiais de N-NH3 em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas da raça Holandesa, alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja

A redução das concentrações de AGCC nas dietas com inclusão de quitosana podem ser associadas a facilitação do processo de absorção ruminal destes ácidos graxos. Portanto, as concentrações observadas podem não refletir realmente o que ocorreu com a síntese. Pelas propriedades da molécula de quitosana, considerando os conceitos abordados por Benediktsdóttir et al. (2014), este viés estaria muito mais associadas a dietas sem a suplementação de óleo de soja que as dietas suplementadas. Apesar de não observado neste experimento, a suplementação com óleo de soja leva a um aumento do pH ruminal, fato este associado a redução do consumo de matéria seca e especialmente a redução do consumo de carboidratos não fibrosos (NRC, 2001). Maiores valores de pH podem restringir a atuação da quitosana como facilitador de absorção (BENEDIKTSDÓTTIR et al., 2014).

5.7 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

Os dados de produção e composição do leite em função das dietas experimentais estão apresentados na tabela 10. As dietas contendo óleo, independentemente da inclusão de quitosana, reduziram ($P<0,05$) a produção total e os teores de gordura no leite, reduzindo a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura. Lock e Shinfield (2004) observaram que com o uso de ácidos graxos insaturados na dieta de vacas leiteiras tem-se redução do consumo, com redução da produção, o que está relacionado as alterações da função ruminal (JENKINS, 1993). No presente trabalho foi observada redução do consumo na dieta sem quitosana e apenas nas dietas contendo quitosana houve redução da produção de leite.

Diferentemente de AlZahal et al. (2008), que observaram interação entre a suplementação com óleo de soja e monensina sobre o teor de gordura no leite, no presente estudo, não foi observada interação entre os efeitos de óleo e do aditivo testado sobre esta variável, apesar das reduções de 3,7 e 6,3 g/kg, nas dietas com e sem quitosana, respectivamente, esta não foi capaz de inibir ($P>0,05$) a depressão da síntese de gordura do leite quando da suplementação de óleo de soja. Houve redução média de 5,0 g/kg no teor de gordura com a suplementação de óleo, independentemente do uso da quitosana. Estes resultados indicam que o aumento do fornecimento de óleo de soja é mais efetivo em alterar o processo de biohidrogenação ruminal de ácidos graxos e consequentemente a composição do leite que a inclusão de quitosana.

Tabela 10 - Produção e composição do leite de vacas da raça Holandesa, no terço médio de lactação, alimentadas com dietas contendo quitosana e/ou óleo de soja

Variável	Un.	Tratamentos ¹				Média	EPM	Probabilidades (P)		
		C	Q	O	QO			Quitosana	Óleo	Int Q*O ²
Produção de leite	(kg)	32,85	33,57	32,86	31,26	32,63	0,548	0,386	0,024	0,023
PLC ³	(kg)	34,48	34,72	30,90	30,42	32,63	0,636	0,866	<0,001	0,606
Gordura	(g/kg)	38,0	37,2	31,7	33,5	35,1	0,770	0,607	<0,001	0,198
	(kg)	1,25	1,24	1,03	1,04	1,14	0,030	0,936	<0,001	0,789
Proteína	(g/kg)	30,5	30,4	30,9	30,7	30,6	0,150	0,316	0,092	0,872
	(kg)	1,00	1,02	1,01	0,96	1,00	0,018	0,228	0,099	0,030
Lactose	(g/kg)	45,6	45,4	46,2	46,1	45,9	0,200	0,393	<0,001	0,765
	kg)	1,50	1,53	1,52	1,43	1,50	0,027	0,270	0,089	0,033
Eficiência ⁴	(kg/kg)	1,48	1,62	1,68	1,59	1,59	0,031	0,365	0,002	<0,001

¹C: Controle; Q: Quitosana; O: Óleo de Soja; QO: Quitosana e óleo de soja ²Efeito da interação Quitosana*óleo de soja; ³Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura; ⁴Produção de leite por kg de MS consumido; *Médias ajustadas pelo LSMEANS do PROC MIXED do SAS 9.0.

Esta depressão da síntese de gordura no leite pode ser atribuída, entre outros, aos fatores alimentares. Destes, os principais são a alteração na concentração ruminal de ácidos graxos de cadeia curta e a produção de intermediários do processo de biohidrogenação, como o ácido linoleico conjugado (CLA) e CLA *trans* 10 *cis*12, que é considerado potente inibidor da síntese de gordura no leite (PALMQUIST; BEAULIEU, 1993; BAUMGARD et al., 2002), especialmente em dietas suplementadas com óleo livre. AlZahal et al. (2008) associaram a interação observada em seu trabalho, para os teores de gordura, à capacidade da monensina de alterar o perfil de ácidos graxos de cadeia curta no rúmen e inibir parcialmente o processo de biohidrogenação. Assim, o teor de gordura no leite está diretamente relacionado com as concentrações ruminais de CLA *trans* 10 *cis* 12.

Tanto os teores de proteína quanto os teores de gordura no leite obtidos dos animais submetidos as diferentes dietas experimentais estão coerentes com o preconizado pelo NRC (2001), de acordo com as diferenças observadas para a produção de AGCC, no rúmen. A suplementação de óleo de soja influenciou mais a fermentação ruminal que a inclusão de quitosana, reduzindo a relação acetato:propionato e o teor de gordura no leite. Com exceção da concentração ruminal de butirato, a quitosana não alterou significativamente nem a fermentação ruminal, nem a composição do leite.

A produção de leite em função da inclusão de quitosana foi dependente da suplementação de óleo (P<0,05). Os desdobramentos dos efeitos dos fatores avaliados, para

esta variável, estão apresentados na figura 11. Para a produção de proteína e de lactose, observou-se interação significativa e semelhante ao citado anteriormente entre os efeitos de quitosana e do óleo de soja para a produção de leite, uma vez que a concentração destes no leite não foi influenciada pelos tratamentos. Nas dietas sem a inclusão de óleo de soja, a inclusão de quitosana não alterou a produção de leite, proteína e lactose, enquanto que com a inclusão nas dietas que continham óleo de soja houve redução da produção destes componentes (Figura 11).

Figura 11 - Efeitos da inclusão de quitosana e de óleo de soja nas dietas de vacas da raça Holandesa, no terço médio de lactação sobre a produção de leite

De maneira semelhante ao observado neste estudo, Johnson (1988), trabalhando com vacas das raças Jersey e Holandesa, com produção em torno de 20 kg/dia, suplementadas com óleo de amendoim e lasalocida, relatou também interação negativa entre os efeitos do óleo e do aditivo tanto para o consumo de matéria seca quanto para a produção de leite.

Apesar de o NRC (2001) sugerir que, com a suplementação de lipídeos, tem-se redução do teor de proteína no leite, no presente estudo, os teor de proteína no leite foi em média de 3,06% e não foram influenciados pelos tratamentos.

Figura 12 - Efeitos da inclusão de quitosana e de óleo de soja nas dietas de vacas da raça Holandesa, no terço médio de lactação sobre a eficiência produtiva, obtida pela razão entre a produção de leite e o consumo de matéria seca

Nas dietas sem óleo, houve redução do consumo de matéria seca, sem alteração da produção de leite. Assim, houve ganho na eficiência de conversão de MS consumido em kg de leite produzido ($P < 0,05$) (Figura 12). Este resultado, segundo Goiri et al. (2010a), justifica-se pelos efeitos ruminais promovidos pela quitosana. O aumento da eficiência observado contrasta com os resultados de Mingoti (2013). Este autor, trabalhando com vacas com produção média de 30 kg e avaliando diferentes doses de quitosana, não observou qualquer efeito sobre o consumo e a produção de leite, apesar de ter observado aumento linear da digestibilidade aparente total da matéria seca.

Duffield et al. (2008b), em estudo metanalítico, considerando os resultados de 77 trabalhos, observaram que a inclusão de monensina na dieta 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%.

Quando a inclusão de quitosana ocorreu nas dietas contendo óleo de soja, no entanto, não houve alteração do consumo e a produção de leite foi reduzida ($P < 0,05$) em 1,6 kg, comprometendo a eficiência produtiva.

6 CONCLUSÕES

A utilização de quitosana em dietas com baixos níveis de extrato etéreo é estratégia eficiente para aumentar a eficiência de produção de vacas leiteiras no terço médio de lactação. Apesar de os efeitos ruminais da inclusão de quitosana não serem tão evidentes neste estudo, foi observada melhoria na digestibilidade das dietas, e apesar da redução do consumo, não alterou o desempenho produtivo, melhorando a eficiência de produção de leite.

A inclusão de quitosana nas dietas suplementadas com óleo soja não se mostrou eficiente, uma vez que observou-se redução do desempenho produtivo sem influencia sobre o consumo, indicando redução da produção de leite por unidade de matéria seca consumida.

Os motivos pelos quais a resposta à inclusão de quitosana foi modificada pela suplementação de óleo de soja não foram totalmente esclarecidos no presente estudo. Algumas possibilidades são consideradas, no entanto são necessários mais estudos para estabelecer com precisão a relação da quitosana com os diferentes ingredientes das dietas.

REFERÊNCIAS

- ALLAN, C. R.; HARDWIGER, L. A. The fungical effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. **Experimental Micology**, v. 3, p. 285-287, 1979.
- ALZHAAL, O.; ODONGO, N. E.; MUTSVANGWA, T.; OR-RASHID, M. M. DUFFILD, T. F. BAGG, R.; DICK, P.; 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.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15. ed. Arlington: AOAC, 1990. 1298 p.
- ARAÚJO, A. P. **Efeito de diferentes concentrações de quitosana na dieta de novilhos Nelore**. 2011. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.
- BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, v.70, p. 15-29, 2001.
- BENCHAAR, C.; CALSAMIGLIA, S.; CHAVES, A. V.; FRASER, G. R.; COLOMBATTO, D.; MCALLISTER, T. A.; BEAUCHEMIN, K. A. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 209-228, 2008.
- BENEDIKTSDÓTTIR, B. E.; BALDURSSON, O.; MÁSSON, M. Challenges in evaluation of chitosan and trimethylated chitosan (TMC) as mucosal permeation enhancers: From synthesis to in vitro application. **Journal of Controlled Release**, v. 173, p. 18-31, 2014.
- BENJAMIN, S.; SPENER, F. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. **Nutrition and Metabolism**, v. 6, p. 36, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Coordenação de Produtos de Alimentação Animal. Tabela de aditivos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas com uso autorizado na alimentação animal**. 2008. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao/aditivos/aditivos-autorizados>>., Acessado em: 15 dez. 2013.
- CASALI, A. O.; DETMANN, E; VALADARES FILHO, S. C.; PEREIRA, J. C.; HENRIQUES, L. T.; FREITAS, S. G.; PAULINO, M. F. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos *in situ*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 2, p. 335-342, 2008
- 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**. Aberdeen: Rowett Research Institute, 1992. 21 p.
- CHIANG, Y. W.; WANG, T. H.; LEE, W. C. Chitosan coating for the protection of amino acids that were entrapped within hydrogenated fat. **Food Hydrocoll**, v. 23, p. 1057-1061, 2009.
- CHIZZOTTI, M. L. **Avaliação da casca de algodão para novilhos de origem leiteira e determinação da excreção de creatinina e produção de proteína microbiana em novilhas e vacas leiteiras**. 2004. 132 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG., 2004.

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

DEWHURST, R. J.; DAVIES, D. R.; MERRY, R. J. Microbial protein supply from the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v. 85, p. 1-21, 2000.

DEWHURST, R. J.; WEBSTER, A. J. F. A note on the effect of plane nutrition on fraction outflow rates from the rumen and urinary allantoin excretion by wether sheep. **Animal Production**, v. 54, p. 445-448, 1992.

DOREU, M.; CHILLIARD, Y. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. **British Journal of Nutrition**, v. 78, p. 15-35, 1997.

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

DUFFIELD, T. F.; RABIEE, A. R.; LEAN, I. J. A Meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 2. Production effects. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 1347-1360, 2008b.

DURAND, M.; KAWASHIMA, R. Influence of minerals in rumen microbial digestion. In: THIVEND, Y. R. A. P. (Ed.). **Digestive physiology and metabolism in ruminants**. Westport, CN.: AVI Publishing, 1980. p. 375-408.

EIFERT, E. C.; LANA, R. P.; LANNA, D. P. D.; ARCURI, P. B.; LEÃO, M. I.; VALADARES FILHO, S. C.; LEOPOLDINO, W. M.; SILVA, J. H. S. Efeitos do Fornecimento de Monensina e Óleo de Soja na Dieta sobre o Desempenho de Vacas Leiteiras na Fase Inicial da Lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2123-2132, 2005b.

EIFERT, E. C.; LANA, R. P.; LANNA, D. P. D.; LEÃO, M. I.; ARCURI, P. B.; VALADARES FILHO, S. C.; LEOPOLDINO, W. M.; OLIVEIRA, J. H. S., SAMPAIO, C. B. Efeito da combinação de óleo de soja e monensina na dieta sobre o consumo de matéria seca e a digestão em vacas lactantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 1, p. 297-308, 2005a.

EIFERT, E. C.; LANA, R. P.; LANNA, D. P. D.; LEOPOLDINO, W. M.; ARCURI, P. B.; LEÃO, M. I.; COTA, M. R.; VALADARES FILHO, S. C. Perfil de ácidos graxos do leite de vacas alimentadas com óleo de soja e monensina no início da lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 1, p. 219-228, 2006.

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

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

FIORENTINI, G.; MESSANA, J. D.; DIANA, P. H. M.; REIS, R. A.; CANESIN, R. C.; PIRES, A. V. BERCHIELLI, T. T. Digestibility, fermentation and rumen microbiota of crossbred heifers fed diets with different soybean oil availabilities in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v. 181, p. 26-34, 2013.

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

- 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, Zaragoza. **Anais...** Zaragoza: Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario, 2011. p. 222-224.
- GOIRI, I.; GARCIA-RODRIGUEZ, A.; OREGUI, L. M. Effects of chitosans on in vitro rumen digestion and fermentation of maize silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 148, p. 276-287, 2009a.
- GOIRI, I.; OREGUI, L. M.; GARCIA-RODRIGUEZ, A. Dose-response effects of chitosans on in vitro rumen digestion and fermentation of mixtures differing in forage-to-concentrate ratios. **Animal Feed Science and Technology**, v. 151, p. 215-227, 2009b.
- GOIRI, I.; GARCIA-RODRIGUEZ, A.; OREGUI, L. M. Effect of chitosan on mixed ruminal microorganism fermentation using the rumen simulation technique (Rusitec). **Animal Feed Science and Technology**, v. 152, p. 92-102, 2009c.
- GOIRI, I.; INDURAIN, G.; INSAUSTI, K.; SARRIES, V.; GARCIA-RODRIGUEZ, A. Ruminal biohydrogenation of unsaturated fatty acids in vitro as affected by chitosan. **Animal Feed Science and Technology**, v. 159 n. 1-2, p. 35-40, 2010b.
- GOIRI, I.; OREGUI, L. M.; GARCIA-RODRIGUEZ, A. Use of chitosans to modulate ruminal fermentation of a 50:50 forage-to-concentrate diet in sheep. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 2, p. 749-755, 2010a.
- GONZÁLEZ, F. H. D.; BARCELLOS, J. O.; OSPINA, H.; RIBEIRO, L. A. O. **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.
- GONZÁLEZ-ROQUILLO, M.; BALCELLS, J.; GUADA, J. A.; VICENTE, F. Purine derivative excretion in dairy cows: Endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic acid supply. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 4, p. 1282-1291, 2003.
- GUAN, H.; WITTENBERG, K. M.; OMINSKI, K. H.; KRAUSE, D. O. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 1896-1906, 2006.
- GUTKNECHT, J. Proton conductance caused by long-chain fatty acids in phospholipid bilayer membranes. **Journal of Membrane Biology**, v. 106, p. 83, 1988.
- HALL, M. B. **Calculation of non-structural carbohydrate content of feeds that contain non-protein nitrogen**. Florida: University of Florida, 2000. p. A-25. (Bulletin 339, April-2000).
- HARFOOT, C. G.; HAZLEWOOD, G. P. Lipid metabolism in the rumen. In: HOBSON, P. N. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. New York, NY: Elsevier Appl. Sci. Publ. Co., Inc., 1988. 285 p.
- HAROLD, F. M. **The vital force: a study of bioenergetics**. New York, NY: W.H. Freeman and Co., 1986.
- HAVARTINE, 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.
- HE, M.; PERFIELD, K. L.; GREEN, H. B.; ARMENTANO, L. E. Effect of dietary fat blend enriched in oleic or linoleic acid and monensin supplementation on dairy cattle performance, milk fatty acid profiles, and milk fat depression. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 1447-1461, 2012.

- 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. 1214–1217, 1990.
- HUANG, R. L.; YIN, Y. L.; WU, G. Y.; ZHANG, T. J.; LI, L. L.; LI, M. X.; TANG, Z. R.; ZHANG, J.; WANG, B.; HE, J. H.; NIE, X. Z. Effect of dietary oligochitosan supplementation on ileal nutrient digestibility and performance in broilers. **Poultry Science**, v. 84, p. 1383-1388, 2005.
- JENKINS, T. C.; JENNY, B. F. Nutrient digestion and lactation performance of dairy cows fed combinations of prilled fat and canola oil. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 796, 1992.
- JENKINS, T. C. Symposium: advances in ruminant metabolism: lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 3851-3863, 1993.
- KENWARD, M. G.; ROGER, J. H. Small sample inference for fixed effects from restricted maximum likelihood. **Biometrics**, v. 53, p. 983-997, 1997.
- KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 51-63, 2010.
- KURITA, K. Chemistry and application of chitin and chitosan. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 117-120, 1998.
- LASSEN, E. D. Avaliação laboratorial do fígado. In: THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. cap. 23, p. 335-354.
- LOCK, A. L.; SHINGFIELD, K. J. **Optimising milk composition**. In: KEBREAB, E.; MILLS, J.; BEEVER, D. E. (Ed.). **Dairying: using science to meet consumers' needs**. Loughborough, UK: Nottingham University Press; 2004. p. 107-188.
- MARTINELE, I.; EIFERT, E. C.; LANA, R. P.; ARCURI, P. B.; D'AGOSTO, M. Efeito da monensina e do óleo de soja sobre os protozoários ciliados do rúmen e correlação dos protozoários com parâmetros da fermentação ruminal e digestivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 6, p. 1129-1136, 2008.
- MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 85, p. 1217-1240, 2002.
- MINGOTI, R. D. **Desempenho produtivo, digestão e metabolismo em vacas leiteiras alimentadas com diferentes concentrações de quitosana nas dietas**. 2013. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.
- MOSS, A. R.; JOUANY, J. P.; NEWBOLD, J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annales de Zootechnie**, v. 49, p. 231-253, 2000.
- NAGARAJA, T. G.; NEWBOLD, C. J.; VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. London: Blackie Academic and Professional, 1997. p. 523-632.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. rev. ed. Washinton, D.C.: 2001. 381p.

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.

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

PALMQUIST, D. L.; MATTOS, W. R. S. Metabolismo de Lipídeos. In: BERCHIELI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Ed.). **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. p. 287-310.

PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C. Fat in lactation rations: review. **Journal of Dairy Science**, v. 63, p. 1-14, 1980.

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 níveis de proteína**. 2003. 252 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

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

RUSSELL, J. B.; HOULIHAN, A. J. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 1, p. 65-74, 2003.

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

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

SILVESTRE, F. T.; CARVALHO, T. S. S.; CRAWFORD, P. C.; SANTOS, J. E. P.; STAPLES, C. R.; JENKINS, T.; THATCHER, W. W. Effects of differential supplementation of fatty acids during the peripartum and breeding periods of Holstein cows: II Neutrophil fatty acids and function, and acute phase proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 2285-2301, 2011.

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

SMITH, W. A.; HARRIS JR., B.; VAN HORN, H. H.; WILCOX, C. J. Effects of forage type on production of dairy cows supplemented with whole cottonseed, tallow, and yeast. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 205-215, 1993.

SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P. S.; FOX, D. G.; RUSSEL, J. B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3562-3577, 1992.

THORNTON, J. H.; OWENS, F. N. Monensin supplementation and in vivo methane production by steers. **Journal of Animal Science**, v. 52, p. 628-634, 1981.

VALADARES, R. F. D.; BRODERICK, G. A.; VALADARES FILHO, S. C.; CLAYTON, M. K. Effect of replacing alfafa silage 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 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.

VANDEHAAR, M. J.; ST-PIERRE, N. Major Advances in Nutrition: Relevance to the Sustainability of the Dairy Industry. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 4, p. 1280-1292, 2006.

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

WEISS, W. P. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 61., 1999, Ithaca. **Proceedings...** Ithaca: Cornell University, 1999. p. 176-185.

WILLIAMS, A. G.; COLEMAN, G. S. The rumen protozoa. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Ed.). 2. ed. **The rumen microbial ecosystem**. London: Blackie Academic & Professional, 1997. p. 73-139.

WU, Z.; OHAJURUKA, O. A.; PALMQUIST, D. L. Ruminal synthesis, biohydrogenation, and digestibility of fatty acids by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3025-3034, 1991.

YANG C. M. J.; RUSSELL J. B. Effect of monensin on the specific activity of ammonia production by ruminal bacteria and disappearance of amino nitrogen from the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 3250-3255, 1993.

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