

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**QUITOSANA ASSOCIADA AO GRÃO DE SOJA NA ALIMENTAÇÃO DE
BÚFALOS MURRAH**

LAIS SANTANA BEZERRA DIAS

**SALVADOR - BAHIA
MARÇO-2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**QUITOSANA ASSOCIADA AO GRÃO DE SOJA NA ALIMENTAÇÃO DE
BÚFALOS MURRAH**

LAIS SANTANA BEZERRA DIAS
Médica Veterinária

**SALVADOR-BAHIA
MARÇO-2018**

LAIS SANTANA BEZERRA DIAS

**QUITOSANA ASSOCIADA AO GRÃO DE SOJA NA ALIMENTAÇÃO DE
BÚFALOS MURRAH**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Área de concentração: Produção animal.

Orientador: Prof. Dr. José Esler de Freitas Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Gleidson Giordano Pinto de Carvalho

**SALVADOR – BAHIA
MARÇO – 2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA), com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

D541 Dias, Lais Santana Bezerra

Quitosana associada ao grão de soja na alimentação de búfalos Murrah / Lais Santana Bezerra Dias. -- Salvador, 2018.

93f. :il

Orientador: José Esler de Freitas Júnior.

Coorientador: Gleidson Giordano Pinto de Carvalho. Tese (Doutorado - Zootecnia)
-- Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2018.

1. Nutrição de animais. 2. Rudimentares - Búfalos. 3. Fluxo reticular. 4. pH ruminal.
5. propionato. 6. I. de Freitas Júnior, José Esler. II. Pinto de Carvalho, Gleidson Giordano.

III. Título.

CDU: 591.53:636.293.2

**QUITOSANA ASSOCIADA AO GRÃO DE SOJA NA ALIMENTAÇÃO
DE BÚFALOS MURRAH**

Lais Santana Bezerra Dias

Tese defendida e aprovada para obtenção do grau de
Doutor em Zootecnia

Salvador, 02 de março de 2018

Comissão examinadora:



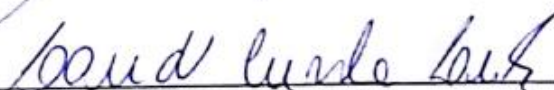
Dr. José Esler de Freitas Júnior
UFBA
Orientador / Presidente



Dr. Thadeu Mariniello Silva
UFBA



Dra. Manuela Silva Libânio Tosto
UFBA



Dr. Laudi Cunha Leite
UFRB



Dra. Daiane Lago Novais
UNIAGES

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LAIS SANTANA BEZERRA DIAS - Filha de Euvanildo dos Santos Bezerra e Josefa de Santana Bezerra, nasceu em Salvador-Ba, no dia 23 de setembro de 1986. Em 2006, iniciou o curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal da Bahia, finalizando o mesmo em dezembro de 2011. Em 2012, iniciou o curso de Pós-Graduação- Mestrado em Zootecnia, na Universidade Federal da Bahia - UFBA, obtendo o título de Mestre em 2014. Em 2014, iniciou o curso de Pós-Graduação - Doutorado em Zootecnia, na Universidade Federal da Bahia - UFBA. Em março de 2018, submeteu-se à banca examinadora para defesa da tese e conclusão do doutorado.

Caminhar ao seu lado foi o maior presente de Deus pra mim, nossa história, nossos momentos mais felizes viverão eternamente.

A Evanildo Bezerra meu amado pai (in memoriam).

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus que é o meu sustento, agradeço por ter me ajudado a vencer todos os obstáculos e ter me guiado até aqui. Que Te amar seja a razão de minha existência.

Ao meu querido pai, Evanildo Bezerra, serei eternamente grata, pelo seu amor. Jamais irei esquecer as mais lindas memórias e as palavras doces.

À minha mãe, Josefa Bezerra, eu agradeço com carinho, por ter cuidado de nossa família com tanto zelo e pelas orações. Você é meu exemplo!

A aquele que escolhi para amar, para ser meu melhor amigo e companheiro, para dividir comigo todos os momentos de minha vida, ao meu esposo Edinilson Dias.

Aos meus irmãos, Jean Louyzie e Mydia Lopes, eu agradeço pelos momentos partilhados. Fico feliz em ter vocês como parte de minha vida.

À família Dias pelo amor e carinho especialmente aos meus pais Maria do Rosário e Manoel Dias, pais que o amor me deu.

Às minhas amigas, Ana Cláudia Ribeiro, Liliane Anjos, Vivia Dias, Luciana Rodrigues, Maria Leonor, Catarine e Jéssica Brandão por serem como irmãs, companheiras. Vocês alegram minha vida.

Ao meu orientador, José Esler de Freitas Júnior pela dedicação com a qual sempre me orientou, pela motivação e pelos ensinamentos, por ter me proporcionado essa oportunidade e pela confiança depositada. Serei sempre Grata!

Ao meu coorientador Gleidson Giordano Pinto de Carvalho, pelo conhecimento transmitido em todos esses anos, por todas as oportunidades e auxílio fundamentais para chegar até aqui.

À todos os professores do Programa de Pós Graduação em Zootecnia que contribuíram para meu aprendizado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro (concessão nº 446111-2014).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB, pela bolsa concedida.

À Dayane Silva, agradeço pela parceria na condução do experimento, amizade, pelo auxílio e responsabilidade, foram dias de muito trabalho e muitas risadas também.

À Maria Leonor Araújo, pela ajuda em todas as fases do meu trabalho, por ser sempre disponível em ajudar, por ter me encorajado e por ser sempre amiga.

A Antônio Carneiro, Victor Guimarães, Lucas Bulcão, Filipe Queiroz e Henry Daniel agradeço pela disposição e responsabilidade indispensável para realização desse trabalho.

Agradeço ainda a Aracele Vieira pelas conversas sempre motivadoras, a Prof^ª Camila Maida, aos pós graduandos: Tainá Almeida, Mayara Miranda, Fernanda Maria, Adin, Camila Oliveira, Fleming, Lucas Feitosa, Daiane Sanders e aos estagiários pela colaboração: Thanielle, Renato, Catarine, Daniel, Elaine, Tércia, Jaqueline, Leonardo, Taiana e Tatiana.

Aos Professores da UESB, Fabiano, Aureliano, Mara e a todo pessoal do Laboratório de Forragem e Fisiologia, principalmente a José Queiroz, Taiala, George Correia, Diego, Leandro, Antônio, Weiber, Florence, Julinessa e Erick pelo suporte imprescindível na realização desse trabalho e por terem nos recebido muito bem.

Aos Funcionários da Fazenda experimental da Universidade Federal da Bahia vocês foram fundamentais na realização deste trabalho. A Sr. Geovane, Edgar, Seu Zé, Messias, Dil, Duca e Roberto.

À todos aqueles que oraram por mim e contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Àquele que é poderoso para fazer tudo muito mais
abundantemente além daquilo que pedimos ou pensamos,
segundo o poder que em nós opera”*

Efésios 3:20

Àquele que é infinitamente bom em todo o tempo, Deus, meu eterno Pai

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

- Figura 1. Estrutura química da quitosana..... 4

Capítulo 1

- Figura 1. Valores de pH observados na digesta do rúmen de búfalos alimentados com as dietas CO = controle; QT= quitosana; GSI= grão de soja; GSI+QT = quitosana e grão de soja 38
- Figura 2. Valores de N-amoniaco observados na digesta do rúmen de búfalos alimentados com as dietas CO = controle; QT= quitosana; GSI= grão de soja; GSI+QT = quitosana e grão de soja. 39
- Figura 3. Valores de acetato observados na digesta do rúmen de búfalos alimentados com as dietas CO = controle; QT= quitosana; GSI= grão de soja; GSI+QT = quitosana e grão de soja. 41
- Figura 4. Valores de propionato observados na digesta do rúmen de búfalos alimentados com as dietas CO = controle; QT= quitosana; GSI= grão de soja; GSI+QT = quitosana e grão de soja. Os valores de propionato diferiram quatro horas após a alimentação entre as dietas CO e GS (*P<0,05)..... 41
- Figura 5. Valores de butirato observados na digesta do rúmen de búfalos alimentados com as dietas CO = controle; QT= quitosana; GSI= grão de soja; GSI+QT = quitosana e grão de soja. 42

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabela 1. | Compilação de trabalhos nacionais e internacionais, entre os anos de 2012 a 2017, avaliando o uso da quitosana em grandes ruminantes. | 7 |
| Tabela 2. | Principais achados científicos de trabalhos nacionais e internacionais, entre os anos de 2009 a 2016, do efeito da inclusão <i>in vitro</i> de quitosana avaliado em ambientes com diferentes relações volumoso:concentrado e substratos..... | 10 |

Capítulo 1

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabela 1. | Composição químico-bromatológica dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais | 25 |
| Tabela 2. | Porcentagem de inclusão dos ingredientes e químico-bromatológica no concentrado..... | 26 |
| Tabela 3. | Porcentagem de inclusão dos ingredientes e químico-bromatológica das dietas experimentais | 27 |
| Tabela 4. | Efeitos das dietas experimentais sobre o consumo de nutrientes..... | 35 |
| Tabela 5. | Efeitos das dietas experimentais sobre a digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes..... | 36 |
| Tabela 6. | Efeito das dietas experimentais sobre os parâmetros de fermentação ruminal | 37 |
| Tabela 7. | Efeito das diferentes concentrações de quitosana nas concentrações séricas dos metabólitos sanguíneos..... | 43 |
| Tabela 8. | Caracterização ruminal de acordo com as dietas experimentais | 44 |

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 9. | Dinâmica ruminal, concentrações e digestibilidade de nutrientes..... | 46 |
| Tabela 10. | Dinâmica ruminal, concentrações e digestibilidade da FDN..... | 48 |
| Tabela 11. | Efeitos das dietas experimentais sobre as atividades de alimentação, ruminação, mastigação e ócio..... | 49 |
| Tabela 12. | Efeitos das dietas experimentais sobre as eficiências de alimentação e ruminação..... | 51 |
| Tabela 13. | Efeitos das dietas experimentais sobre o número, tempo e consumo de MS e FDN por período de alimentação, ruminação e ócio..... | 52 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------------|---|
| AC | Alto Concentrado |
| AG | Ácido graxo |
| AGV | Ácidos Graxos Voláteis |
| AOAC | Association of Official Analytical Chemists (Associação de Métodos Analíticos Oficiais) |
| BC | Baixo concentrado |
| C3:C2 | Relação propionato: acetato |
| CH ₄ | Metano |
| CLA | Ácido Linoléico Conjugado |
| CMS | Consumo de Matéria Seca |
| CNCPS | Cornell Net Carbohydrate and Protein System |
| CNF | Carboidratos não fibrosos |
| CO | Controle |
| Co-EDTA | Cobalto EDTA |
| Cr ₂ O ₃ | Óxido Crômico |
| CT | Carboidratos totais |
| EAL | Eficiência de alimentação |
| EE | Extrato etéreo |
| ERU | Eficiência em ruminação |
| FDA | Fibra em Detergente Ácido |
| FDN | Fibra em Detergente Neutro |
| FDN _{pd} | Fibra em Detergente Neutro potencialmente digestível. |
| GSI | Grão de soja integral |
| HDL | Lipoproteína de alta densidade |
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| MM | Matéria Mineral |
| MS | Matéria Seca |
| MO | Matéria Orgânica |
| NRC | National Research Council |

| | |
|-------------------|---------------------------------|
| N-NH ₃ | N-amoniacal |
| NDT | Nutrientes Digestíveis Totais |
| PB | Proteína Bruta |
| PC | Peso Corporal |
| PDR | Proteína Degradável no Rúmen |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| PNDR | Proteína não Degradada no Rúmen |
| QT | Quitosana |
| SC | Sais de Cálcio |
| SCAG | Sais de Cálcio de Ácidos Graxo |
| TMT | Tempo de Mastigação Total |
| TiO ₂ | Dióxido de Titânio |
| V:C | Volumoso: Concentrado |

LISTA DE ANEXO

| | | |
|----------------|---|----|
| Anexo 1 | Concordância do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA..... | 73 |
|----------------|---|----|

SUMÁRIO

Quitosana associada ao grão de soja na alimentação de búfalos

Murrah

| | Página |
|--|---------------|
| RESUMO | x |
| ABSTRACT | xii |
| 1. INTRODUÇÃO | 01 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 03 |
| 2.1 Quitosana como antimicrobiano na alimentação de ruminantes | 03 |
| 2.2 Suplementação lipídica em ruminantes..... | 14 |
| 2.3 Gordura protegida..... | 15 |
| 2.4 Uso do grão de soja na dieta de ruminantes..... | 16 |
| 2.5 Associação da quitosana com gordura protegida | 20 |
| 2.6 Estimativa de fluxo reticular | 21 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 24 |
| 3.1. Localização, animais, manejo experimental e dietas..... | 24 |
| 3.2 Amostragem e análises laboratoriais..... | 25 |
| 3.3. Consumo e digestibilidade de nutrientes..... | 28 |
| 3.4. Análise de fermentação ruminal..... | 28 |
| 3.5. Metabólitos sanguíneos..... | 29 |
| 3.6. Dinâmica ruminal..... | 30 |
| 3.7. Fluxo reticular de nutrientes | 31 |
| 3.8. Comportamento ingestivo | 32 |
| 3.9 Análises estatísticas..... | 33 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 35 |
| 4.1. Consumo e digestibilidade aparente..... | 35 |
| 4.2. Fermentação Ruminal..... | 37 |
| 4.3. Metabólitos sanguíneos..... | 42 |

| | |
|--|----|
| 4.4. Dinâmica ruminal e fluxo de nutrientes..... | 44 |
| 4.5. Comportamento Ingestivo..... | 48 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 52 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 53 |
| ANEXO I..... | 72 |

QUITOSANA ASSOCIADA AO GRÃO DE SOJA NA ALIMENTAÇÃO DE BÚFALOS MURRAH

RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos da associação da quitosana ao grão de soja cru e integral em dietas de búfalos sobre o consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes, fermentação ruminal, metabólitos sanguíneos, dinâmica ruminal, fluxo reticular de nutrientes e o comportamento ingestivo dos animais. Foram utilizados quatro búfalos (*Bubalus bubalis*) Murrah, com aproximadamente 24 meses de idade, castrados, canulados no rúmen e com peso médio inicial de 351 ± 15 kg. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em um delineamento quadrado latino 4×4 , em esquema fatorial 2×2 e nas seguintes dietas experimentais: 1) CO = Controle; 2) QT = Quitosana, inclusão de 150 mg / kg de peso corporal; 3) GSI = Grão de soja cru e integral, 100 g /kg da matéria seca total; 4) GSI + QT = Quitosana + Grão de soja cru e integral. As dietas foram formuladas utilizando-se relação volumoso:concentrado de 75:25, sendo empregado como volumoso a silagem de sorgo. Não houve efeito das dietas sobre o consumo de matéria seca (CMS), no entanto, a adição do grão de soja integral aumentou o consumo de extrato etéreo ($P < 0,01$) e a digestibilidade aparente do extrato etéreo ($P = 0,04$). Não houve diferença ($P > 0,05$) para os valores de pH ruminal entre as dietas. A inclusão da quitosana e grão de soja integral promoveu aumento nas concentrações molares de acetato ($P = 0,02$) e propionato ($P = 0,01$) no rúmen. A inclusão de quitosana e a associação entre QT e GSI nas dietas não alteraram ($P > 0,05$) as concentrações de metabólitos sanguíneos. Os animais alimentados com a dieta contendo quitosana não apresentaram efeito na taxa de digestão, taxa de renovação e taxas de passagem da matéria seca, fibra em detergente neutro e fibra em detergente neutro potencialmente digestível (FDNpd) em comparação a digesta dos animais alimentados com a dieta contendo grão de soja ($P > 0,05$). A digestibilidade ruminal em porcentagem da MS ($P = 0,01$) da dieta controle foi menor quando comparada as dietas com suplementação da quitosana (Q e GS+QT). Os resultados observados sugerem que a associação da quitosana com o grão de soja integral tem efeitos potenciais como modulador da fermentação ruminal; portanto, a quitosana pode ser aplicada como alternativa aos ionóforos na dieta de búfalos Murrah.

Palavras-chave: acetato, antimicrobiana, fluxo reticular, ionóforo, pH ruminal, propionato

CHITOSAN ASSOCIATED WITH SOYBEAN IN MURRAH BUFFALO DIETS

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of the association between chitosan and whole raw soybean in buffalo diets on intake, apparent digestibility, ruminal fermentation, blood metabolites, ruminal dynamics, reticular flow and ingestive behavior of the animals. Four Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*), with approximately 24 months of age, male castrated, cannulated in the rumen with an average initial weight of 351 ± 15 kg, were used. Animals were randomly distributed in a 4×4 Latin square, in a 2×2 factorial scheme and fed with the following experimental diets: 1) CO = Control; 2) CH = Chitosan, inclusion of 150 mg / kg body weight; 3) WS = Whole raw soybean, 100 g / kg of total dry matter; 4) Chitosan + whole raw soybean (CHWS). Sorghum silage was used as roughage in the proportion of 75% of the diet. The addition of whole raw soybean increased the intake of ether extract ($P < 0.01$) and the apparent digestibility of ether extract ($P = 0.04$). There was no difference ($P > 0.05$) for ruminal pH values between diets. The inclusion of chitosan and whole soybean grain promoted an increase in the molar concentrations of acetate ($P = 0.02$) and propionate ($P = 0.01$) in the rumen. The inclusion of chitosan and the association between CH and WS in the diets did not change ($P > 0.05$) the concentrations of blood metabolites. Animals fed diet containing chitosan had no effect on digestion rate, turnover rate and passage rate of the dry matter, neutral detergent fiber, and potentially digestible neutral detergent fiber (pdNDF) when compared to animals fed diet containing whole soybean grain ($P > 0.05$). Ruminal digestibility of DM ($P = 0.01$) of the control diet was lower when compared to diets with chitosan supplementation (CH and WS + CH). The observed results suggest that the association of chitosan with whole soybean grain has potential effects as a modulator of ruminal fermentation; therefore, chitosan can be applied as an alternative to ionophors in Murrah buffalo diets.

Keywords: acetate, antimicrobial, ionophore, propionate, reticular flow, rumen pH

1. INTRODUÇÃO

A quitosana (QT), considerada um biopolímero não tóxico e biodegradável, tem aplicação em várias áreas, como medicina e preservação de alimentos, principalmente por causa de suas propriedades antimicrobianas (KONG et al., 2010). Conforme descrito por Goiri et al. (2009a, b), o uso de QT despertou o interesse dos nutricionistas porque mostrou atividade semelhante à dos ionóforos como modulador ruminal. Esta afirmação corrobora com estudos realizados por Gandra et al. (2016), que enfatizaram a importância do uso da quitosana por sua atividade antimicrobiana para melhorar o desempenho de novilhas, pois promove fermentação ruminal em uma via mais favorável energeticamente.

Embora o mecanismo de ação da QT ainda não tenha sido totalmente elucidado, Helander et al. (2001) e Kong et al. (2010) mencionaram que a teoria mais aceita para a ação antimicrobiana da QT é que esta modifica a permeabilidade celular devido as interações entre a quitosana policatiônica e as cargas eletronegativas na célula bacteriana. Estudos recentes avaliaram o efeito da quitosana sobre o consumo, digestibilidade e parâmetros de fermentação ruminal em ruminantes (Araújo et al., 2015; Gandra et al., 2016; Mingoti et al., 2016; Vedramini et al., 2016; Paiva et al., 2016). Em bovinos de corte, foi observado por Araújo et al. (2015) que o uso da quitosana promoveu aumento nas concentrações de propionato e nas digestibilidades da matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN). Dias et al. (2017) avaliaram doses de quitosana nas concentrações de 0, 400, 800, 1200 ou 1600 mg / kg de MS no concentrado, e observaram que houve alteração nos consumos de MS, PB e FDN de novilhos, com maiores valores obtidos em doses intermediárias de QT. Embora tenham sido conduzidos estudos avaliando a utilização da quitosana na dieta de outras espécies de ruminantes, não existem trabalhos na literatura científica sobre o efeito desse aditivo na dieta de búfalos (PRADO et al., 2010; ZEOULA et al., 2014).

Outra estratégia utilizada com o objetivo de aumentar a eficiência do processo fermentativo é a utilização de uma fonte de gordura protegida. Devido ao alto valor de proteína e energia, o grão de soja integral (GSI) é comumente usado em dietas de ruminantes, sendo considerada uma fonte adequada de nutrientes (PALMQUIST et al., 1991; NRC, 2001). Além disso, o uso de GSI na alimentação animal se dá em virtude de

ser uma fonte de gordura de liberação lenta no rúmen. Fato que pode inibir possíveis reduções da digestibilidade da fibra devido ao efeito negativo que as gorduras insaturadas prontamente disponíveis no rúmen podem ter sobre bactérias fibrolíticas. Isso ocorre em oleaginosas porque a maioria dos lipídios está presente no gérmen e, portanto, há uma necessidade de degradação da parede celular para que a hidrólise comece.

De acordo com Goiri et al. (2010), a QT pode afetar o crescimento de bactérias gram positivas e/ou reduzir a biohidrogenação. Assim, a sua associação com uma fonte de ácidos graxos, como o grão de soja integral é satisfatória para a redução do processo de biohidrogenação de ácidos graxos (MINGOTI et al., 2016), como um efeito adicional para o possível aumento da eficiência de fermentação.

Objetivou-se avaliar os efeitos da associação de QT com GSI em dietas de búfalos sobre consumo, digestibilidade aparente dos nutrientes, fermentação ruminal, metabólitos sanguíneos, dinâmica ruminal, fluxo reticular de nutrientes e o comportamento ingestivo dos animais. Sob a hipótese de que o uso da QT associada ao GSI aumenta as concentrações de propionato ruminal sem interferir negativamente no consumo ou digestibilidade da matéria seca e componentes nutricionais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Quitosana como antimicrobiano na alimentação de ruminantes

Diversos produtos e tecnologias foram desenvolvidos nos últimos anos para otimizar o desempenho dos ruminantes e, conseqüentemente, a produção pecuária de modo a proporcionar máxima rentabilidade (VENDRAMINI et al., 2016). Um desses mecanismos é a manipulação dos padrões de fermentação ruminal através do uso de aditivos, com atividade antimicrobiana (DEL VALLE et al., 2017). Conforme os autores, estes aditivos atuam promovendo alterações na composição da microbiota ruminal e, dessa forma, aumentando a digestibilidade da fibra resultando incremento da síntese de produtos provenientes do processo digestivo dos alimentos, tornando a fermentação mais eficiente e com menos gasto de energia (GUGLIELMELLI et al., 2010; SEGABINAZZI, 2008).

A União Européia (UE), em 1999, proibiu a utilização de antibióticos como promotores de crescimento e em 2006, o uso de ionóforos. Diante disso, tem-se buscado a substituição de antibióticos por substâncias alternativas que tenham mecanismo de ação similar aos ionóforos, que possam melhorar a função ruminal e teoricamente manipular o ecossistema microbiano (DIAS, 2016). Como aditivos alternativos pesquisados nos últimos anos destacam-se as leveduras (DESNOYERS et al., 2009; ROBINSON e ERASMUS, 2009), os óleos essenciais (BENCHAAAR et al., 2008) e a quitosana (GOIRI et al., 2009a, b).

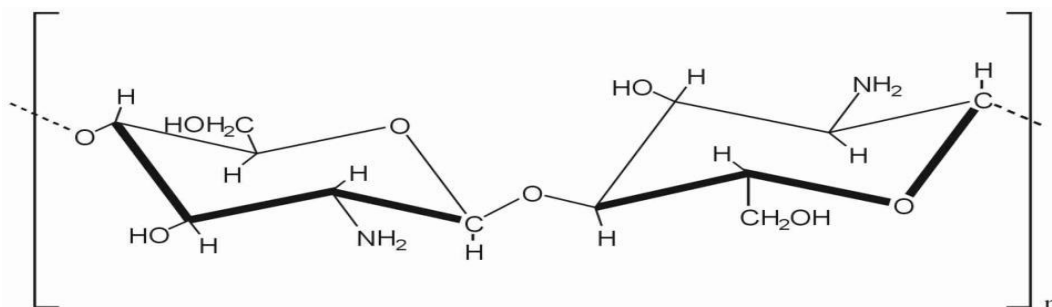
A quitosana demonstrou atividade similar a aditivos como os ionóforos como modulador ruminal, (GOIRI et al., 2009a,b). De acordo com Aranaz et al. (2009) e Goiri et al. (2009a), a quitosana é um polissacarídeo natural (polímero N-acetil-D-glicosamina; Figura 1) que se destaca por possuir propriedades como a não toxicidade, além da alta biodegradabilidade e propriedades antimicrobianas naturais. Derivada do processo de desacetilação da quitina (GOIRI et al., 2009a,b,c), que por sua vez, é caracterizada como biopolímero mais abundante da natureza após a celulose, sendo o polissacarídeo encontrado como componente principal do exoesqueleto de alguns invertebrados (insetos, crustáceos e moluscos) e de paredes celulares de alguns fungos e algas (SENEL et al., 2004).

Vale ressaltar que o grau de desacetilação da quitosana pode influenciar diretamente na sua atividade bactericida (KONG et al., 2008) sendo um parâmetro fundamental a ser observado, uma vez que determina a quantidade de grupos amino presentes no biopolímero (KUMAR, 2000). No entanto, existe dificuldade na obtenção da quitosana com elevado grau de desacetilação, isso por que, à medida que o grau aumenta a probabilidade de degradação desta aumenta de forma similar (LE DUNG et al., 1994). O grau de desacetilação vai definir não apenas as propriedades físico químicas, mas favorecer a diferenciação entre a quitina e a quitosana que é feita pela porcentagem de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcNAc) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcN) (KEAN e THANOU, 2010).

Comumente, o processo de desacetilação da quitosana não é completo e quase a totalidade dos produtos vendidos comercialmente é composta por unidades repetidas de quitosana e quitina alternadamente. Conforme mencionado por Roberts (1992), a quitina é formada por unidades GlcNAc unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, no entanto, a quitosana é composta primariamente por unidades GlcN (Figura 1) unidas de igual forma por ligações glicosídicas. A quitosana apresenta solubilidade em ácidos orgânicos e minerais diluídos, contudo pode precipitar em pH superior a 6,0, realizando assim troca de íons (DAMIAN, et al., 2005).

Avaliando a quitosana com seis graus de desacetilação diferentes em ensaios “*in vitro*”, Goiri et al. (2009c) observaram que o grau de desacetilação >95 , diminuiu a relação CH₄:AGV, demonstrando modificação na fermentação ruminal pelo aumento da relação acetato: propionato.

Figura 1 – Estrutura química da quitosana



Fonte: Adaptada de Shahidi et al. (1999)

O mecanismo de ação da atividade antimicrobiana da quitosana ainda não é muito bem elucidado. A hipótese mais aceita é a mudança na permeabilidade da

membrana celular devido às interações entre a quitosana policatiônica e as cargas eletronegativas na superfície da célula bacteriana, superfície lipopolissacáridica (LPS) das bactérias gram negativas e fração peptidoglicana das bactérias gram-positivas (HELANDER et al., 2001 e KONG et al., 2010).

No entanto, as bactérias gram-positivas, as quais não possuem a membrana celular externa são mais susceptíveis (KUMAR et al., 2005), pois similarmente ao ionóforo, que pode, penetrar facilmente a membrana celular, em comparação às bactérias gram-negativas que possuem membrana celular externa constituída de porinas com tamanho de 600 Daltons. Dessa forma, pode-se inferir que a quitosana atua de forma similar aos ionóforos, alterando o transporte de íons na membrana celular das bactérias (RUSSELL e HOULIHAN, 2003). De forma geral, os ionóforos apresentam tamanho superior a 600 Dalton, não ultrapassando as porinas (NAGAJARA et al., 1997).

Os microrganismos ruminais quase em sua totalidade, mantêm alta concentração de potássio intracelularmente, eliminando sódio e outros prótons para o exterior (HAROLD, 1986). Dessa forma, a concentração de sódio no rúmen é maior que a concentração de potássio em 2 a 10 vezes (DURAND e KAWASHIMA, 1980). Sendo assim, a partir da adição de ionóforos, ocorre o influxo de sódio e outros íons de carga positiva na célula bacteriana, fazendo com que para evitar o influxo de água e o rompimento a bactéria entre em ciclo fútil para manter seu potencial de membrana (RUSSELL e HOULIHAN, 2003).

Devido às suas propriedades antimicrobianas, contra bactérias e fungos, que foram descritas inicialmente por Allan e Hardwiger (1979), a quitosana é comumente usada na medicina e preservação de alimentos (SENEL e MCCLURE, 2004; KONG et al., 2010).

Além dos efeitos acima descritos, a quitosana atua na diminuição da metanogênese no rúmen devido à mudança no padrão de fermentação para a produção de propionato (GOIRI et al., 2009b; GANDRA et al., 2011). Belanche et al. (2016) relataram redução de 42% da metanogênese no rúmen, que foi atribuída pelos autores devido à uma redução da estrutura na comunidade bacteriana e em virtude da substituição de microrganismos fibrolíticos (*Firmicutes e Fibrobacteres*) por bactérias amilolíticas (*Bacteroidetes e Proteobacteria*) que levam a maior atividade de amilase, lactato e proteína microbiana sem efeito prejudicial sobre a digestibilidade do alimento.

A utilização da quitosana na dieta de ruminantes foi proposta por Goiri et al. (2009a) com o objetivo de modular a fermentação e digestão ruminal, com respostas eficazes na metabolismo ruminal. Além disso, ao longo dos últimos anos outras pesquisas demonstraram potenciais benefícios da quitosana na fermentação ruminal e metanogênese (Tabela 1).

A inclusão de quitosana alterou os parâmetros de fermentação promovendo aumento não somente das concentrações de propionato (GOIRI et al., 2009a, b, c; LI et al., 2013; PAIVA et al., 2016; DIAS et al., 2017); como também nas concentrações de glicose (ARAÚJO et al., 2015), na digestibilidade de matéria seca (GANDRA et al., 2016), proteína bruta e fibra em detergente neutro (ARAÚJO et al., 2015; MINGOTI et al., 2016; VEDRAMINI et al., 2016). Por outro lado, a quitosana promoveu inibição da biohidrogenação *in vitro* (GOIRI et al., 2010) e demonstrou efeito na metanogênese com diminuição da produção de metano (BELANCHE et al., 2016).

Logo, segundo descrito por Goiri et al. (2009a,b, 2010), a quitosana promoveu alteração na fermentação ruminal para padrões mais energeticamente eficientes, sendo considerada uma alternativa aos antimicrobianos ionóforos. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar o efeito da inclusão de quitosana na fermentação ruminal.

Tabela 1. Compilação de trabalhos nacionais e internacionais, entre os anos de 2012 a 2017, avaliando o uso da quitosana em grandes ruminantes.

| Autor | Categoria animal | Dieta Relação volumoso:concentrado | Quitosana (dose) | Resultado |
|-------------------------|--|---|-------------------------------|--|
| 1 Almeida et al. (2012) | 16 vacas Holandesas multíparas em lactação | Silagem de milho Relação V:C = 50:50 | 0, 50, 100, 150 (mg/kg de PC) | Metabólitos sanguíneos: Ausência de efeito: glicose, proteínas totais, colesterol, HDL. Aumento das concentrações de ureia e de nitrogênio ureico no soro. |
| 2 Mingoti et al. (2012) | 16 vacas Holandesas | Silagem de milho Grão de milho moído Farelo de soja Grão de soja integral Relação V:C = 50:50 | 0, 50, 100, 150 (mg/kg de PC) | Consumo: Ausência de efeito da quitosana no consumo de matéria seca (kg/dia e %PC) |
| 3 Henry et al. (2015a) | 24 novilhas | Glúten de milho Casca de soja Casca de amendoim Quitosana AC = 15:85 (alto concentrado) BC = 64:36 (baixo concentrado) | 0, 0,5 ou 1,0% (base na MS) | Digestibilidade: Cr2O3: Efeito de interação da dieta × quitosana para as digestibilidades da MS, MO, FDN e de FDA. TiO2: interação de dieta x quitosana para FDN e FDA. FDNi: a digestibilidade da MS e a da MO foram aumentadas em 21 e 19%, respectivamente, quando a quitosana foi incluída nas dietas com baixo nível de carboidrato. |
| 4 Henry et al. (2015b) | 8 novilhos | Feno de Tifton-85 | 80g/dia | Fermentação: Houve interação tratamento × tempo de coleta para acetato, propionato e relação acetato:propionato, esta |

| | | | | | |
|---|-----------------------|--------------------|---|-------------------------------|---|
| | | | | | relação foi reduzida para a quitosana. |
| 5 | Araújo et al. (2015) | 8 Novilhos Nelore | Silagem de milho Grão de milho moído Farelo de soja Grão de soja (39,9%) RelaçãoV:C = 60:40 | 0, 50, 100, 150 (mg/kg de PC) | Consumo: Não houve efeito para o CMS Digestibilidade: Houve aumento nas digestibilidade da MS, PB e FDN. Fermentação: pH ruminal não foi influenciado, N- amoniacal foi afetado de forma quadrática, bem como, Propionato e butirato, contudo, o acetado foi influenciado linearmente. A relação acetato:propionato foi aumentada com a adição de quitosana. Metabólitos sanguíneos: Glicose foi maior com a adição de quitosana. Ureia e proteínas totais não foram afetadas. |
| 6 | Gandra et al. (2016) | 12 novilhas Jersey | Silagem de milho Grão de milho moído Farelo de soja Grão de soja integral (16.3%) Relação V:C = 50.4:49.6 | 2,0 g kg ⁻¹ de MS | Consumo: Redução do consumo de MS e FDN Digestibilidade: Quitosana promoveu aumento da digestibilidade total da MS Metabólitos sanguíneos: Glicose e triglicerídeos não foram influenciados pela quitosana. Houve efeito de interação para concentração de HDL, que aumentou tanto com a inclusão de quitosana como de grão de soja. Além disso, a quitosana diminuiu o valor de colesterol HDL e LDL. |
| 7 | Mingoti et al. (2016) | Vacas Holandesas | Silagem de milho Grão de milho moído Farelo de soja Grão de soja integral Relação V:C = 50:50 | 0, 50, 100 e150 (mg/kg de PC) | Consumo: não houve efeito da quitosana no CMS (kg/dia e % de PC). Digestibilidade: A adição da quitosana aumentou linearmente a digestibilidade total aparente da PB e, quadraticamente as digestibilidades da MS, MO e FDN. |
| 8 | Vedramini | 24 Vacas | Silagem de milho | 150 mg/kg de PC | Consumo: Os tratamentos não influenciaram o consumo de |

| | | | | | |
|----|---------------------|-----------------------|--|--|--|
| | et al. (2016) | multíparas | Grão de milho moído Farelo de soja Grão de soja integral | | nutrientes Digestibilidade: Dietas com quitosana apresentaram maior digestibilidade de MS do que dietas com óleos essenciais. Dietas com monensina ou quitosana apresentaram maior digestibilidade de PB do que dietas com adição de óleo essencial. Metabólitos sanguíneos: as concentrações séricas dos metabólitos não foram influenciados pelos tratamentos. |
| | | | Relação V:C = 50:50 | | |
| 9 | Paiva et al. (2016) | 8 vacas Holandesas | Silagem de milho Grão de milho moído Farelo de soja | 0, 75,150 e 225 mg/kg de PC | Consumo: A quitosana não influenciou o consumo de matéria seca (kg/dia e % de PC). Digestibilidade: quitosana promoveu aumento da digestibilidade de PB cujos maiores valores foram verificados nos maiores níveis de adição de quitosana. Fermentação: aumento da concentração de propionato e redução das concentrações de butirato e relação acetato:propionato devido ao uso da quitosana. A quitosana não influenciou a concentração de acetato, pH e N amoniacal. Metabólitos sanguíneos: glicose e ureia foram similares entre os tratamentos. |
| | | | Relação V:C = 63.08: 36.92 | | |
| 10 | Dias et al. (2017) | 5 Novilhos | <i>Brachiaria brizantha</i> Grão de milho moído Farelo de soja | 0, 400, 800, 1200 e 1600 mg/kg de MS do concentrado | Consumo: efeito quadrático da quitosana nos consumos de forragem e FDN (maiores valores nas doses intermediárias). Digestibilidade: aumento linear das digestibilidades aparentes totais de MS e PB. Fermentação: ausência de efeito no pH ruminal; efeito quadrático no N-NH ₃ ; aumento linear da concentração de propionato. Efeito quadrático para a relação acetato:propionato com os níveis de quitosana. |
| | | | Piquetes de 0.3 hectares 150g/100 kg de PC | | |

PC = peso corporal, N-NH₃ =nitrogênio amoniacal

Tabela 2. Principais achados científicos de trabalhos nacionais e internacionais, entre os anos de 2009 a 2016, do efeito da inclusão *in vitro* de quitosana avaliado em ambientes com diferentes relações volumoso:concentrado e substratos.

| Autor | Dietas / Tratamentos | Dose | Resultado |
|--------------|---|---|---|
| 1 | Goiri et al. (2009a) Monensina (controle positivo) Quitosana (controle negativo) Silagem de milho | 750 mg/L: 6 tipos de quitosana (QT1, QT2, QT3, QT4, QT5, e QT6): grau de desacetilação 75, 85, 85, 85, 75-90 e > 95) e viscosidade (200, 2000, 500, 200, 20-200, <500) | QT5 e QT6 diminuíram a concentração total de AGVs. QT3 e QT6 diminuíram a proporção molar de acetato e aumentaram a proporção molar de propionato aumentando assim a relação acetato:propionato. Houve diminuição da produção de metano, com a exceção da QT2. |
| 2 | Goiri et al. (2009b) Feno de alfafa Relação V:C = (50:50) | Sistema Rusitec 2 poços: 1380 mg de quitosana (alta dose) 2 poços: 690 mg de quitosana (baixa dose) 2 poços: 16 mg de monensina (baixa dose) 2 poços: sem aditivos (controle) | Tratamentos com alta e baixa dose diminuíram produção total de gás e produção de metano. Apenas o tratamento com alta dose de quitosana diminuiu a concentração de NH ₃ no líquido ruminal Propionato aumentou através dos tratamentos alta e baixas doses de quitosana e monensina. Ambos os tratamentos com quitosana aumentaram a relação propionato-acetato (C3:C2). |
| 3 | Goiri et al. (2009c) Feno de alfafa Grão de trigo moído Grão de milho Farelo de soja Casca de soja | 0, 325, 750 e 1500 mg/L de cultura 3 tipos de quitosana (75; 85 e >95 grau de desacetilação) | Dieta com alta relação V:C: não houve efeito entre os aditivos exceto para a concentração molar de propionato, em que a QT1 resultou em menor proporção, em comparação às QTs 2 e 3. As doses crescentes de quitosana não afetaram a produção de metano em comparação com o tratamento controle. |

| | | | | |
|---|---------------------|---|---------------------------------------|---|
| | | Farinha de milho Trigo DDG (Grão seco de destilaria) Melaço de beterraba | | Dieta com baixa relação V:C: as doses crescentes não reduziram as proporções molares de AGV total, acetato, butirato e AGV de cadeia ramificada e produção de metano, e aumento da proporção molar de propionato, bem como as relações de C3: C2 e AGV total em comparação com ao controle. |
| | | Relação V:C 80:20; 50:50; 20:80 | | |
| 4 | Goiri et al. (2010) | Farinha de colza Farinha de girassol | 750 mg/dia | A quitosana promoveu inibição da biohidrogenação in vitro, aumentando as proporções de C18: 1 t11 e CLA total e diminuindo a proporção de AG saturado, independentemente da fonte de AG. |
| | | Relação V:C = 10:90 | | |
| 5 | Li et al. (2013) | Feno de alfafa Grão de milho Soja | 0, 333, 667 e 1000 mg L ⁻¹ | Após 24 horas de incubação a quitosana diminuiu a produção de metano e relação acetato:propionato e aumentou o pH ruminal. A quitosana aumentou a proporção molar de propionato no fluido ruminal nas dietas com relação 80:20 e 50:50. No tratamento com 20:80, a quitosana aumentou a concentração de N-amoniaco e proporção molar de butirato e diminuiu a proporção molar de acetato. |
| | | Relação V:C = 80:20; 50:50 e 20:80 | | |
| 6 | Henry et al. (2015) | Alto concentrado (15:85) grão de milho moído glúten de milho casca de soja casca de amendoim farelo de soja feno de capim bermuda (Tifton-85) | 0, 0,5 ou 1,0% (base na MS) | O pH do líquido aumentou quando a quitosana foi incluída em substratos de alto grão. Em avaliação in vitro a produção de CH ₄ não foi afetada pela quitosana em substrato alto grão; no entanto, quando incubado com o substrato baixo grão, a produção de CH ₄ aumentou à medida que a inclusão de quitosana aumentou. |

Baixo concentrado (64:36)

| | | | |
|---|---------------------------|---|--|
| 7 | Belanche et al. (2016) | Quitosana Extrato da fruta ivi contendo saponinas | Ambos diminuíram a metanogênese no rúmen (-42% e -40%, respectivamente) |
| | | Relação V:C = 50:50 | |

2.1 Suplementação lipídica em ruminantes

A suplementação com gordura tem sido utilizada como estratégia quando se deseja aumentar a densidade energética e reduzir o incremento calórico das dietas de ruminantes. Contudo, o aumento da concentração de ácidos graxos insaturados na dieta, assim como os intermediários do processo de biohidrogenação tem grande potencial de influenciar a fermentação ruminal (JENKINS, 1993).

Diversos mecanismos sugerem como os lipídios podem interferir na fermentação ruminal. As principais teorias descritas são: a teoria do "revestimento" lipídico e a teoria dos efeitos antimicrobianos diretos (NAGARAJA et al., 1997), onde os lipídios modificam a população ruminal responsável pela digestão com celulose (DEVENDRA e LEWIS, 1974), podendo causar redução na digestibilidade de fontes não-lipídicas de energia (JENKINS, 1993). Ainda de acordo com o mesmo autor, mesmo que a gordura não interfira na adesão das bactérias às partículas de alimentos, ela ainda pode alterar na adesão das celulases bacterianas à celulose.

A amplitude do efeito sobre a fermentação ruminal vai depender, primordialmente, da taxa de liberação de ácidos graxos insaturados dos alimentos, onde a lenta liberação destes diminui sua exposição aos microrganismos (NRC, 2001). Dessa forma, os ácidos graxos fornecidos na forma de grãos inteiros de oleaginosas exercem menores efeitos sobre a fermentação ruminal quando comparados às grãos moídos (WELD e ARMENTANO, 2017) ou óleos vegetais (CHILLIARD et al., 2009).

De acordo com Jenkins et al. (2008), os lipídeos podem ser extensivamente alterados no rúmen, resultando em diferenças marcantes entre o perfil de ácidos graxos da dieta (insaturados) e o perfil dos lipídeos que deixam o rúmen (saturados). Dessa forma, ainda conforme os autores, o metabolismo de ácidos graxos no rúmen acaba exercendo uma grande influência na composição final dos produtos dos animais.

Inicialmente os estudos avaliando o metabolismo dos lipídios ruminais priorizavam principalmente o destino dos ácidos graxos à medida que estes passam pelo rúmen e são expostos à população microbiana. Estes estudos identificaram duas importantes transformações microbianas no rúmen durante o processo de digestão: lipólise e biohidrogenação de ácidos graxos insaturados (JENKINS, 1993). A lipólise provoca a liberação de ácidos graxos livres a partir de lipídios esterificados seguido da biohidrogenação, que atua promovendo redução no número de ligações duplas.

O processo de biohidrogenação, segundo Palmquist e Mattos (2011), é considerado um mecanismo de autodefesa dos microrganismos ruminais e ocorre devido a toxicidade que os ácidos graxos insaturados podem apresentar a diversas populações microbianas. Neste processo os ácidos graxos insaturados (C18:2 e C18:3) são convertidos em ácidos graxos saturados, diminuindo assim a toxicidade à população microbiana no rúmen.

Com o objetivo de atingir o máximo consumo de gordura sem comprometer o metabolismo microbiano ruminal é recomendada a inclusão de gordura inerte na dieta (PALMQUIST, 1988).

2.3 Gordura protegida

Segundo ressaltado por Jenkins (1993) existem algumas propriedades dos lipídeos que determinam seus efeitos antimicrobianos no ambiente ruminal, sendo possível citar o grau de insaturação, formação de sais de carboxilato, bem como a associação física do lipídeo com a superfície da partícula do alimento e microrganismos. Conseqüentemente, como ressaltado pelo autor a fermentação ruminal pode ser modificada devido à suplementação de fontes de ácidos graxos, e a forma com que estes componentes atuam no ambiente ruminal está relacionada à sua estrutura. Além desse fator, outros aspectos importantes devem ser analisados para que seja realizada a suplementação de gordura em dietas de ruminantes.

Conforme descrito por Ashes et al. (1997) o tipo de lipídeo e composição de ácidos graxos, grau de proteção, além da digestibilidade, transporte dos ácidos graxos absorvidos e o efeito no metabolismo da glândula mamária são pontos a serem analisados de modo que sejam minimizadas modificações tanto na fermentação ruminal, como também no consumo e digestibilidade dos nutrientes.

Smith (1991) descreveu que o termo gordura inerte ou protegida é atribuído ao fato da diminuição do efeito negativo que certos lipídeos tem sobre o metabolismo de protozoários e bactérias ruminais. Desse modo, o grau de proteção de lipídeos deve ser suficiente de modo que haja uma redução dos possíveis impactos sobre a atividade no rúmen. Além de proporcionar o aumento da densidade calórica sem comprometer a porção fibrosa e aumento o consumo energético pelos animais.

2.4 Uso do grão de soja na dieta de ruminantes

O grão de soja cru é uma fonte de energia e proteína (NRC, 2001) apresentando aproximadamente 19% de gordura, 39% de proteína bruta e 90,5% NDT (STERN e ILLG, 1991), que vem sendo utilizado na composição de dietas objetivando-se maior densidade energética. Além de ser fonte de gordura protegida e possuir fibra de alta digestibilidade, o grão de soja ainda pode ser utilizado na forma original (crua) ou processada na alimentação dos ruminantes (CORRÊA, 2007).

Lipídios, na forma de óleo ou gordura, como destacado por Reddy et al. (1994) têm sido utilizados para aumentar a densidade energética das dietas, pois a gordura tem 2,25 vezes mais conteúdo energético que os carboidratos. Sendo assim, corroborando o que foi mencionado e de acordo com o National Research Council (NRC, 2007), possuem maior valor energético do que qualquer outro nutriente, além de representarem a fonte de reserva energética mais importante para os animais.

Segundo Silva (2005), o grão de soja integral pode ser considerado uma fonte de gordura naturalmente protegida, haja vista que a maioria dos lipídeos encontram-se protegidos pela matriz proteica. Portanto, é fundamental que ocorra a degradação da parede celular para que seja possível ação das lipases microbianas sobre o conteúdo celular. Essa característica permite que ocorra liberação lenta dos ácidos graxos durante a fermentação ruminal, possibilitando, portanto, a biohidrogenação quase em sua totalidade à medida que o grão seja triturado devido à mastigação ou ruminação pelos animais. No momento em que há escape deste processo mecânico de trituração, pouca ação exercerá sobre a microbiota ruminal, descartando-se possível redução na digestibilidade da fibra conforme ressaltado por Freitas Jr. (2012).

Certas fontes de ácidos graxos, com destaque aquelas que apresentam proteção natural a exemplo de sementes de oleaginosas inteiras ou parcialmente quebradas, apresentam efeito inerte sobre a população microbiana (ALLEN, 2000; PALMQUIST e MATTOS, 2011). Em virtude disso, esses alimentos não proporcionam toxicidade da gordura sobre os processos de degradação ruminal de nutrientes, especialmente da fibra.

Entre as características nutritivas da soja integral importantes na nutrição de ruminantes destaca-se a grande quantidade de proteína degradável no rúmen (PDR), que pode ser convertida em proteína não degradada no rúmen (PNDR) por meio de

tratamento térmico, e o seu elevado conteúdo de energia devido ao teor de extrato etéreo. As sementes de oleaginosas se caracterizam por apresentar alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados, havendo predomínio do ácido linoléico (C18:2) nas fontes mais comuns, assim como no caso do grão de soja em que são verificadas as maiores concentrações deste (DHIMAN et al., 2005).

Ainda com relação ao efeito do grão de soja sobre a digestibilidade, Schauff (1992), em experimento com grão de soja integral e sebo bovino (2,5 e 4,0%), observaram que as digestibilidades de matéria seca, matéria orgânica, celulose, conteúdo celular e proteína bruta foram reduzidas quando houve adição de gordura na dieta. Apesar disso, as digestibilidades de FDA, FDN e hemicelulose não foram afetadas.

Derez et al. (1996) avaliando a utilização de 0, 20 e 40% de grão de soja cru no concentrado de vacas leiteiras de alta produção não observaram efeito do GS nos consumos de matéria seca total e fibra em detergente neutro. Todavia, ressaltaram que houve diminuição no consumo de proteína bruta e aumento no consumo de extrato etéreo pelos animais.

Com o objetivo de avaliar o consumo de nutrientes e o coeficiente de digestibilidade em vacas lactantes alimentadas com grão de soja moído, Pereira et al. (1998) estudaram dois tratamentos, 0 e 30% de grão de soja moído no concentrado, e silagem de milho oferecida à vontade. De forma oposta ao estudo anteriormente mencionado, os autores observaram redução no consumo para o tratamento com 30% de grão de soja moído no concentrado, porém não houve diferença para digestibilidade aparente dos nutrientes. Desse modo, é possível verificar que os resultados a respeito do uso de grão de soja integral na dieta de ruminantes ainda são contraditórios.

No entanto, como destacado por Nörnberg et al. (2006) para obtenção de resultados produtivos satisfatórios com a suplementação lipídica, é importante que o consumo de matéria seca (CMS) não seja diminuído. Caso contrário, dependendo do nível de redução, os efeitos da maior densidade energética proporcionada pela fonte lipídica poderão ser anulados, como verificado por Vargas et al. (2002), que estudaram o efeito de dois níveis de lipídios (3 e 7%) na dieta de vacas em lactação e, dentro do nível de 7% avaliaram duas fontes de lipídios (grão de soja moído e óleo de soja que foram adicionados nos níveis de 23,5% e 4,6% de EE, respectivamente) na dieta de vacas produzindo 20 L de leite/dia. Os autores constataram que as fontes lipídicas

reduziram em 20% o CMS dos animais, ocorrendo também aumento do pH pela fonte de lipídio, especialmente grão de soja, e tendência ($P < 0,10$) à redução na produção de amônia e isovalerato. O aumento do pH foi provavelmente devido à queda no consumo de matéria seca e em decorrência da menor fermentação ruminal, que proporciona menor acúmulo de ácidos graxos voláteis, principal fator de redução do pH.

O uso de diferentes inclusões de grão de soja cru integral na dieta de bovinos de corte foi avaliado em estudos conduzidos por Consôlo (2011) e Venturelli (2011), nos níveis de 0, 8, 16 e 24% de grão de soja e 0, 9, 18 e 27% na ração, na matéria seca, respectivamente. Em ambos os trabalhos objetivou-se verificar o efeito das dietas sobre o consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes e fermentação ruminal.

Consôlo (2011) observou que houve redução no consumo de matéria seca para os animais alimentados com ração contendo grão de soja em 24% no concentrado. Além disso, foi observado efeito no consumo de EE e PB e na digestibilidade aparente total do EE e carboidratos totais com a adição do grão de soja. Com relação a fermentação ruminal, houve queda no pH ruminal e a concentração de nitrogênio amoniacal ruminal foi maior para os animais que receberam a dieta controle em relação às dietas com grão de soja, havendo também maior concentração de ácidos graxos voláteis para o grupo controle.

Similarmente, Venturelli (2011) relatou redução no consumo de matéria seca e carboidratos não fibrosos nas vacas suplementadas com 27% de grão de soja em relação às demais rações, que não diferiram entre si. Foi observado aumento no consumo de extrato etéreo, onde os animais submetidos à dieta com 27% do grão apresentaram maiores valores. A digestibilidade aparente total dos nutrientes entre as rações experimentais diferiu, sendo que as dietas com 18 e 27% apresentaram diminuição da digestibilidade dos carboidratos totais, em relação às dietas controle e com 9% do grão. Não houve efeito das rações utilizadas nos valores de pH ruminal. A concentração de nitrogênio amoniacal ruminal foi maior para as vacas que receberam a dieta controle em relação às dietas com grão de soja.

Barletta et al. (2012) estudaram os efeitos dos níveis de inclusão de 0, 8, 16 e 24% de inclusão de grão de soja cru e integral na alimentação de vacas leiteiras em início de lactação e verificaram redução no consumo e digestibilidade de matéria seca, e nas concentrações de colesterol total e colesterol HDL e aumento nas concentrações de AST, Contudo, não foi observada diferença entre as rações experimentais para as

concentrações no soro de glicose, ureia, nitrogênio ureico, proteínas totais, albumina. Diante dos resultados obtidos, constatou-se que a inclusão de níveis crescentes de grão de soja cru e integral influenciou o consumo dos animais e as concentrações dos metabólitos sanguíneos de vacas leiteiras em lactação.

De forma similar, Calomeni et al. (2012) avaliaram os mesmos níveis de grão de soja utilizados no estudo anteriormente mencionado sobre o consumo e digestibilidade dos nutrientes em vacas leiteiras. Apesar de ter ocorrido aumento no consumo de extrato etéreo, observou-se decréscimo nos consumos de MS, e dos CNF e CHOT e no coeficiente de digestibilidade aparente total da PB. Por outro lado, os consumos de MO, PB, FDN e NDT, assim como nas digestibilidades aparente total da MS, MO, EE, CNF, CT, FDN e nos valores de NDT foram semelhantes entre as rações experimentais.

Os efeitos de diferentes formas de utilização de grão de soja integral e moído em diferentes peneiras foram avaliados em estudo conduzido por Naves et al. (2013) em vacas leiteiras no terço médio de lactação. Foi verificado que as dietas analisadas promoveram redução no consumo de matéria seca em relação à ração controle. Contudo, não houve efeito das dietas sobre as concentrações dos parâmetros sanguíneos, glicose, ureia, nitrogênio ureico no soro (NUS), proteína total, albumina exceto para colesterol total e colesterol-HDL. Diante disso, os autores concluíram que o processamento do grão de soja cru não alterou o desempenho produtivo e o perfil plasmático

A utilização de fontes de gordura (controle; óleo de soja refinado e 16% de inclusão de grão de soja *in natura* no concentrado); e sais de cálcio de ácidos graxos insaturados (SCAG) em rações para vacas em lactação sobre o desempenho produtivo foi avaliada por Freitas Jr. et al. (2013). Estes observaram que houve decréscimo nos consumos de MS e nutrientes e aumento no consumo de EE. Além disso, foi constatado maior consumo de FDN quando comparado com os SCAG. Com relação às digestibilidades do EE e CNF, o grão de soja possibilitou o aumento e redução, respectivamente destes nutrientes.

O uso de duas fontes nitrogenadas, farelo de algodão e grão de soja cru e o efeito de dois teores proteicos na dieta sobre o consumo e digestibilidade aparente total de vacas leiteiras foi avaliado por Migliano et al. (2016). Estes observaram efeito de interação entre a fonte nitrogenada e o teor de PB sobre o consumo de MS. Dessa forma, vacas alimentadas com grão de soja cru e integral tiveram maior CMS quando o

teor de PB da dieta foi de 130 g PB/kg MS, enquanto que as vacas alimentadas com farelo de algodão apresentaram maior CMS quando o teor de PB da dieta foi de 148 g PB/kg MS. Com relação aos resultados de digestibilidade, foi observado que a digestibilidade da FDN foi maior em animais alimentados com grão de soja cru e integral no momento em que foi utilizado como principal fonte nitrogenada da dieta. Por outro lado, a digestibilidade da PB não foi alterada pelas fontes nitrogenadas.

Gandra et al. (2016) determinaram os efeitos da quitosana e grão de soja integral sobre o consumo e digestibilidade de nutrientes e metabólitos sanguíneos de novilhas leiteiras. Diante dos resultados concluiu-se que tanto a quitosana quanto o grão de soja integral não alteraram o consumo de nutrientes e a digestão total embora, ambos tenham promovido o aumento do colesterol HDL no sangue de novilhas.

2.5 Associação da quitosana com gordura protegida

Estudos tem buscado gerar informações relevantes a respeito do mecanismo de ação da quitosana ou associação desta a ingredientes classificados como concentrados energéticos, tais como farelo ou grão de soja e óleo vegetal em dietas no metabolismo e dinâmica ruminal (WENCELOVA et al., 2014).

A biohidrogenação é responsável pela diminuição do fluxo intestinal de ácidos graxos poli-insaturados para o duodeno. Segundo Harfoot e Hazlewood (1997) as bactérias lipolíticas e outras bactérias que são responsáveis pela biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados são gram-positivas. Além disso, esse processo atinge parte considerável dos ácidos graxos poli-insaturados, e pode ser influenciada por vários fatores, tais 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 e CHILLIARD, 1997).

Dessa forma, aditivos que atuam sobre as gram-positivas, como a quitosana, podem inibir este processo, elevando a concentração desses ácidos graxos no rúmen e o aporte de isômeros do ácido linoléico que chegam ao duodeno. Logo, a manipulação da fermentação ruminal surge como alternativa para que se promova um aumento na proporção de ácidos graxos poli-insaturados que chegam ao duodeno.

A biohidrogenação do ácido linoléico em uma cultura de microrganismos ruminais mostrou-se inibida através da utilização de ionóforos, com acúmulo de trans-

18:1 e CLA (Fellner et al., 1997). A inibição da biohidrogenação (5%) por ionóforos e baixo pH também foi encontrada por Van Nevel e Demeyer (1996a, c), porém foi menos pronunciada do que a inibição da lipólise (20%).

A inibição da lipólise e/ou da biohidrogenação pode explicar o aumento do grau de insaturação nos lípidios do rúmen e duodeno (Kobayashi et al., 1992) e / ou na gordura corporal em animais alimentados com dietas concentradas ou tratados com aditivos ionóforos, por exemplo. Dessa forma, pode-se inferir que a inclusão da quitosana como alternativa aos ionóforos convencionais promove similarmente aos ionóforos, a diminuição do processo de biohidrogenação pela seleção bacteriana e aumente consequentemente o aporte de ácidos graxos insaturados no duodeno.

2.6 Estimativa de fluxo reticular

O conhecimento dos mecanismos sucessivos da digestão dos nutrientes, nos diferentes compartimentos do sistema digestivo dos ruminantes, podem trazer respostas ao desempenho e produção animal. Estes animais tem seu estômago dividido em quatro compartimentos: rúmen, retículo, omaso e abomaso, os quais podem ser avaliados através da utilização de animais fistulados.

Segundo Dias (2009), as fístulas permitem a coleta de digesta e são usadas para a infusão de nutrientes ou indicadores para o monitoramento dos aspectos químicos (hidrólise e síntese) e físicos (fluxo) da digestão através do acesso ao interior do trato digestivo. De modo que, para a quantificação dos nutrientes que estão disponíveis para a absorção no intestino delgado, e assim determinação do fluxo, é de fundamental importância entender o que acontece com os nutrientes antes de chegar ao sítio de absorção (FACIOLA, 2014). Sendo assim, a medição do fluxo ruminal de matéria seca, por exemplo, permite estimar as taxas de passagem e de digestão dos nutrientes das dietas. Ainda segundo o mesmo autor, o desafio quando se avalia animais ruminantes, é a presença da população microbiana no rúmen-retículo que pode alterar grandemente as características do alimento e; portanto, os nutrientes disponíveis para a absorção são dessa forma, diferentes de nutrientes da dieta.

Ao longo dos anos, várias técnicas têm sido realizadas com o objetivo de determinar o fluxo dos nutrientes nos compartimentos. Para a estimativa do fluxo ruminal, por exemplo, a maioria dos estudos utiliza a coleta da digesta duodenal ou

abomasal (CRAWFORD et al., 2008). No entanto, as fístulas duodenais e abomasais podem apresentar complicações e diminuir o tempo em que o animal permanece no experimento, devido a isso esses animais precisam de cuidados especiais (HARMON e RICHARDS, 1997).

Com o objetivo de aumentar a permanência dos animais em experimentos, e permitir maior conforto ao mesmo, muitos pesquisadores buscam reduzir o número de fístulas em um mesmo animal (DIAS, 2009). Além disso, para evitar cirurgias invasivas no duodeno e/ou abomaso, a obtenção de amostras para determinação de fluxo de nutrientes, em compartimentos alternativos, como o retículo e omaso, vem se tornando cada vez mais frequente e apresentam o benefício de serem menos invasivas, através de uma única fístula localizada no rúmen (HUHTANEN et al., 1997).

A utilização de uma única fistula no rúmen apresenta diversas vantagens, como menor probabilidade de complicação pós-cirúrgica, recuperação mais rápida do animal e facilidade de manutenção e cuidados dos mesmos. Dessa forma, isso contribui para a permanência por mais tempo dos animais em experimentos do que os fistulados adicionalmente no abomaso ou duodeno, pois animais fistulados nesses compartimentos podem apresentar rejeição das cânulas, prejudicando por consequência o desempenho (HUHTANEN et al., 1997).

O retículo é o órgão responsável por impulsionar a digesta pelo orifício retículo-omasal e regular o fluxo dos nutrientes para o trato digestório posterior (SISSONS et al., 1978; SUTHERLAND, 1988). De acordo com Dardillat e Baumont (1992) e Hristov (2007) a composição da digesta reticular é consistente e as partículas encontradas no retículo são propensas a deixar o rúmen (MCBRIDE et al., 1984). Dessa forma, a digesta coletada no retículo poderia ser utilizada para estimar o fluxo ruminal, utilizando-se a fístula ruminal.

A digesta reticular é composta por pequenas partículas que são transferidas para o omaso (DARDILLAT e BAUMONT, 1992) e grandes partículas, que podem ficar retidas devido a mecanismos de seletividade no momento da passagem da digesta.

A coleta no retículo pode ser alternativa viável quando comparada com coleta omasal/duodenal. Assim, foi proposto por Huhtanen et al. (1997) e Ahvenjärvi et al. (2000) a técnica da utilização de uma mangueira via fístula ruminal e aspiração do conteúdo reticular com auxílio de bomba de vácuo.

O estudo da substituição dessas coletas também foi avaliado por Hristov (2007) e Krizsan et al. (2010) para estimar o fluxo ruminal e os coeficientes de digestibilidade ruminal. A técnica proposta por Krizsan et al. (2010), para coleta e amostragem reticular consiste em introduzir através da fístula no rúmen, um recipiente fechado até o retículo, abrir para coleta da amostra, e fechá-lo novamente para que não haja contaminação com o conteúdo ruminal.

A coleta reticular tem como vantagem em comparação a coleta omasal que pode ser realizada com bomba de vácuo ou não. A realização dessa técnica, contudo, ainda apresenta limitações, pois a amostragem pode não ser representativa (FACIOLA, 2014), devido a ligação ampla com o rúmen e cuidados para não contaminação com o conteúdo ruminal, além da necessidade de maiores estudos neste compartimento.

Apesar das limitações acima descritas, Hristov (2007) em seu experimento com vacas Holandesas relatou que a técnica reticular de amostragem pode fornecer estimativas confiáveis para degradabilidade ruminal da MS e dos seus constituintes.

Krizsan et al. (2010) avaliando as coletas reticular e omasal em vacas multiparas observaram que o fluxo de nutrientes e proteína microbiana do ambiente ruminal pode ser medido da amostragem reticular combinado com um sistema de triplo marcador. Nos ensaios de digestão, e como auxílio a estimativa do fluxo de digesta, nos diferentes compartimentos torna-se necessária também a utilização de indicadores, pois através destes é possível conhecer, por exemplo, a digestibilidade total, ruminal ou intestinal de diferentes dietas (RIBEIRO, 2013).

Além disso, tal como acontece com a técnica de amostragem no canal omasal, a amostragem do retículo também pode evitar a interferência de degradação abomasal de nitrogênio microbiano e secreções endógenas deste componente. A técnica reticular de amostragem fornece uma alternativa promissora a amostragem do canal omasal porque há menos interferência no animal, e não é necessário equipamento elaborado (KRIZSAN et al., 2010).

No entanto, Mariz et al. (2013) em trabalho avaliando o fluxo reticular e omasal de nutrientes por meio de marcador duplo, Co-EDTA e FDNi, e coletas omasal e reticular em bovinos mestiços relataram que devido à facilidade de colheita, estudos adicionais devem ser realizados com a digesta reticular porque inúmeros nutrientes na digesta ruminal são semelhantes aos nutrientes da digesta omasal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização, animais, manejo experimental e dietas

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, localizada em São Gonçalo dos Campos - BA, Brasil.

Todos os protocolos para a pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (aprovação nº 43/2013), Universidade Federal da Bahia, Brasil (Anexo 1).

Foram utilizados quatro búfalos Murrah (*Bubalus bubalis*), machos, castrados, com aproximadamente 24 meses de idade, com peso corporal inicial médio de 351 ± 15 kg, fistulados com cânulas de silicone (Kehl ®) de 4 polegadas. Os búfalos foram distribuídos em um delineamento em quadrado latino 4×4 , sendo avaliadas as seguintes dietas experimentais: 1) CO = Controle (composto por uma dieta basal à base de farelo de soja, milho moído, mistura mineral e ureia); 2) QT = Quitosana, inclusão de 150 mg / kg de peso corporal; 3) GSI = Grão de soja cru e integral, 100 g/ kg da matéria seca total; 4) GSI+QT = Quitosana + Grão de soja cru e integral.

Os animais foram alocados em baias individuais de 14 m², com cochos e fornecimento de água *ad libitum*. A fim de proporcionar maior conforto e bem-estar, os animais foram liberados em um curral de descanso pela manhã, uma hora antes da alimentação, em todo o período experimental. Além disso, estes foram submetidos diariamente a banhos de aspersão para o conforto térmico e bem-estar.

O período experimental foi constituído de quatro períodos de 23 dias sendo 12 dias destinados à adaptação dos animais às dietas e ao manejo e 11 dias consecutivos para a coleta de dados.

As dietas foram formuladas mantendo-se relação volumoso:concentrado de 75:25, sendo utilizado como volumoso a silagem de sorgo e o concentrado foi constituído de grão de milho moído, farelo de soja e grão de soja cru e integral (Tabelas 1 e 2). Os búfalos foram alimentados duas vezes por dia (08 e às 15h) com duas dietas experimentais isonitrogenadas (Tabela 3) formuladas para animais com aproximadamente 380 kg de peso corporal, de acordo com as recomendações do *Cornell Net Carbohydrate and Protein System* (CNCPS) (PAUL e LAL, 2010).

A quitosana foi adicionada através da cânula ruminal em proporção de 150 mg / kg de peso corporal, duas vezes ao dia, antes da alimentação. Sendo que os animais foram pesados antes de cada período de coleta para ajuste da dose de quitosana a ser fornecida. A quitosana utilizada apresentou uma taxa de desacetilação de 86,3%, com os seguintes atributos técnicos: 0,33 mg / mL densidade aparente; pH 7,9 e viscosidade <200 cPs (Polymar Indústria, Comércio Importação e Exportação Ltd., Fortaleza, CE).

Tabela 1. Composição químico-bromatológica dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais

| Item (g/kg MS) | Silagem de sorgo | Farelo de soja | Milho Moído | Grão de soja | Quitosana |
|--------------------------------|------------------|----------------|-------------|--------------|-----------|
| Matéria Seca | 307,3 | 949,2 | 932,1 | 952,6 | 883,0 |
| Matéria Orgânica | 946,8 | 923,8 | 982,9 | 940,3 | 960,9 |
| Matéria Mineral | 53,2 | 76,2 | 17,1 | 59,7 | 39,1 |
| Proteína Bruta | 82,0 | 433,5 | 89,4 | 351,1 | 438,0 |
| NIDN ¹ | 368,2 | 54,9 | 97,0 | 169,2 | 46,0 |
| NIDA ² | 143,9 | 23,7 | 28,1 | 69,3 | - |
| Extrato Etéreo | 36,4 | 20,8 | 41,1 | 175,3 | 5,9 |
| FDN ³ | 642,6 | 143,3 | 152,2 | 240,4 | 959 |
| FDN _{cp} ⁴ | 585,9 | 134,6 | 119,9 | 154,2 | - |
| CNF ⁵ | 185,8 | 326,2 | 700,2 | 173,5 | - |
| FDA ⁶ | 447,2 | 74,3 | 26,2 | 126,4 | 11,3 |
| FDN _i ⁷ | 183,9 | 17,2 | 28,9 | 16,5 | - |
| Lignina | 97,7 | 5,2 | 6,4 | 18,8 | 3,9 |
| NDT ⁸ | 555,0 | 804,8 | 857,3 | 905,3 | - |

¹nitrogênio insolúvel em detergente neutro (% do NT); ²nitrogênio insolúvel em detergente ácido (% do NT); ³fibra em detergente neutro; ⁴fibra em detergente neutro livre de cinzas e proteína; ⁵carboidratos não fibrosos (Hall, 2000); ⁶fibra em detergente ácido; ⁷fibra em detergente neutro indigestível (Detmann et al., 2012); ⁸nutrientes digestíveis totais estimados segundo as equações do NRC (2001).

3.2 Amostragem e análises laboratoriais

As amostras dos ingredientes das dietas foram colhidas no início de cada período experimental. Já as amostras de sobras foram colhidas diariamente durante o período de coleta de dados, totalizando quatro amostras compostas por período. As amostras compostas foram obtidas ao final de cada período através da realização de um *pool* de amostras diárias por cada animal e período. Estas foram armazenadas e congeladas a -20°C para posteriores análises.

As análises químico-bromatológicas de ingredientes, sobras foram realizadas no Laboratório de Forragem e Pastagem da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), localizado em Itapetinga - BA, Brasil. As amostras foram então descongeladas e submetidas a secagem em estufa de ventilação forçada a 55 ° C por 72 h, sendo posteriormente moídas em moinho de faca providos de peneiras de 1 mm.

Tabela 2. Porcentagem de inclusão dos ingredientes e químico-bromatológica do concentrado

| Ingrediente (g/kg MS) | Dietas experimentais | |
|-------------------------------|----------------------|--------------|
| | Controle | Grão de soja |
| Milho moído | 539,2 | 392,0 |
| Farelo de soja | 240,8 | - |
| Grão de soja | - | 400,0 |
| Ureia | 36,0 | 24,0 |
| Sal comum | 24,0 | 24,0 |
| Mineral ¹ | 160,0 | 160,0 |
| Composição química (g/kg MS) | | |
| Matéria seca | 951,5 | 954,4 |
| Matéria orgânica | 752,4 | 761,4 |
| Proteína bruta | 255,0 | 242,9 |
| Extrato etéreo | 27,1 | 86,2 |
| Fibra em detergente neutro | 116,6 | 155,8 |
| Carboidratos não-fibrosos | 456,0 | 343,9 |
| FDA | 32,0 | 60,8 |
| FDNi | 19,7 | 17,9 |
| Lignina | 4,7 | 10,0 |
| Nutrientes digestíveis totais | 578,8 | 502,3 |

¹composição mineral por Kg do produto: 128g de cálcio, 44g de fósforo, 178g de sódio, 12g de enxofre, 5g magnésio, 107mg de cobalto, 1,25g de cobre, 50mg de cobre, 50mg de iodo, 750mg de manganês, 12mg de selênio, 3,7g de zinco, 1,4g de ferro e 440mg de flúor.

A análise químico-bromatológica dos ingredientes das dietas (Tabela 1) foi realizada para determinação da matéria seca (MS - Método: 950.05; AOAC, 2000), matéria mineral (MM - Método: 942.05; AOAC, 2000); proteína bruta (PB - método 984.13; AOAC, 2000) utilizando-se o fator de conversão $[N \times 6,25]$; extrato etéreo (EE - Método: 920.39; AOAC, 2000). Para determinação do teor de matéria orgânica (MO), foi utilizada a equação $MO (g/kg) = 100 - MM (g/kg)$ descrita por Zaklouta et al. (2011).

Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram determinados pela metodologia descrita por Van Soest et al. (1991). Para a análise da lignina, o resíduo de fibra foi tratado em detergente ácido com ácido sulfúrico a 72% (Silva & Queiroz, 2002). Os carboidratos não-fibrosos (CNF) foram estimados pela fórmula proposta por Hall (2000): $CNF=100-[(\%PB-\%PB\text{ ureia}+\%ureia)+\%EE+\%MM+\%FDN]$. Os nutrientes digestíveis totais dos ingredientes foram estimados segundo NRC (2001), onde $NDT=PBd+FDNd+(EEd*2,25)+CNFd$.

Tabela 3. Porcentagem de inclusão dos ingredientes e químico-bromatológica das dietas experimentais

| Ingredientes (g/kg MS) | Dietas experimentais | |
|-------------------------------------|----------------------|--------------|
| | Controle | Grão de soja |
| Silagem de sorgo | 750,0 | 750,0 |
| Milho moído | 134,8 | 98,0 |
| Farelo de soja | 60,2 | - |
| Grão de soja | - | 100,0 |
| Ureia | 9,0 | 6,0 |
| Sal comum | 6,0 | 6,0 |
| Mineral ¹ | 40,0 | 40,0 |
| Composição química (g/kg MS) | | |
| Matéria seca | 464,4 | 469,1 |
| Matéria orgânica | 898,2 | 900,4 |
| Proteína bruta | 125,2 | 122,2 |
| Extrato etéreo | 34,1 | 48,8 |
| Fibra em detergente neutro | 543,3 | 549,9 |
| Carboidratos não-fibrosos | 253,4 | 225,3 |
| Nutrientes digestíveis totais | 641,2 | 649,0 |

¹composição mineral por Kg do produto: 128g de cálcio, 44g de fósforo, 178g de sódio, 12g de enxofre, 5g magnésio, 107mg de cobalto, 1,25g de cobre, 50mg de cobre, 50mg de iodo, 750mg de manganês, 12mg de selênio, 3,7g de zinco, 1,4g de ferro e 440mg de flúor.

O conteúdo de fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) foi quantificado pelo método INCT CA-F 009/1 descrito por Detmann et al. (2012). As amostras de ingredientes, sobras e fezes foram secas a 55°C em estufa de ventilação forçada por 72 horas, sendo moídos em utilizando-se peneira de 2 mm (moinho Wiley, AH Thomas, Filadélfia, NY, EUA) e em seguida, colocados em sacos filtrantes F57 Ankom de 4 × 5 cm (20 mg MS / cm²) previamente pesados. Essas amostras foram então incubadas por

288 horas no rúmen de dois búfalos previamente adaptados a uma dieta similar a fornecida aos animais no período experimental.

3.3. Consumo e digestibilidade de nutrientes

A quantidade de alimento oferecida aos animais foi ajustada diariamente de acordo com o consumo de matéria seca do dia anterior, permitindo-se sobras de 5 a 10% da quantidade total fornecida, para evitar limitações de consumo. O consumo de alimentos foi registrado diariamente sendo calculado como a diferença entre o alimento oferecido e as sobras. Amostras das dietas e sobras de cada animal também foram coletadas.

Foi adotada técnica de coleta total de fezes durante um período de 24 horas no 18º dia de cada período experimental, sendo obtidas quatro amostras por animal ao final do experimento. As fezes de cada animal foram coletadas após a defecação espontânea e armazenadas em um recipiente de plástico. No final de cada período de coleta de 24 horas, determinou-se o peso total do conteúdo fecal homogeneizado do recipiente. Foram coletadas amostras de aproximadamente 10% das fezes de cada animal, que foram armazenadas em sacos plásticos e imediatamente congeladas para posteriores análises laboratoriais. Previamente à moagem, as amostras foram descongeladas e secas em estufa de ventilação forçada a 65°C por 72 h, sendo então processadas em moinho Willey providas de peneira de 1 mm.

As amostras de fezes foram analisadas para a determinação dos conteúdos de MS, MO, PB, EE, carboidratos totais (CT), FDN, CNF e NDT de acordo com as metodologias utilizadas para as amostras de ingredientes. As digestibilidades dos nutrientes foram estimadas com base no consumo de nutrientes (kg / dia) e na sua excreção nas fezes (kg / dia).

3.4. Análise de fermentação ruminal

As amostras de líquido ruminal foram coletadas no 13º dia de cada período experimental, combinando nove alíquotas colhidas a partir de nove pontos diferentes no rúmen (dorsal, médio e ventral), totalizando sete tempos. As coletas ocorreram antes da alimentação pela manhã (0 h), e 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h depois. Após a coleta, o líquido

ruminal foi filtrado com auxílio de uma malha de 1 mm com o objetivo de avaliar o pH, a concentração de N-amoniacoal e os ácidos graxos voláteis (AGV).

Os valores de pH do rúmen foram determinados pela leitura imediata usando um medidor de pH digital. Vinte mililitros (20 mL) de líquido ruminal foram coletados, armazenados em recipientes plásticos e imediatamente congelados a -20°C para posteriores análises. A avaliação das concentrações de AGV foi realizada após descongelamento prévio das amostras, estas foram centrifugadas a $1300 \times g$ durante 20 min. Após a centrifugação foi colocado 1 mL do sobrenadante em um tubo de ensaio sendo adicionados 1 mL de ácido metafosfórico a 25%. O tubo foi então identificado e armazenado em freezer a -20°C para as determinações de acetato, propionato e butirato utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), utilizando-se um comprimento de ondas de 210 nm de acordo com a metodologia descrita por Mathew et al. (1997).

Para análise de nitrogênio amoniacoal as amostras foram descongeladas sendo adicionados 0,5 mL de solução de tungstato de sódio a 10% a 1,5 mL de amostra, as quais foram imediatamente centrifugadas ($1800 \times g$, 15 min). Posteriormente, foram pipetados 50 μL do sobrenadante e adicionado 1 mL do reagente tampão do kit comercial (K047 ©, Bioclin, Belo Horizonte, MG). Os tubos foram então arrolhados, depois agitados e colocados em banho-maria (37°C por 5 minutos). Em seguida, a solução oxidante foi adicionada para que fosse verificada alteração da coloração das amostras. Após as amostras terem atingido a temperatura ambiente foi procedida a leitura com auxílio de espectrofotômetro (ESPECTROFOTOMETRO MONO FEIXE SP-22, Curitiba, BIOSPECTRO, Brasil®) utilizando-se absorvância com comprimento de onda de 600 nm.

3.5. Metabólitos sanguíneos

As amostras de sangue foram coletadas no 16º dia de cada período experimental por punção da veia jugular, às 08:00 h, antes do fornecimento das dietas, para a determinação dos metabólitos sanguíneos. Imediatamente após a coleta, os tubos foram centrifugados a $1800 \times g$ durante 15 min para a separação do soro. O soro obtido foi então transferido para tubos Eppendorf® estéreis identificados e armazenados a -20°C para posterior análises laboratoriais.

As concentrações séricas de glicose, triglicerídeos e colesterol foram procedidas através de métodos enzimáticos usando kits comerciais (Glicose enzimática líquida, Colesterol enzimático líquido e Triglicérides enzimático líquido, Doles Reagentes Ltd., Goiânia, GO, Brasil) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 510 nm. As proteínas plasmáticas totais foram avaliadas utilizando kit comercial (Proteínas totais, Doles Reagentes Ltd., Goiânia, GO, Brasil) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimentos de onda de 550 nm e a ureia foi medida pelo método cinético usando kit comercial (Urea UV) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 340 nm. O conteúdo de globulina foi calculado através da diferença entre o conteúdo de proteína total e a albumina, sendo as quantidades expressas em g / dL. Todas as leituras foram realizadas com auxílio do espectrofotômetro semi-automático (SBA 200®, CELM, São Caetano do Sul, SP, Brasil).

3.6. Dinâmica ruminal

Para determinação da dinâmica ruminal todo o conteúdo do rúmen foi retirado manualmente através de cânula ruminal 4 horas e meia após a alimentação no 20º dia, e 2 horas antes da alimentação no 21º de cada período experimental (HARVATINE e ALLEN, 2006). O conteúdo ruminal total foi quantificado quanto ao peso e o volume em tambores graduados. Durante a retirada do conteúdo ruminal, alíquotas de 10% da digesta foram separadas para permitir amostragem acurada da composição ruminal.

As alíquotas foram filtradas em peneira de náilon (1,0 mm de porosidade) para separação do conteúdo sólido do líquido (para determinação do tamanho médio de partícula). As frações de amostras do conteúdo ruminal nas fases sólida e líquida foram pré-secas e corrigidas para matéria seca original, e acondicionadas em freezer à -20°C, até a realização das análises da matéria seca, matéria orgânica, matéria mineral e fibra em detergente neutro (HAVERTINE e ALLEN, 2006). A taxa de renovação ruminal, taxa de passagem pelo rúmen, e a taxa de digestão ruminal de cada nutriente foram calculadas de acordo com Oba e Allen (2003);

$$\text{Taxa de renovação do rúmen (\%/h)} = \frac{(\text{consumo do nutriente/h} / \text{tamanho do compartimento (massa ruminal do nutriente)})}{24} \times 100$$

A taxa de passagem do rúmen (% / h) =
 (fluxo do nutriente no compartimento/ pool do nutriente no rúmen) / 24 × 100

A taxa de digestão no rúmen (%/ h) =
 taxa de turnover no rúmen (% / h) - A taxa de passagem do rúmen (% / h)

3.7. Fluxo reticular de nutrientes

No 14°, 15° e 16° dia de cada período experimental, foram coletadas amostras das digestas ruminal e reticular a cada 9 horas, com o objetivo de representar o fluxo real das digestas, perfazendo um total de oito sub-amostras por período de cada digesta por animal (KRIZSAN et al., 2010).

Para cada coleta de amostra da digesta ruminal, adotou-se nove pontos do rúmen a partir da cânula (cranial dorsal, cranial médio e cranial ventral; medial dorsal, medial médio e medial ventral; caudal dorsal, caudal médio e caudal ventral), para representar o conteúdo ruminal. Após as coletas, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e congeladas a -20°C para posteriores análises.

Para a amostragem da digesta reticular, foi inserida uma mangueira acoplada à bomba de vácuo, via cânula ruminal, passando do rúmen até o compartimento do retículo e foi succionado 700 mL da digesta como amostra por coleta (HUHTANEN et al., 1997; AHVENJÄRVI et al., 2000). As amostras foram acondicionadas em garrafas plásticas e congeladas para posteriores análises.

Após período experimental, todas as amostras das digestas ruminal e reticular foram descongeladas no laboratório da Fazenda Experimental do EMEVZ-UFBA. As oito sub-amostras de cada digesta foram homogeneizadas formando uma amostra composta por animal e por período contabilizando 16 amostras compostas representativas (4 digestas/animais x 4 períodos); as digestas ruminal e reticular foram pesadas (kg) e separadas em amostra de fase sólida e amostra de fase líquida por malha de 1 mm de porosidade.

Após separação das fases das digestas ruminal e reticular, as amostras de cada fase foram pesadas (kg), secas em estufa de ventilação forçada à 65°C, sendo posteriormente processadas em moinhos providos de peneiras de crivo de 2 e 1 mm e, então, acondicionadas para posteriores análises de matéria seca (MS), matéria orgânica

(MO), matéria mineral (MM), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), conforme metodologias da AOAC (2000) descrita para as análises dos ingredientes das rações. A fibra em detergente neutro potencialmente digestível (FDNpd) foi obtida pela fórmula: $FDNpd \text{ (g/kg)} = FDN \text{ (g/kg)} - FDNi \text{ (g/kg)}$. Foi adotado o sistema de único indicador sendo a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) usada como indicador para a fase sólida para o cálculo do fluxo reticular (ROTTA et al., 2014). Este foi calculado como descrito por Barletta et al. (2016) e Bettero et al. (2017):

$$\text{Fluxo reticular da MS (g/d)} = \frac{\text{consumo de FDNi (g/d)}}{\text{concentração reticular de FDNi (g/g)}}$$

3.8. Comportamento ingestivo

Para a avaliação do comportamento ingestivo, os búfalos foram submetidos a períodos de observação visual no 23º dia de coleta, às 08 horas logo após o início do fornecimento das dietas e persistiram durante 24 horas consecutivas, para cada animal.

No registro do tempo despendido em alimentação, ruminação e ócio, foi adotada a observação contínua e individualizada dos animais em intervalos entre observações de cinco minutos. Foram contabilizados o número de períodos em alimentação, ruminação e ócio pelo número de sequências de atividades observadas na planilha de anotações. Foi calculada a duração média diária desses períodos de atividades dividindo-se a duração total de cada atividade (alimentação, ruminação e ócio em min/dia) pelo seus respectivos números de períodos registrados.

Durante a observação noturna dos animais, o ambiente foi mantido com iluminação artificial por dois dias para adaptação dos mesmos a luminosidade.

Foram realizadas três observações em cada animal, em três períodos diferentes do dia (manhã, tarde e noite). Nestes períodos foram contabilizados os números de mastigações merícicas por bolo ruminal e contabilizado o tempo despendido em cada bolo com o auxílio de cronômetros digitais.

As eficiências de alimentação (EAL) e ruminação da MS e FDN e o tempo de mastigação total (TMT min/dia) foram calculados conforme a metodologia descrita por Burger et al. (2000). As eficiências de alimentação e ruminação foram obtidas utilizando-se as seguintes equações:

$$EALMS = CMS/TI$$

$$EALFDN = CFDN/TI$$

Em que EALMS = eficiência de alimentação de MS (g MS ingerida/h); CMS (g) = consumo diário de matéria seca; CFDN (g) = consumo diário da FDN; TI = tempo gasto em ingestão diariamente.

$$ERUMS = CMS/TRU$$

$$ERUFDN = CFDN/TRU$$

Em que ERUMS = eficiência de ruminação da MS (g MS ruminada/h); ERUFDN = eficiência de ruminação da FDN (g FDN ruminada/h), TRU = tempo gasto em ruminação diariamente (h).

Tempo de mastigação total:

$$TMT = TI + TRU$$

Em que TMT = tempo de mastigação total (min/dia); TI = tempo gasto em ingestão diariamente; TRU = tempo gasto em ruminação diariamente (h).

Na estimativa das variáveis comportamentais de alimentação e ruminação, eficiência alimentar, eficiência em ruminação e consumo médio de MS e FDN por período de alimentação foi considerado o consumo voluntário de MS e FDN do 23º dia, sendo as sobras do dia correspondente computada.

3.9 Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o procedimento PROC MIXED (SAS Inst. Inc., Cary, NC) com delineamento em quadrado latino 4×4 e arranjo fatorial 2×2 , de acordo com o modelo abaixo:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + P_j + D_k + e_{ijk}$$

Em que, Y_{ijk} = variáveis observadas do i -ésimo animal, j -ésimo período e k -ésima dieta; μ = média geral do experimento para a variável; B_i = efeito do i -ésimo búfalo, variando de 1 a 4; P_j = efeito do j -ésimo período, variando de 1 a 4; D_k = efeito

da k -ésima dieta, variando de 1 a 4; e e_{ijk} = erro aleatório devido ao animal, período e dieta.

Os dados de fermentação ruminal (0, 2, 4, 6, 8, 10 ou 12 h após a alimentação), pH, N-NH₃ e AGV foram avaliados estatisticamente como medidas repetidas no tempo utilizando-se o procedimento MIXED do SAS (9.1, 2004), de acordo com o modelo abaixo:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + P_j + D_k + T_l + (T \times D)_{lk} + e_{ijkl},$$

Em que Y_{ijk} = observação do animal i , no período j , submetida a dieta k e tempo l ; μ = efeito geral de média; B_i = efeito fixo do búfalo i ($i = 1-4$); P_j = efeito fixo do período j ($j = 1-4$); D_k = efeito fixo da dieta k ($k = 1-4$); T_l = efeito fixo do tempo l ($l = 0, 2, 4, 6, 8, 10$ e 12 h após a alimentação); $(T \times D)_{lk}$ = efeito fixo da interação entre dieta k e tempo l ; e e_{ijkl} = erro aleatório de animal, período e dieta.

A metodologia Akaike foi utilizada para determinar a matriz de covariância. Os graus de liberdade foram definidos de acordo com o método de Kenward e Roger (1997). As respostas à inclusão de quitosana e o grão de soja integral foram testadas e declaradas significativas em $P < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Consumo e digestibilidade aparente

Não foi verificado efeito das dietas ($P > 0,05$) sobre os consumos de MS, MO, PB, CT, FDNi e FDN potencialmente digestível. Houve aumento no consumo de EE ($P < 0,01$) e diminuição do consumo de CNF ($P = 0,03$) para os animais alimentados com dieta com grão de soja integral (GSI) (Tabela 4).

Esse comportamento pode ser atribuído ao aumento das concentrações de EE nas dietas contendo grão de soja integral (Tabela 2), conforme relatado por Gandra et al. (2016). Além disso, a inclusão de lipídios na dieta reduziu a quantidade de carboidratos não fibrosos, explicando assim a redução do consumo desta fração para os búfalos alimentados com as dietas contendo GSI. O aumento do consumo de EE com a utilização do grão de soja cru e integral foi observado por Araújo et al. (2015), Mingoti et al. (2016) e Paiva et al. (2016).

Tabela 4. Efeitos das dietas experimentais sobre o consumo de nutrientes

| Item | Dietas experimentais ¹ | | | | EPM ² | Valor de P | | |
|----------------------------|-----------------------------------|------|------|--------|------------------|------------|-------|--------|
| | CO | QT | GSI | GSI+QT | | QT | GSI | QT*GSI |
| Consumo kg/dia | | | | | | | | |
| Matéria seca | 8,97 | 9,21 | 8,59 | 8,95 | 0,26 | 0,61 | 0,58 | 0,91 |
| Matéria orgânica | 8,04 | 8,28 | 7,73 | 8,06 | 0,23 | 0,58 | 0,60 | 0,93 |
| Proteína bruta | 1,14 | 1,15 | 1,04 | 1,07 | 0,03 | 0,76 | 0,26 | 0,88 |
| Extrato etéreo | 0,31 | 0,32 | 0,42 | 0,42 | 0,02 | 0,90 | <0,01 | 0,83 |
| Carboidratos totais | 6,58 | 6,81 | 6,27 | 6,56 | 0,18 | 0,52 | 0,50 | 0,94 |
| Fibra em detergente neutro | 4,52 | 4,72 | 4,53 | 4,74 | 0,13 | 0,47 | 0,96 | 0,98 |
| FDN,% PV | 1,16 | 1,24 | 1,19 | 1,22 | 0,03 | 0,50 | 0,96 | 0,74 |
| FDNi | 1,24 | 1,31 | 1,21 | 1,27 | 0,03 | 0,44 | 0,65 | 0,97 |
| FDNpd | 3,27 | 3,41 | 3,31 | 3,47 | 0,09 | 0,47 | 0,81 | 0,97 |
| Carboidratos não fibrosos | 2,32 | 2,33 | 1,85 | 1,93 | 0,10 | 0,80 | 0,03 | 0,86 |

¹Controle (CO); quitosana (QT); grão de soja (GSI); quitosana e grão de soja (GSI+QT). ² erro padrão da média.

A associação entre a quitosana e o grão de soja (GSI+QT) não apresentou efeito, resultado semelhante foi observado com a dieta contendo apenas QT, demonstrando que

a quitosana também não altera o consumo de MS e de nutrientes quando associada a uma fonte de gordura.

Não foi verificado efeito das dietas ou da interação entre GSI e QT ($P > 0,05$) sobre a digestibilidade da MS e nutrientes. No entanto, houve aumento ($P = 0,04$) na digestibilidade do EE nas dietas contendo GSI (Tabela 5). Araújo et al. (2015) relataram um aumento linear na digestibilidade de MS, FDN e PB com doses de quitosana de até 150 mg / kg PC, em novilhos Nelore. No presente estudo, não foi observado diferenças na digestibilidade da MS usando a QT na dose de 150 mg / kg de PC, e resultado semelhante foi observado por Paiva et al. (2016) utilizando doses de quitosana de 150 e 225 mg / kg de PC em vacas leiteiras. O aumento da digestibilidade do EE era esperado devido ao maior teor de EE presente na dieta contendo grão de soja em comparação com o farelo de soja (Tabela 3).

De acordo com o NRC (2001), a concentração de lipídios na dieta pode exercer efeito na digestibilidade do EE, pois, a adição de lipídeos na dieta promove aumento na digestibilidade aparente de compostos solúveis em éter, já que o aumento de extrato etéreo na dieta torna a perda endógena de compostos lipídicos menos significativa em relação ao extrato etéreo ingerido (PALMQUIST, 1991).

Tabela 5. Efeitos das dietas experimentais sobre a digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes

| Item | Dietas experimentais ¹ | | | | EPM ² | Valor de P ³ | | |
|-------------------------------|-----------------------------------|-----|-----|--------|------------------|-------------------------|------|-------|
| | CO | QT | GSI | GSI+QT | | QT | GSI | QT*GS |
| Digestibilidade g/kg de MS | | | | | | | | |
| Matéria Seca | 748 | 708 | 731 | 717 | 1,69 | 0,48 | 0,91 | 0,72 |
| Materia orgânica | 752 | 718 | 738 | 725 | 1,73 | 0,54 | 0,92 | 0,78 |
| Proteína bruta | 772 | 719 | 770 | 736 | 1,62 | 0,23 | 0,83 | 0,79 |
| Extrato etéreo | 874 | 838 | 893 | 892 | 0,93 | 0,27 | 0,04 | 0,29 |
| Carboidratos totais | 742 | 712 | 722 | 712 | 1,85 | 0,63 | 0,81 | 0,80 |
| Fibra em detergente neutro | 654 | 595 | 634 | 611 | 2,40 | 0,45 | 0,97 | 0,74 |
| Carboidratos não fibrosos | 830 | 837 | 814 | 829 | 1,81 | 0,79 | 0,77 | 0,92 |
| Nutrientes digestíveis totais | 786 | 739 | 762 | 756 | 1,85 | 0,52 | 0,93 | 0,63 |

¹Controle (CO); quitosana (QT); grão de soja (GSI); quitosana e grão de soja (GSI+QT).²Erro padrão da média; ³Valor de probabilidade significativa ao nível de 5%.

Belanche et al. (2016) demonstraram um impacto negativo da quitosana sobre a digestibilidade da FDN na dieta de ovelhas alimentadas com quitosana na dose de 136 mg / kg de PC. De acordo com os autores esse comportamento é decorrente da ação da quitosana que promove decréscimo no número de bactérias celulolíticas do rúmen, como *Fibrobacter*, *Butyrivibrio* e *Ruminococcus* e também bactérias hemicelulolíticas como *Eubacterium*. Além disso, a quitosana pode exercer um efeito adverso nos protozoários do rúmen (WENCELOVA et al., 2014).

4.2 Fermentação Ruminal

Não houve diferença nos valores de pH do rúmen entre dietas ($P>0,05$). Os tempos de coleta após a alimentação também não tiveram efeito nesta variável ou nas concentrações de ácidos graxos voláteis (Tabela 6). Inicialmente, a fermentação pode ser alterada devido ao fornecimento de substrato no rúmen, o que aumenta a concentração de hidrogênio e, conseqüentemente, causa diminuição nos valores de pH.

Tabela 6. Efeito das dietas experimentais sobre os parâmetros de fermentação ruminal

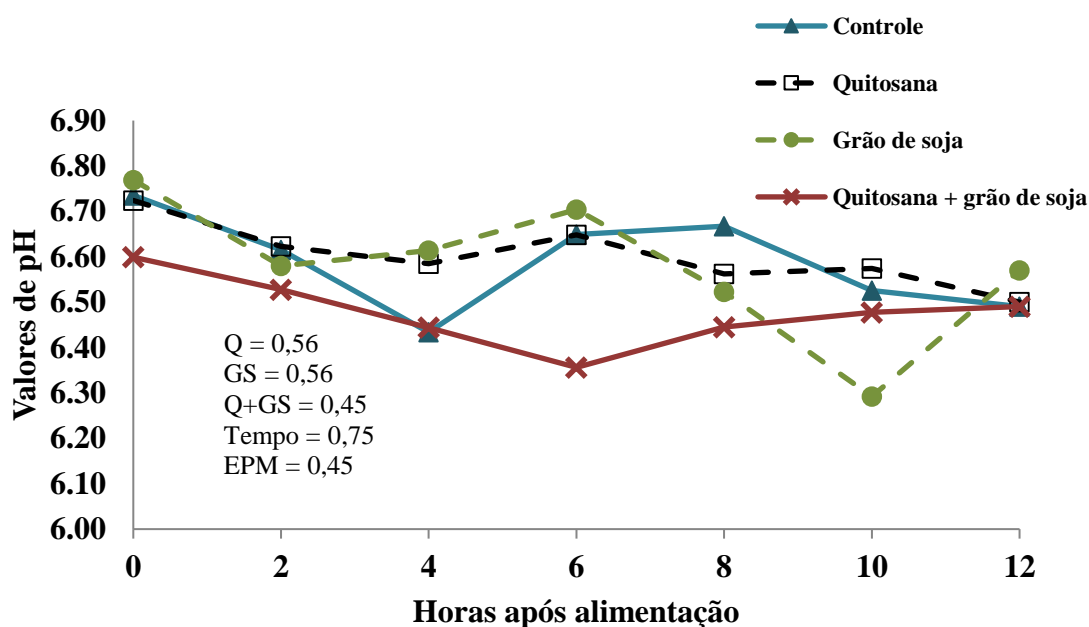
| Item | Dietas experimentais ¹ | | | | EPM ² | Valor de P ³ | | | | |
|-----------------------------|-----------------------------------|-------|-------|--------|------------------|-------------------------|--------|-------|------|------------|
| | CO | QT | GSI | GSI+QT | | Tempo | Inter* | QT | GSI | QT* GSI |
| pH | 6,58 | 6,60 | 6,58 | 6,47 | 0,45 | 0,75 | 0,99 | 0,56 | 0,41 | 0,45 |
| NH ₃ (mg/ dL) | 12,84 | 12,33 | 11,56 | 14,55 | 1,23 | <0,01 | 0,99 | 0,16 | 0,60 | 0,05 |
| AGV Total (mM) | 36,9 | 45,5 | 43,0 | 45,4 | 0,77 | 0,22 | 0,38 | <0,01 | 0,03 | 0,03 |
| AGV (mM) | | | | | | | | | | |
| Acetato | 26,21 | 28,32 | 30,62 | 29,38 | 9,06 | 0,30 | 0,89 | 0,02 | 0,01 | 0,23 |
| Propionato | 7,07 | 7,84 | 8,03 | 7,28 | 2,67 | 0,50 | 0,59 | <0,01 | 0,01 | 0,01 |
| Butirato | 3,69 | 4,09 | 3,91 | 3,85 | 0,81 | 0,29 | 0,49 | 0,18 | 0,14 | 0,79 |
| Mol/100 mol | | | | | | | | | | |
| Acetato | 69,14 | 69,94 | 70,57 | 71,35 | 6,56 | 0,63 | 0,89 | 0,73 | 0,14 | 0,96 |
| Propionato | 19,17 | 18,87 | 18,88 | 17,80 | 4,05 | 0,58 | 0,30 | 0,12 | 0,65 | 0,04 |
| Butirato | 11,69 | 11,18 | 10,54 | 10,85 | 6,40 | 0,70 | 0,53 | 0,51 | 0,07 | 0,18 |
| C2:C3 | 3,82 | 3,97 | 3,88 | 4,11 | 0,93 | 0,59 | 0,63 | 0,16 | 0,95 | 0,06 |

¹Controle (CO); quitosana (QT); grão de soja (GSI); quitosana e grão de soja (GSI+QT). ² erro padrão da média; ³Valor de probabilidade obtidos para os efeitos de tratamento (Trat := efeito

de quitosana ou grão de soja) ; efeito de horas apos alimentação (tempo) e ; interação tratamento e horas após alimentação (* Inter).

Não se observou efeito da interação entre as dietas e o tempo ($P>0,05$) sobre o pH, isso pode ser explicado pelo fato de que a dieta era baixo grão, o que permite a atividade de tampão fisiológica do rúmen, mesmo sem a inclusão de quitosana. Não houve diferença ($P>0,05$) nos valores de pH do rúmen nos tempos após a alimentação (Figura 1).

Figura 1. Valores de pH observados na digesta do rúmen de búfalos alimentados com as dietas CO = controle; QT= quitosana; GSI= grão de soja; GSI+QT = quitosana mais grão de soja.



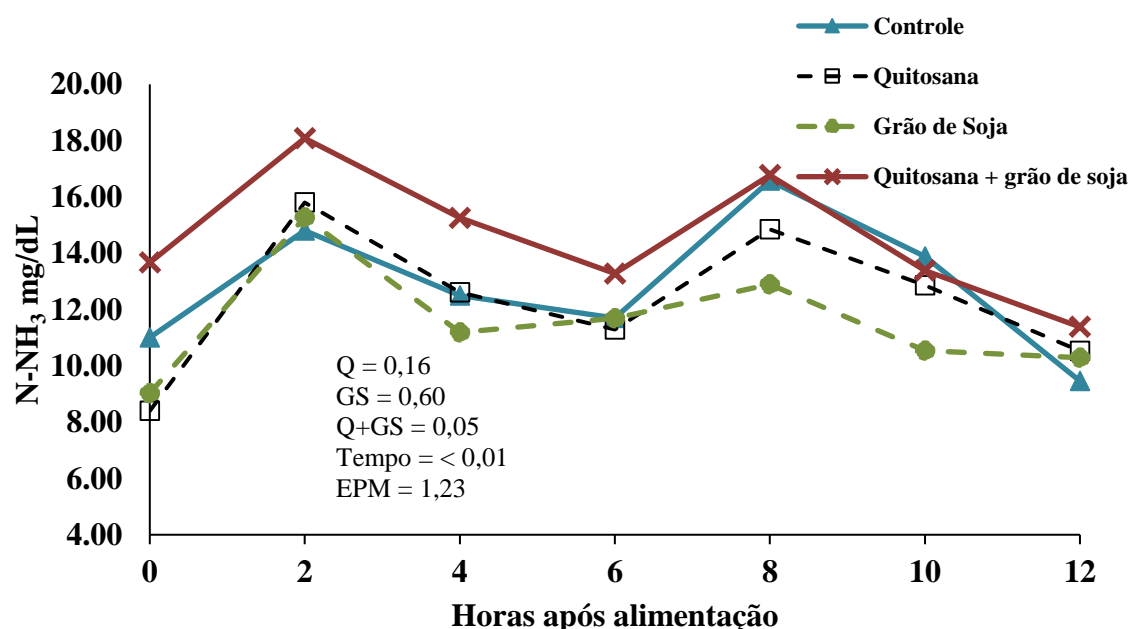
Não houve efeito das dietas sobre as concentrações de N-amoniaco (Tabela 6). De maneira geral, as concentrações de N-amoniaco verificadas foram acima do nível ótimo de 10 mg/dL (LENG,1990; SAMPAIO et al., 2010), necessária para otimização dos processos fermentativos onde não há comprometimento do consumo e digestibilidade da fibra. Dias et al. (2017) avaliando doses crescentes de quitosana (0, 400, 800, 1200 ou 1600 mg / kg de MS no concentrado) em bovinos em pastejo observaram resposta quadrática da concentração de N-amoniaco ruminal, razão acetato: propionato e aumento linear na concentração de propionato no rúmen.

Houve um efeito de tempo na concentração de N-amoniaco. De modo que as concentrações de N-amoniaco ($N-NH_3$) aumentaram em todas as dietas experimentais às duas horas após a alimentação (tempos 2 e 8), seguido por diminuição subsequente nos outros tempos (Figura 2). Este padrão de resposta relacionado às concentrações de $N-NH_3$ pode ser explicado pela proteína degradável do rúmen fornecida durante a alimentação.

Após a alimentação, o processo de fermentação ocorre através das bactérias proteolíticas, que promovem o aumento da concentração de N-amoniaco e conseqüente ocorrência de picos de amônia (DARDILLAT e BAUMONT, 1992). Uma possível ação da quitosana sob as bactérias proteolíticas poderia proporcionar redução desses microrganismos e conseqüentemente diminuição das concentrações de N-amoniaco nas primeiras horas após a alimentação. O que não foi observado neste estudo.

As concentrações decrescentes de $N-NH_3$ em 6 h após a alimentação podem ser explicadas pelo uso de amônia pela microbiota na produção de proteína microbiana e na reciclagem de nitrogênio sob a forma de ureia.

Figura 2. Valores de N-amoniaco observados na digesta do rúmen de búfalos alimentados com as dietas CO = controle; QT= quitosana; GSI= grão de soja; GSI+QT= quitosana e grão de soja.



No entanto, as concentrações totais de AGV (mM) aumentaram nos animais que receberam as dietas QT ($P < 0,01$), GSI ($P = 0,03$) e QT+GSI ($P = 0,03$). Além disso, QT e GSI aumentaram a proporção molar das concentrações de acetato (QT, $P = 0,02$; GSI, $P = 0,01$) e propionato (QT, $P < 0,01$, GSI, $P = 0,01$ e QT+GSI, $P = 0,01$), mas nenhuma alteração foi verificada na proporção de acetato / propionato (C2: C3) com o uso de QT associado ao GSI nas dietas (Tabela 6). Não houve efeito de tempo para as concentrações de acetato e butirato (Figuras 3 e 5). As concentrações de propionato diferiram entre as dietas experimentais às quatro horas após a alimentação (Figura 4).

O aumento na concentração de propionato pode estar associado a alterações nos carboidratos fibrosos, pela ação nas bactérias celulolíticas, sem alterar o CMS quando a quitosana foi adicionada no rúmen (ARAÚJO et al., 2015). Goiri et al. (2010) avaliaram o uso de quitosana na concentração de 136 mg / kg de PC em dietas de ovinos e relataram aumento no propionato, sem efeitos no CMS. De forma similar, Paiva et al. (2016) também relataram aumento linear na concentração de propionato quando foi fornecida quitosana em dietas para vacas leiteiras nos níveis de 150 e 225 mg / kg de PC.

O aumento na proporção molar das concentrações de acetato e propionato pode gerar resultados promissores em relação à eficiência energética do rúmen. Isso mostra que a adição de quitosana na dieta modifica a fermentação do rúmen, especialmente por ação seletiva sobre bactérias celulolíticas, tornando este processo mais eficiente em termos energéticos. A interação da QT com GSI provavelmente causa uma diminuição na excreção de metano, que constitui uma rota importante para a excreção de íons de hidrogênio, que se acumulam no meio e direcionam o metabolismo para a síntese de ácidos graxos voláteis (AGV), como propionato. Os ácidos graxos voláteis, acetato, propionato e butirato são os principais produtos de fermentação e o propionato é o principal substrato da gliconeogênese e conseqüentemente representa uma importante fonte de energia para ruminantes (LI et al., 2013).

Embora neste estudo não tenham sido observadas alterações na relação acetato / propionato, uma proporção menor tem a vantagem de promover uma fermentação energeticamente favorável com diminuição no incremento calórico, uma vez que o propionato gera menos calor e produz menos metano no processo de formação quando em comparação com acetato (GOIRI et al., 2009).

Figura 3. Valores de acetato observados na digesta do rúmen de búfalos alimentados com as dietas CO = controle; QT= quitosana; GSI= grão de soja; GSI+QT = quitosana e grão de soja.

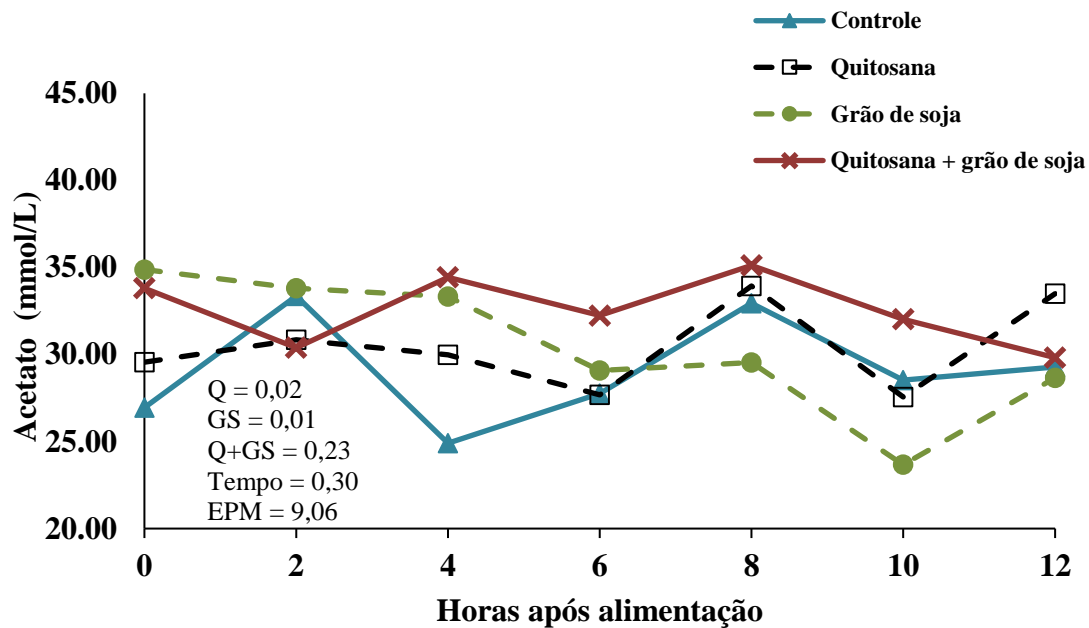


Figura 4. Valores de propionato observados na digesta do rúmen de búfalos alimentados com as dietas CO = controle; QT= quitosana; GSI= grão de soja; GSI+QT = quitosana e grão de soja. Os valores de propionato diferiram quatro horas após a alimentação entre as dietas CO e GS (* $P < 0,05$).

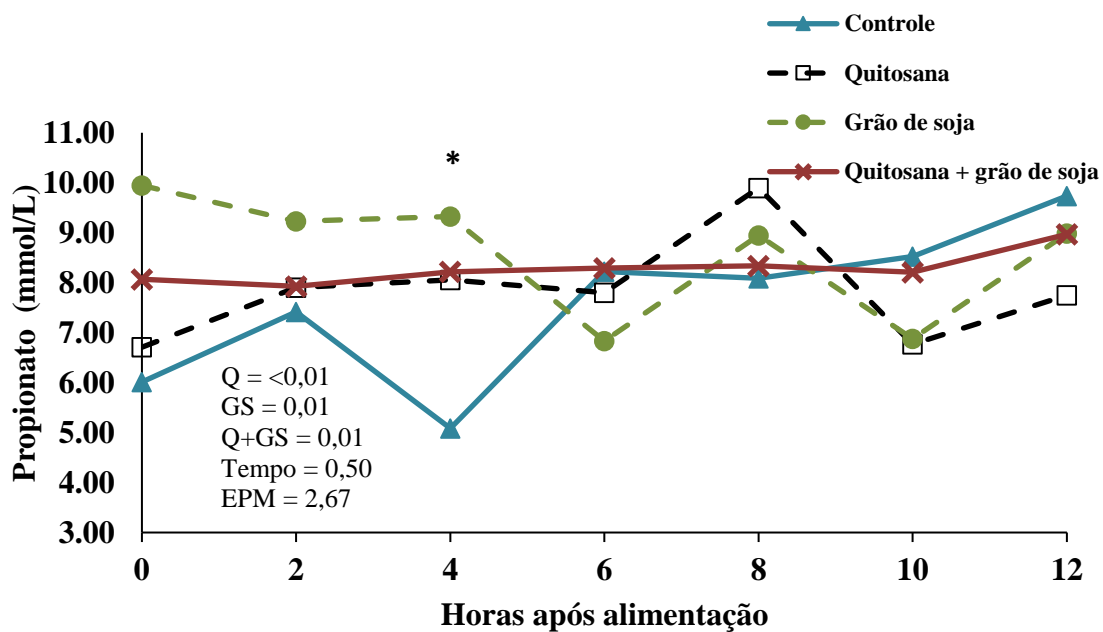
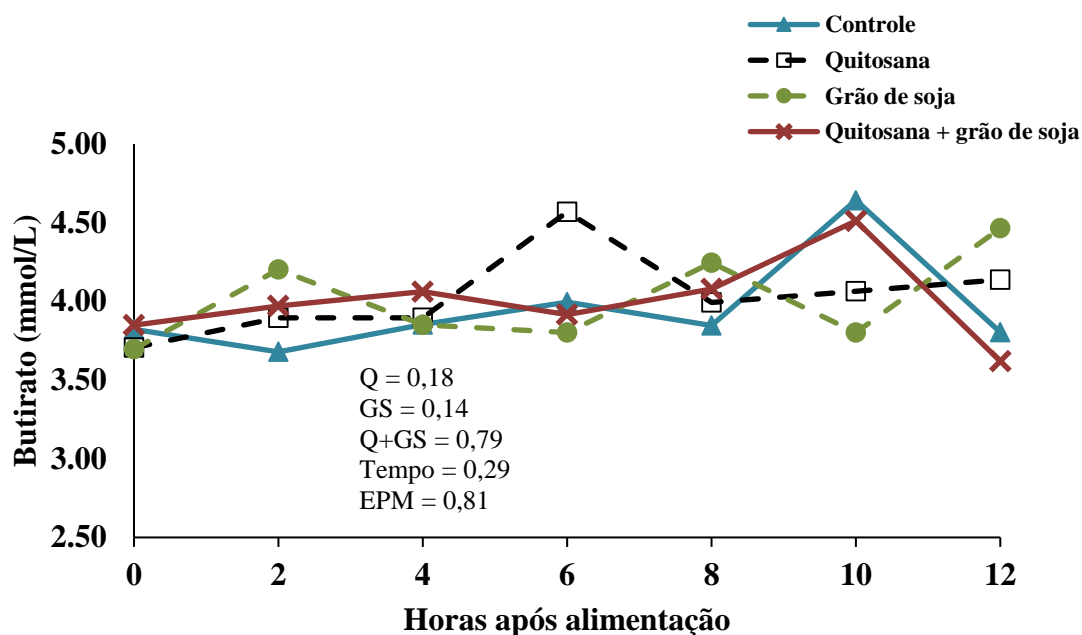


Figura 5. Valores de butirato observados na digesta do rúmen de búfalos alimentados com as dietas CO = controle; QT= quitosana; GSI= grão de soja; GSI+QT = quitosana e grão de soja.



4.3 Metabólitos sanguíneos

A inclusão de QT e a associação entre QT e GSI nas dietas não causaram alterações ($P > 0,05$) nas concentrações de metabólitos sanguíneos. (Tabela 7). Araujo et al. (2015) avaliaram o efeito da inclusão da QT em 0, 50, 100 e 150 mg / kg de PC nos metabólitos sanguíneos de novilhos Nelore e observaram que, embora a proteína total do plasma, a ureia e as enzimas hepáticas (AST e GGT) não tenham sido influenciadas pela adição da quitosana no rúmen, houve um aumento linear nos níveis de glicose.

Elevadas concentrações de glicose sanguínea apresentadas pelos animais podem estar diretamente ligadas ao aumento das concentrações de propionato ruminal. Já que os ruminantes são animais hipoglicêmicos e cerca de 90% da glicose circulante nesses animais é originária da gliconeogênese hepática, a qual é realizada a partir de substratos glicogênicos como o propionato, aminoácidos, lactato e glicerol. Menos de 10% da glicose utilizada no metabolismo é absorvida do intestino (KANEKO, 2008).

Del Valle et al. (2017) avaliaram os efeitos de dois níveis de quitosana (0 e 4 g / kg de DM) e dois níveis de óleo de soja (0 e 33 g / kg MS da dieta) sobre o metabolismo de vacas no terço médio de lactação e concluiu que as dietas experimentais não tiveram efeito sobre as concentrações séricas de glicose. No entanto, houve um efeito da interação do óleo de soja x quitosana na concentração de ureia no soro. Os autores

também relataram que a suplementação da quitosana em dietas com baixo teor de gordura aumentou a ureia no soro, mas nenhum efeito foi detectado nesta variável em animais alimentados com dietas com suplementação de gordura. Independentemente da adição da quitosana, o óleo de soja aumentou o colesterol total e HDL, o que pode estar associado ao maior consumo de ácidos graxos desses animais, como também foi relatado por Araujo et al. (2015) e Mingoti et al. (2016).

Gandra et al. (2016) ao estudarem os efeitos da inclusão da quitosana e do grão de soja integral na dieta de novilhas Jersey sobre os metabólitos sanguíneos, constataram que as dietas contendo esse aditivo diminuíram as concentrações totais de LDL e colesterol, ao contrário do que foi observado com o grão de soja integral, o que causou aumento dos níveis séricos de ambas as frações. Em relação ao HDL, os autores observaram um efeito de interação das dietas, com níveis crescentes nas dietas contendo quitosana e o grão de soja integral, em comparação com outros tratamentos. Além disso, a dieta contendo quitosana promoveu o menor nível do colesterol HDL (PAIVA et al., 2016).

Tabela 7 - Efeito das diferentes concentrações de quitosana nas concentrações séricas dos metabólitos sanguíneos

| Variável | Dietas experimentais ¹ | | | | EPM ⁷ | Valor P ⁸ | | |
|---------------------------|-----------------------------------|-------|-------|--------|------------------|----------------------|------|--------|
| | CO | QT | GSI | GSI+QT | | QT | GSI | QT*GSI |
| Glicose, mg/dL | 91,25 | 92,60 | 90,82 | 91,35 | 1,71 | 0,81 | 0,83 | 0,92 |
| PT ² , mg/dL | 6,99 | 8,24 | 7,45 | 7,05 | 0,24 | 0,36 | 0,44 | 0,09 |
| Albumina, g/L | 3,05 | 2,95 | 2,89 | 2,88 | 0,07 | 0,65 | 0,48 | 0,69 |
| Globulina, U/L | 3,93 | 5,31 | 4,56 | 4,17 | 0,25 | 0,32 | 0,60 | 0,09 |
| Colesterol, mg/dL | 34,95 | 41,50 | 33,67 | 37,35 | 2,03 | 0,25 | 0,53 | 0,74 |
| TGL ³ , mg/dL | 34,15 | 42,22 | 31,97 | 32,87 | 2,50 | 0,39 | 0,28 | 0,49 |
| VLDL ⁴ , mg/dL | 6,83 | 8,44 | 6,39 | 6,57 | 0,50 | 0,39 | 0,28 | 0,49 |
| HDL ⁵ , mg/dL | 23,88 | 23,93 | 24,36 | 21,87 | 0,41 | 0,12 | 0,30 | 0,11 |
| NUS ⁶ | 17,41 | 14,13 | 13,67 | 13,32 | 1,30 | 0,52 | 0,42 | 0,60 |

¹Controle (CO); quitosana (QT); grão de soja (GSI); quitosana e grão de soja (GSI+QT). ²Proteínas totais. ³Triglicerídeos. ⁴Lipoproteína de Muito Baixa Densidade .

⁵Lipoproteína de Alta Densidade. ⁶Nitrogênio ureico no sangue. ⁷Erro padrão da média.

⁸Valor de probabilidade significativa ao nível de 5%.

Embora ainda não esteja elucidado o mecanismo pelo qual a quitosana atua sobre o metabolismo do colesterol e LDL, o uso deste aditivo pode promover diminuição nos níveis séricos de LDL e colesterol, devido a sua capacidade de se ligar a gordura e a indisponibilizar (DAMIAN, et al., 2005). Estudos em seres humanos demonstraram que a quitosana reduziu o colesterol LDL no soro (YIHUA e BINGLIN, 1997; WUOLIJOKI et al., 1999).

4.4 Dinâmica Ruminal e fluxo de nutrientes

Não houve efeito das dietas experimentais sobre o conteúdo ruminal em quilos, volume ruminal e conteúdo ruminal em porcentagens de matéria seca, matéria orgânica, matéria mineral, bem como não houve diferenças entre a composição total desses nutrientes ($P>0,05$) (Tabela 8).

Tabela 8 - Caracterização ruminal de acordo com as dietas experimentais

| Item | Dietas experimentais ¹ | | | | EPM ² | Valor de P | | |
|-------------------------|-----------------------------------|-------|-------|--------|------------------|------------|------|--------|
| | CO | QT | GSI | GSI+QT | | QT | GSI | QT*GSI |
| Conteúdo ruminal, MN kg | 42,22 | 40,17 | 40,45 | 40,72 | 5,39 | 0,75 | 0,82 | 0,67 |
| Volume ruminal, L | 50,12 | 50,00 | 47,20 | 46,25 | 17,80 | 0,90 | 0,45 | 0,92 |
| Conteúdo ruminal (%) | | | | | | | | |
| MS | 12,15 | 12,40 | 12,47 | 12,27 | 0,70 | 0,94 | 0,78 | 0,53 |
| MO | 93,91 | 93,80 | 93,81 | 93,95 | 0,69 | 0,93 | 0,96 | 0,72 |
| FDN | 51,22 | 51,19 | 54,10 | 53,02 | 0,65 | 0,68 | 0,09 | 0,68 |
| FDNi | 37,25 | 39,19 | 35,40 | 38,68 | 1,22 | 0,34 | 0,66 | 0,80 |
| FDNpd | 13,97 | 12,00 | 18,67 | 14,34 | 1,63 | 0,37 | 0,32 | 0,73 |
| Pool ruminal (kg) | | | | | | | | |
| MS | 5,15 | 4,97 | 5,00 | 5,00 | 0,69 | 0,80 | 0,86 | 0,80 |
| MO | 3,87 | 3,82 | 3,95 | 3,80 | 0,52 | 0,71 | 0,92 | 0,85 |
| FDN | 2,65 | 2,55 | 2,70 | 2,65 | 0,10 | 0,71 | 0,72 | 0,90 |
| FDNi | 1,90 | 1,94 | 1,76 | 1,94 | 0,07 | 0,50 | 0,65 | 0,66 |
| FDNpd | 0,75 | 0,62 | 0,95 | 0,70 | 0,09 | 0,36 | 0,49 | 0,76 |

¹Controle (CO); quitosana (QT); grão de soja (GSI); quitosana e grão de soja (GSI+QT). ² erro padrão da média

Os parâmetros da dinâmica ruminal são influenciados dentre outros fatores pelas características físicas dos alimentos, e estes efeitos são mais proeminentes na fração efetivamente degradável. Segundo Allen (1996), a mastigação e fermentação do alimento no rúmen são primordialmente responsáveis pelo tamanho e a densidade de partículas da digesta e estas, por sua vez, influenciam conseqüentemente na taxa de passagem no rúmen. Dessa forma, quanto menor o tamanho de partícula maior será seu escape no rúmen.

A degradação dos nutrientes no rúmen depende de características intrínsecas do substrato. Segundo Detmann et al. (2005), a dimensão das frações potencialmente degradável e não degradável, não seriam mais alteradas após máxima taxa de degradação, sendo dessa forma determinadas única e exclusivamente pelas características do substrato. Este processo pode ser explicado pelo fato de que, mesmo que algum fator venha a interferir negativamente sobre eficiência de ação enzimática sobre o substrato, em algum momento do processo de degradação, a maior permanência do alimento permitiria ao sistema enzimático superar sua baixa eficiência sobre o substrato, com a possibilidade de ação por período mais prolongado. Desta forma, nenhum fator enzimático poderia afetar as características de potencialidade de um alimento, as quais seriam plenamente intrínsecas ao substrato.

As fontes de suplementação ($P>0,05$) não alteraram a taxa de digestão (%/h) da matéria seca, e fibra em detergente neutro (FDN) (Tabela 9). Além disso, não foi observado efeito das dietas experimentais sobre as taxas de renovação ruminal da matéria seca, matéria orgânica, FDN, FDNi e FDNpd e taxa de passagem (%/h) da matéria seca, FDN e FDNpd ($P>0,05$).

A digestão e a passagem atuam de forma simultânea e competitiva para a remoção da digesta no rúmen, e seus efeitos combinados podem maximizar o consumo de nutrientes digestíveis (KOVÁCS et al., 1998). De acordo com Sampaio et al. (2010), a FDNi exerce forte efeito sobre o valor nutritivo do alimento, principalmente em função da sua elevada capacidade de repleção ruminal.

Em estudo avaliando o uso de fontes de gorduras protegidas para reduzir a bio-hidrogenação de ácidos graxos e aumentar o fluxo abomasal em vacas leiteiras, Bettero et al., (2017) relataram que a dieta com óleo de soja teve menores taxas de digestão ruminal para MS, FDN e FDNpd quando foram comparadas com os tratamentos GS e sais de cálcio (SC). De acordo com os autores, este comportamento é justificado

provavelmente pelos maiores efeitos nesses parâmetros quando o ácido graxo e fornecido de forma livre, sem nenhum tipo de proteção.

Tabela 9 - Dinâmica ruminal, concentrações e digestibilidade de nutrientes

| Item | Dietas experimentais ¹ | | | | EPM ² | Valor de P ³ | | |
|----------------------------------|-----------------------------------|-------|------|--------|------------------|-------------------------|------|--------|
| | CO | QT | GSI | GSI+QT | | QT | GSI | QT*GSI |
| Taxa de digestão (%/h) | | | | | | | | |
| Matéria Seca | 4,40 | 4,90 | 4,35 | 4,52 | 1,2 | 0,23 | 0,42 | 0,54 |
| Fibra em detergente neutro (FDN) | 2,99 | 3,51 | 2,97 | 3,43 | 0,1 | 0,15 | 0,86 | 0,92 |
| FDN _{pd} ⁴ | 5,58 | 6,37 | 5,33 | 6,06 | 0,3 | 0,25 | 0,66 | 0,97 |
| Taxa de renovação ruminal (%/h) | | | | | | | | |
| Matéria Seca | 7,07 | 7,75 | 7,23 | 7,16 | 2,1 | 0,54 | 0,66 | 0,45 |
| Matéria Orgânica | 8,34 | 9,06 | 8,30 | 8,48 | 0,3 | 0,45 | 0,60 | 0,65 |
| FDN | 6,97 | 7,98 | 7,24 | 7,41 | 0,3 | 0,39 | 0,82 | 0,54 |
| FDN indigestível | 4,29 | 4,96 | 4,80 | 4,63 | 0,3 | 0,70 | 0,88 | 0,52 |
| FDN _{pd} ⁴ | 9,33 | 10,46 | 9,39 | 9,56 | 0,4 | 0,46 | 0,63 | 0,58 |
| Taxa de passagem (%/h) | | | | | | | | |
| Matéria Seca | 2,67 | 2,85 | 2,88 | 2,64 | 1,0 | 0,91 | 1,00 | 0,41 |
| FDN | 3,97 | 4,46 | 4,26 | 3,99 | 0,2 | 0,80 | 0,82 | 0,37 |
| FDN _{pd} ⁴ | 3,75 | 4,10 | 4,06 | 3,50 | 0,2 | 0,77 | 0,70 | 0,23 |

¹Controle (CO); quitosana (QT); grão de soja (GSI); quitosana e grão de soja (GSI+QT).²Erro padrão da média.³Valor de probabilidade significativa ao nível de 5%.⁴Fibra em detergente neutro potencialmente digestível.

Similarmente, Barletta et al. (2016) avaliando o processo de biohidrogenação e fluxo abomasal de ácidos graxos em vacas leiteiras alimentadas com óleo de soja, grão de soja integral e sais de cálcio de ácidos graxos, observaram que não houve efeito das fontes de lipídeos utilizadas na taxa de digestão da MS e da FDN_{pd}. Além disso, foi observado efeito ($P < 0,05$) para taxa de digestão da FDN, com maiores valores para os animais submetidos às dietas com sais de cálcio e grão de soja quando comparadas com a dieta óleo de soja.

No entanto, para a taxa de renovação ruminal os mesmos autores observaram menores valores para os animais suplementados com óleo de soja, o que juntamente com o menor consumo de matéria seca destes animais justificam estes resultados de menor taxa de digestão da FDN. Não foi observado efeito ($P > 0,05$) para os dados de

taxa de renovação ruminal para MS, MO, FDN, FDNi e FDNpd entre as dietas experimentais.

Freitas Jr. (2012) avaliando fontes de gordura na dieta de vacas em lactação, não observou alteração nas taxas de digestão da MS e da FDN. No entanto, os mesmos autores relataram que os animais alimentados com a dieta contendo grão de soja apresentaram menor taxa de digestão e maior taxa de renovação ruminal da FDNpd quando comparada a digestão dos animais alimentados com a dieta contendo SC.

De acordo com Bull et al. (1979), o aumento do turnover ruminal de líquido pode alterar a fermentação ruminal com aumento de acetato, butirato e metano e diminuição de propionato. Além disso, resulta em uma maior velocidade de passagem de pequenas partículas de alimentos. O efeito sobre a digestão total depende da composição do alimento e forma física. O turnover ruminal de líquido também é aumentado pelo maior nível de consumo, adição de fibra grossa nas rações, e por agentes osmoticamente ativos. A falta de diferença das taxas de passagem e renovação podem ser atribuídas a não alteração no consumo de FDN entre dietas.

A digestibilidade ruminal em porcentagem da MS ($P < 0,05$; Tabela 10) das dietas com adição da quitosana foi maior quando comparada às dietas controle e GSI. No entanto, não houve diferenças ($P > 0,05$) para a digestibilidade ruminal da FDN e FDNpd (% e kg/dia).

De acordo com Forbes (1995), a elevação na taxa de passagem do alimento faz com que haja aumento no consumo, porém isso está associado à redução da digestibilidade devido ao menor tempo no trato digestivo. Em contrapartida, a média da taxa de passagem da matéria seca obtida foi de 2.76 %/h, semelhantemente a taxa descrita por Bettero (2015) de 2.73%/h. Uma menor taxa de passagem pode estar relacionada ao maior tamanho de partícula dos alimentos, já que a redução de partículas grandes é um requisito para o alimento fluir a partir do retículo-rúmen (WELCH; SMITH, 1978), isso leva a maior retenção ruminal desse material, além do maior tempo de ação microbiana na degradação dos nutrientes, promovendo o aumento da digestibilidade ruminal como observado no presente estudo.

Resultados semelhantes para a digestibilidade aparente total foram encontrados por Freitas Junior (2008), Barletta (2010) e Naves (2010). Estes trabalhos evidenciaram que o grão de soja não exerce influência sobre a digestibilidade dos nutrientes, o que revela o potencial de utilização deste nas dietas.

O fluxo de nutrientes não foi alterado pelas dietas ($P>0,05$). Similarmente, os consumos de FDNi e FDN_{pd} (kg/dia) não apresentaram diferenças entre as dietas. O fluxo de digesta pelo trato gastrintestinal é determinado primordialmente pela taxa de passagem ruminal, sendo que o aumento na taxa de passagem normalmente reduz a digestibilidade dos componentes mais resistentes à degradação, como fibra e amido de baixa degradabilidade ruminal (RUSSEL e WILSON, 1996).

Tabela 10 - Dinâmica ruminal, concentrações e digestibilidade da FDN

| Item | Dietas experimentais ¹ | | | | EPM ² | Valor de P ³ | | |
|---|-----------------------------------|-------|-------|--------|------------------|-------------------------|------|--------|
| | CO | QT | GSI | GSI+QT | | QT | GSI | QT*GSI |
| Digestibilidade ruminal | | | | | | | | |
| Matéria Seca (%) | 68,64 | 73,37 | 67,48 | 75,17 | 1,30 | 0,01 | 0,88 | 0,51 |
| Matéria Orgânica (%) | 61,43 | 62,71 | 59,28 | 62,46 | 0,70 | 0,15 | 0,42 | 0,52 |
| FDN (%) | 43,25 | 43,86 | 40,97 | 46,45 | 1,10 | 0,17 | 0,94 | 0,27 |
| FDN _{pd} ⁴ (%) | 59,71 | 60,66 | 55,98 | 63,49 | 1,40 | 0,15 | 0,87 | 0,26 |
| Fluxo de nutrientes (kg/dia) | | | | | | | | |
| MS | 3,37 | 3,38 | 3,42 | 3,31 | 0,10 | 0,87 | 0,99 | 0,83 |
| FDN | 2,56 | 2,65 | 2,68 | 2,56 | 0,10 | 0,93 | 0,95 | 0,64 |
| FDNi | 1,25 | 1,31 | 1,21 | 1,27 | 0,01 | 0,45 | 0,66 | 0,97 |
| FDN _{pd} | 1,31 | 1,34 | 1,46 | 1,29 | 0,10 | 0,61 | 0,75 | 0,49 |
| Consumo FDNi (kg/d) | 1,25 | 1,31 | 1,21 | 1,27 | 0,03 | 0,45 | 0,66 | 0,97 |
| FDN _{pd} ⁴ (kg/dia) | 3,27 | 3,41 | 3,31 | 3,47 | 0,09 | 0,48 | 0,81 | 0,97 |

¹Controle (CO); quitosana (QT); grão de soja (GSI); quitosana e grão de soja (GSI+QT).²Erro padrão da média.³Valor de probabilidade significativa ao nível de 5%.⁴Fibra em detergente neutro potencialmente digestível.

4.5 Comportamento Ingestivo

Não houve efeito ($P>0,05$) das dietas experimentais sobre as atividades de alimentação, ruminação, mastigação e ócio em minutos por dia, minutos por quilo de matéria seca e fibra em detergente neutro (Tabela 11), o que pode ser justificado por não ter havido diferença no consumo médio por período de alimentação (kg) (Tabela 13). Além disso, 47,5% do tempo em 24 horas foram despendidos em ócio, enquanto 37% para a atividade de ruminação e 15,4% em alimentação. Um maior tempo na atividade de ruminação pode ser justificado pelo aumento da proporção de volumoso, tipo de

volumoso da dieta e do tempo de retenção deste alimento no rúmen. Este efeito não foi observado no presente estudo, pois apesar da elevada proporção de volumoso, não houve aumento do tempo de retenção do alimento no rúmen conseqüentemente não houve aumento no tempo de ruminação o que contrapõe o que foi relatado por Rogers e Davis (1982), onde o uso de ionóforo na dieta promove aumento no período de permanência do alimento no rúmen, e como a quitosana possui mecanismo de ação similar a este aditivo, poderia se associar a maior retenção do alimento no rúmen a um aumento no tempo de ruminação.

Tabela 11 - Efeitos das dietas experimentais sobre as atividades de alimentação, ruminação, mastigação e ócio.

| Item | Dietas experimentais ¹ | | | | | Valor de P | | |
|---------|-----------------------------------|-------|-------|--------|------------------|------------|------|------------|
| | CO | QT | GSI | GSI+QT | EPM ² | QT | GSI | QT*G SI |
| | Alimentação | | | | | | | |
| Min/dia | 198,3 | 203,7 | 191,7 | 225,0 | 9,14 | 0,35 | 0,72 | 0,50 |
| Min/kg | | | | | | | | |
| MS | 9,2 | 9,4 | 8,8 | 9,1 | 198,95 | 0,53 | 0,41 | 0,88 |
| Min/kg | | | | | | | | |
| FDN | 4,6 | 4,8 | 4,6 | 4,7 | 95,66 | 0,41 | 0,84 | 0,88 |
| | Ruminação | | | | | | | |
| Min/dia | 518,7 | 531,2 | 563,7 | 531,2 | 14,97 | 0,76 | 0,50 | 0,50 |
| Min/kg | | | | | | | | |
| MS | 56,5 | 56,3 | 64,8 | 58,9 | 2,05 | 0,47 | 0,22 | 0,51 |
| Min/kg | | | | | | | | |
| FDN | 112,8 | 110,2 | 124,0 | 113,3 | 3,73 | 0,40 | 0,37 | 0,61 |
| | Mastigação | | | | | | | |
| No/dia | 48,3 | 47,5 | 52,3 | 58,4 | 2,94 | 0,68 | 0,24 | 0,58 |
| Min/dia | 28312 | 28994 | 31052 | 28589 | 1011,9 | 0,69 | 0,60 | 0,48 |
| Min/kg | | | | | | | | |
| MS | 78,5 | 77,9 | 90,1 | 88,9 | 3,08 | 0,88 | 0,09 | 0,95 |
| Min/kg | | | | | | | | |
| FDN | 156,6 | 152,6 | 172,9 | 170,9 | 5,71 | 0,80 | 0,16 | 0,93 |
| | Ócio | | | | | | | |
| Min/dia | 726,2 | 710,0 | 658,7 | 647,5 | 20,85 | 0,75 | 0,15 | 0,95 |

¹Controle (CO); quitosana (QT); grão de soja (GSI); quitosana e grão de soja (GSI+QT).²Erro padrão da média.³Valor de probabilidade significativa ao nível de 5%.

Similarmente, o aumento do tempo na atividade de mastigação proporciona o funcionamento ruminal adequado, uma vez que a maior produção de saliva decorrente dessa atividade promove maior fluxo de substâncias tamponantes para o rúmen, com consequente manutenção de um pH ótimo para a atividade dos microrganismos (SANTINI et al., 1992). Dessa forma, o aumento nos tempos de ruminação e mastigação podem contribuir para uma fermentação ruminal eficiente nos animais suplementados com quitosana.

O tempo gasto em ruminação é caracterizado por ser maior à noite, no entanto, o tempo de ruminação também é influenciado pelo alimento. Além disso, existem diferenças quanto à duração e à repartição das atividades de alimentação e ruminação entre indivíduos, que podem estar relacionadas ao apetite dos animais, a diferenças anatômicas e ao suprimento das exigências energéticas ou enchimento ruminal (SOUZA et al., 2007). A semelhança no tempo de ruminação está associada a similaridade nos consumos de matéria seca e FDN.

Trabalhos enfatizam a diminuição do consumo de matéria seca ou tempo de alimentação dos animais com a utilização de ionóforos. Barreto et al. (2015) avaliando o comportamento ingestivo de ovinos suplementados com feno de maniçoba e diferentes níveis de monensina sódica na dieta observaram que a medida em que se aumentou os níveis de monensina houve aumento na ruminação por partes dos animais. A diminuição do tempo de alimentação pode ser explicada, pois a maior produção de propionato, promove aumento nos níveis plasmáticos de glicose, estimulando assim, os centros de saciedade (VAN SOEST, 1994).

As eficiências de alimentação e ruminação não foram influenciadas pelas dietas experimentais ($P > 0,05$) (Tabela 12). Estas eficiências apresentam relação direta com os níveis de consumo de nutrientes dos animais. Logo, a ausência de efeito para os consumos de MS e FDN pode ter contribuído para a falta de efeito nas eficiências de alimentação e ruminação sobre as dietas analisadas.

Barreto et al. (2015) relataram aumento no número de bolos ruminais por dia a medida em que se aumentava os níveis de monensina. Comparando-se os resultados obtidos pelo autor com trabalhos que não utilizavam ionóforo na dieta, a quantidade de bolos ruminais contabilizadas nesse estudo apresentou uma diferença considerável provavelmente pelo aumento do tempo de retenção dos alimentos no rúmen provocado pela quitosana, justificando-se dessa forma, o aumento do número de bolo/dia.

Secundino et al. (2017) ao avaliarem o comportamento ingestivo em novilhas Jersey suplementadas com quitosana e soja integral observaram que a quitosana reduziu a eficiência alimentar em g MS/hora e g FDN/hora. Do mesmo modo, as novilhas alimentadas com quitosana apresentaram eficiência de mastigação da FDN mais baixa em comparação com aos outros tratamentos. A associação entre quitosana e grão de soja aumentou o período de ruminação e diminuiu a eficiência de ruminação da MS. Além disso, o grão de soja aumentou o período de ócio.

Em estudo avaliando o comportamento ingestivo de vacas em confinamento alimentadas com aditivos baseados em óleos essenciais ou monensina sódica, Segabinazzi et al. (2011) concluiu que o tipo de aditivo consumido não alterou o comportamento ingestivo animal. Vacas com predominância Charolês consumiram mais matéria seca (13,78 *versus* 12,38 kg / dia) e fibra em detergente neutro (7,81 *vs.* 6,89 kg / dia), ruminaram por mais tempo (8,47 *vs.* 7,82 h), passou mais tempo de mastigação (13,05 *vs* 12,01 h), teve um maior número de mastigações por minuto (58,88 *vs* 53,21) e um maior número de bolo ruminal (541,43 *vs.* 464,09 bolos / dia); no entanto, vacas com predominância de Nelore teve maior tempo de ócio (11,82 *vs.* 10,74 h).

Tabela 12 - Efeitos das dietas experimentais sobre as eficiências de alimentação e ruminação

| Item | Dietas experimentais ¹ | | | | | Valor de P | | |
|---------------------------|-----------------------------------|--------|--------|--------|------------------|------------|------|------------|
| | CO | QT | GSI | GSI+QT | EPM ² | QT | GSI | QT*G SI |
| Eficiência em alimentação | | | | | | | | |
| g MS/hora | | | | | 170,0 | | | |
| | 2767,2 | 2874,0 | 2572,2 | 2213,9 | 8 | 0,73 | 0,25 | 0,52 |
| g FDN/hora | 1382,9 | 1471,1 | 1351,7 | 1149,8 | 89,99 | 0,77 | 0,37 | 0,46 |
| Eficiência em ruminação | | | | | | | | |
| Bolos | | | | | | | | |
| (no/dia) | 586,7 | 635,2 | 601,7 | 538,0 | 34,02 | 0,92 | 0,56 | 0,46 |
| g MS/bolo | 15,8 | 15,9 | 15,1 | 19,0 | 1,25 | 0,46 | 0,66 | 0,50 |
| g FDN/bolo | 7,9 | 8,1 | 7,9 | 9,9 | 0,64 | 0,43 | 0,52 | 0,53 |
| g MS/hora | 1070,6 | 1077,2 | 949,4 | 1032,3 | 33,84 | 0,53 | 0,26 | 0,59 |
| g FDN/hora | 535,0 | 549,2 | 497,0 | 535,5 | 16,24 | 0,46 | 0,47 | 0,73 |

¹Controle (CO); quitosana (QT); grão de soja (GSI); quitosana e grão de soja (GSI+QT). ²Erro padrão da média. ³Valor de probabilidade significativa ao nível de 5%.

Não houve diferença ($P > 0,05$) para o número de períodos (nº/dia), tempo gasto por período (min) e consumo médio por período de alimentação (kg) entre as dietas (Tabela 13). Pereira (2017) em experimento avaliando o comportamento ingestivo de cordeiros submetidos a diferentes níveis de 0, 136 e 272 mg/kg de quitosana/ peso vivo demonstraram que houve efeito quadrático para o número de períodos de ruminação e tempo gasto por período de ruminação, em que o nível de 136 mg/kg de PC diminuiu o número de períodos, e conseqüentemente aumentou o tempo gasto por período de ruminação. Os tempos de alimentação, ruminação e ócio, bem como as eficiências de alimentação e ruminação não foram influenciados pelos níveis de quitosana.

Tabela 13 - Efeitos das dietas experimentais sobre o número, tempo e consumo de MS e FDN por período de alimentação, ruminação e ócio

| Item | Dietas experimentais ¹ | | | | | Valor de P | | |
|---|-----------------------------------|-------|-------|------------|------------------|------------|------|-------------|
| | CO | QT | GSI | GSI+Q T | EPM ² | QT | GSI | QT*GSI I |
| Número de períodos (nº/dia) | | | | | | | | |
| Alimentação | 17,5 | 18,5 | 15,0 | 17,7 | 1,03 | 0,40 | 0,47 | 0,70 |
| Ruminação | 24,0 | 23,2 | 22,5 | 23,0 | 1,06 | 1,00 | 0,68 | 0,75 |
| Ócio | 34,5 | 35,0 | 32,7 | 34,7 | 0,72 | 0,43 | 0,53 | 0,63 |
| Tempo gasto por período (min) | | | | | | | | |
| Alimentação | 11,8 | 11,4 | 14,7 | 15,8 | 0,97 | 0,84 | 0,08 | 0,70 |
| Ruminação | 23,1 | 23,0 | 26,2 | 23,5 | 1,28 | 0,62 | 0,53 | 0,63 |
| Ócio | 21,1 | 20,3 | 20,6 | 18,8 | 0,83 | 0,48 | 0,60 | 0,80 |
| Consumo médio por período de alimentação (kg) | | | | | | | | |
| MS | 21,95 | 21,62 | 25,37 | 29,90 | 1,88 | 0,58 | 0,14 | 0,53 |
| FDN | 43,75 | 42,47 | 48,82 | 57,62 | 3,62 | 0,61 | 0,19 | 0,50 |

¹Controle (CO); quitosana (QT); grão de soja (GSI); quitosana e grão de soja (GSI+QT). ²Erro padrão da média. ³Valor de probabilidade significativa ao nível de 5%.

5. CONCLUSÃO

A quitosana tem efeitos potenciais como modulador da fermentação ruminal, para maior eficiência no metabolismo e dinâmica ruminal tornando-se uma possível alternativa ao uso de ionóforos para búfalos.

A suplementação lipídica através da adição do grão de soja também atua no metabolismo ruminal por meio do aumento das concentrações de propionato e não exerce efeitos negativos sob a digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHVENJÄRVI, S.; VANHATALO, A.; HUHTANEN, P.; VARVIKKO, T. Determination of reticulo-rumen and whole-stomach digestion in lactating cows by omasal canal or duodenal sampling. **British Journal of Nutrition**, v.83, n.1, p.67-77, 2000.

ALLAN, C. R.; HARDWIGER, L. A. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. **Experimental Microbiology**, v.3, n.3, p.285-287, 1979.

ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.7, p.1598-1624, 2000.

ALLEN, M. S. Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. **Journal Animal Science**, v.74, n.12, p.3063-3075. 1996.

ALMEIDA, G. F.; MINGOTI, R. D.; GARDINAL, R. Parâmetros sanguíneos de vacas em lactação suplementadas com doses crescentes de quitosana. Anais do VI Simpósio de Pós-Graduação e Pesquisa em Nutrição e Produção Animal – FMVZ – USP – 2012.

ARANAZ, I.; MENGIBAR, M.; HARRIS, R.; PANOS, I.; MIRALLES, B.; ACOSTA, N.; GALED, G.; HERAS, Á. Functional characterization of chitin and chitosan. **Current chemical biology**, v.3, n.2, p.203-230, 2009.

ARAÚJO, A.P.C.; VENTURELLI, B.C.; SANTOS, M.C.B.; GARDINAL, R.; CÔNSOLO, N.R.B.; CALOMENI, G.D.; FREITAS, J.E.; BARLETTA, R.V.; GANDRA, J.R.; PAIVA, P.G.; RENNÓ, F.P. Chitosan affects total nutrient digestion

and ruminal fermentation in Nellore steers. **Animal Feed Science and Technology**, v.206, p.114-118, 2015.

ASHES, J. R.; GULATI, S. K.; SCOTT, T. W. Potential to alter the content and composition of milk fat through nutrition. Symposium: New approaches to changing milk composition. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.7, p.1505-1519, 1997.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, Official Methods of Analysis, 17th ed. AOAC International, Arlington, VA. 2000.

BARLETTA, R. V.; GANDRA, J. R.; BETTERO, V. P.; ARAÚJO, C. E.; DEL VALLE, T. A.; ALMEIDA, G. F.; JESUS, E. F.; MINGOTI, R. D.; BENEVENTO, B. C.; FREITAS JÚNIOR, J. E.; RENNÓ, F. P. Ruminal biohydrogenation and abomasal flow of fatty acids in lactating cows: Oilseed provides ruminal protection for fatty acids. **Animal Feed Science and Technology**, v.219, p.111-121, 2016.

BARLETTA, R.V.; RENNÓ, F.P.; GANDRA, J.R.; FREITAS JÚNIOR, J.É.; VERDURICO, L.C.; MINGOTI, R.D.; VILELA, F.G. Desempenho e parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras alimentadas com grão de soja. **Archivos de Zootecnia**, v.61, n.236, p.483-492, 2012.

BARLETTA, R.. V. **Grão de soja cru e integral na alimentação de vacas leiteiras**. Pirassununga, SP: USP, 2010. 96p. Dissertacao (Mestrado em Nutricao e Producao Animal) – Universidade de Sao Paulo, 2010.

BARRETO, F. P.; SOUZA, B. B.; ASSIS SILVA, G.; SILVA ARAÚJO, L.; BATISTA, L. F.; SILVA PIRES, J. P.; RODRIGUES, J. L. S.; SILVA, N. Comportamento ingestivo de ovinos suplementados com feno de Maniçoba e diferentes níveis de monensina sódica na dieta. **Anais do X Congresso Nordestino de Produção Animal**. 2015.

BELANCHE, A.; PINLOCHE, E.; PRESKETT, D.; NEWBOLD, C.J. Effects and mode of action of chitosan and ivy fruit saponins on the microbiome, fermentation and

methanogenesis in the rumen simulation technique. **FEMS microbiology ecology**, v.92, n.1, p.1-13, 2016.

BENCHAAAR, 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, n.1-4, p.209-228, 2008.

BETTERO, V. P.; DEL VALLE, T. A.; BARLETTA, R. V.; ARAÚJO, C. E.; JESUS, E. F.; ALMEIDA, G. F.; TAKIYA, C. S.; ZANFERARI, F.; PAIVA, P. G.; FREITAS JÚNIOR, J. E.; RENNÓ, F. P. Use of protected fat sources to reduce fatty acid biohydrogenation and improve abomasal flow in dry dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 224, p. 30-38, 2017.

BULL, L. S.; RUMPLER, W. V.; SWEENEY, T. F.; ZINN, R. A. Influence of ruminal turnover on site and extent of digestion. **Federation proceedings**, v.38, n.13, p.2713-2719, 1979.

BURGER, P.J.; PEREIRA, J.C.; QUEIROZ, A.C.; COELHO DA SILVA, J.F.; VALADARES FILHO, S.C.; CECON, P.R.; CASALI, A.D.P. Comportamento ingestivo de bezerros holandeses alimentados com dietas contendo diferentes níveis de concentrado. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 1, p. 236-242. 2000.

CALOMENI, G. D., BARLETTA, R. V., GARDINAL, R. FREITAS JÚNIOR, J. E., GANDRA, J. R., VERDURICO, L. C., VENDRAMINI, T. H. A., TAKIYA, C. S., BENEVENTO, B. C., RENNÓ, F. P. Consumo e digestibilidade dos nutrientes em vacas leiteiras alimentadas com diferentes níveis de grão de soja nas rações. VI Simpósio de Pós-Graduação e Pesquisa em Nutrição e Produção Animal – VNP – FMVZ – USP – 2012.

CHILLIARD, Y.; MARTIN, C.; RUEL, J.; DOREAU, M. Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n.10, p. 5199-5211, 2009.

CONSOLO, N. R. B. **Utilização do grão de soja cru integral na dieta de bovinos de corte confinados**. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, University of São Paulo, Pirassununga, 2011.

CORRÊA, A.M.V. **Utilização de grão de soja em diferentes formas na alimentação de vacas leiteiras**. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal Viçosa. Minas Gerais. Viçosa. 128 f. 2007.

CRAWFORD, G.I.; KEELER, C.D.; WAGNER, J.J.; KREHBIEL, C.R.; ERICKSON, G.E.; CROMBIE, M.B.; NUNNERY, G.A. Effects of calcium magnesium carbonate and roughage level on feedlot performance, ruminal metabolism, and site and extent of digestion in steers fed high-grain diets. **Journal of Animal Science**, v.86, n.11, p.2998-3013, 2008.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L. H.; FRANCISCO, A. D.; ESPIRITO SANTO, M. L. P.; TEIXEIRA, E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 2, p. 195-205, 2005.

DARDILLAT, C.; BAUMONT, R. Physical characteristic of reticular content in the bovine and consequences on reticular outflow. **Reproduction Nutrition Development**, v. 32, n. 1, p. 21-36, 1992.

DEL VALLE, T.A.; PAIVA, P.G.; JESUS, E.F.; ALMEIDA, G.F.; ZANFERARI, F.; COSTA, A.G.V.B.; BUENO, I.C.S.; RENNÓ, F.P. Dietary chitosan improves nitrogen use and feed conversion in diets for mid-lactation dairy cows. **Livestock Science**, v. 201, p. 22-29, 2017.

DEREZ, F.; FERNANDES, A.M.; MATOS, L.L. Utilização da soja-grão crua na alimentação de vacas leiteiras de alta produção. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 25, n.1, p. 113-124, 1996.

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, n.4, p. 1620-1632, 2009.

DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; QUEIROZ, A.C.; BERCHIELLI, T.T.; SALIBA, E.O.S.; CABRAL, L.S.; PINA, D.S.; LADEIRA, M.M.; AZEVEDO, J.A.G. Methods for food analysis - INCT - Animal Science. Suprema, Visconde do Rio Branco, 214. 2012.

DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; CABRAL, L.S.; VALADARES FILHO, S. C.; CECON, P. R.; ZERVOUDAKIS, J. T.; LANA, R. P.; LEÃO, M. I.; MELO, A. J. N. Simulação e validação de parâmetros da cinética digestiva em novilhos mestiços suplementados a pasto por intermédio de sistema in vitro de produção de gases. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p.2112-2122, 2005.

DEVENDRA, C.; LEWIS, D. The interaction between dietary lipids and fibre in the sheep 2. Digestibility studies. **Animal Science**, v. 19, n. 1, p. 67-76, 1974.

DHIMAN, T.R.; NAM, S.H.; URE, A.L. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 45, n. 6, p. 463-482, 2005.

DIAS, A.O.C.; GOES, R.H.T.B.; GANDRA, J.R.; TAKIYA, C.S.; BRANCO, A.F.; JACAÚNA, A.G.; OLIVEIRA, R.T.; SOUZA, C.J.S.; VAZ, M.S.M. Increasing doses of chitosan to grazing beef steers: Nutrient intake and digestibility, ruminal fermentation, and nitrogen utilization. **Animal Feed Science and Technology**, v. 225, p. 73-80, 2017.

DIAS, A. O. C. **Quitosana em suplementos para bovinos em pastejo**. 2016. 51f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2016.

DIAS, M. **Indicadores na coleta de digesta omasal e na cinética de trânsito do trato gastrintestinal de bovinos**. 2009. 109f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

DOREU, M.; CHILLIARD, Y. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. **British Journal of Nutrition**. v. 78, Suppl. 1, S15-S35. 1997

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, p. 375-408, 1980.

FACIOLA, A. Omasal and reticular sampling techniques for assessing ruminal digestion, nutrient, and microbial protein flow. In: 4^o International Symposium on Advances on Ruminant Nutrition Research Techniques. Pirassununga, SP, Brazil, 2014.

FELLNER, V.; SAUER, F. D.; KRAMER, J. K. G. Effect of Nigericin, Monensin, and Tetronasin on Biohydrogenation in Continuous Flow-Through Ruminal Fermenters1. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 5, p. 921-928, 1997.

FORBES, J.M. **Voluntary food intake and diet selection in farm animals**. Wallingford: CAB International, 532p. 1995.

FREITAS JR., J. E. **Utilização de fontes de gordura em rações de vacas leiteiras**. 2008. 93 p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

FREITAS JR., J. E. **Fontes de gordura na dieta de vacas em lactação**. 2012. 120 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP, 2012.

FREITAS JUNIOR, J.E.; RENNÓ, F.P.; GANDRA, J.R.; RENNÓ, L.N.; RODRIGUES, G. H.; SANTOS, M. V.; OLIVEIRA, M. D. S. Nutrients balances and milk fatty acid profile of mid lactation dairy cows supplemented with unsaturated fatty acid. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 14, n. 2, p. 322-335, 2013.

GANDRA, J.R.; FREITAS, J.E.; BARLETTA, R.V.; MATURANA FILHO, M.; GIMENES, L.U.; VILELA, F.G.; BARUSELLI, P.S; RENNÓ, F.P. Productive performance, nutrient digestion and metabolism of Holstein (*Bos taurus*) and Nellore (*Bostaurus indicus*) cattle and Mediterranean buffaloes (*Bubalus bubalis*) fed with corn-silage based diets. **Livestock Science**, v. 140, n. 1, p. 283-291, 2011.

GANDRA, J.R.; TAKIYA, C.S.; OLIVEIRA, E.R.D.; PAIVA, P.G.D.; GANDRA, É.R.D.S.; ARAKI, H.M.C. Nutrient digestion, microbial protein synthesis, and blood metabolites of Jersey heifers fed chitosan and whole raw soybeans. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 45, n. 3, p. 130-137, 2016.

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

GOIRI, I.; GARCIA-RODRIGUEZ, A.; OREGUI, L. M. Effect of chitosan on mixed ruminal microorganism fermentation using the rumen simulation technique (Rusitec). **Animal feed science and technology**, v. 152, n. 1, p. 92-102, 2009b.

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

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

GUGLIELMELLI A.; CALABRÒ S.; CUTRIGNELLI M.; GONZALEZ O.; INFASCELLI F.; TUDISCO R.; PICCOLO V. In vitro fermentation and methane production of fava and soy beans. **EAAP Scientific Series**, v. 127, n. 1, p. 457-460, 2010.

HALL, M.B. Calculation of non-structural carbohydrate content of feeds that contain non-protein nitrogen. **Bulletin 339** Gainesville, University of Florida, p.1-25, 2000.

HARFOOT, C. G.; HAZLEWOOD, G. P. Lipid metabolism in the rumen. In: **The rumen microbial ecosystem**. Springer Netherlands, p. 382-426. 1997.

HARMON, D.L.; RICHARDS, C.J. Considerations for gastrointestinal in ruminants. **Journal of Animal Science**, v.75, n.8, p. 2248-2255, 1997.

HAROLD, F. M. **The vital force**: a study of bioenergetics. New York, NY: W.H. Freeman and Co., 1986.

HARVATINE, K. J.; ALLEN, M. S. Effects of Fatty Acid Supplements on Ruminal and Total Tract Nutrient Digestion in Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n.3, p.1092–1103, 2006.

HELANDER, I.M.; NURMIAHO-LASSILA, E.L.; AHVENAINEN, R.; RHOADES, J.; ROLLER, S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram- negative bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 71, n. 2, p. 235-244, 2001.

HENRY, D.D.; RUIZ-MORENO, M.; CIRIACO, F.M.; KOHMANN, M.; MERCADANTE, V.R.G.; LAMB, G.C.; DILORENZO, N. Effects of chitosan on nutrient digestibility, methane emissions, and in vitro fermentation in beef cattle. **Journal of animal science**, v. 93, n. 7, p. 3539-3550, 2015.

HENRY, D. D.; CIRIACO, F. M.; GARCIA-ASCOLANI, M. E.; MERCADANTE, V. R. G.; SCHULMEISTER, T. M.; FONTES, P. L. P.; LAMB, G. C.; DILORENZO, N. Effects of chitosan on ruminal fermentation and *in situ* nutrient degradability. **Florida Beef Research Report**, p. 143. 2015.

HRISTOV, A.N. Comparative characterization of reticular and duodenal digesta and possibilities of estimating microbial outflow from the rumen based on reticular sampling in dairy cows. **Journal of Animal Science**, v.85, n.10, p.2606–2613, 2007.

HUHTANEN, P.; BROTZ, P.G.; SATTER, L.D. Omasal sampling technique for assessing fermentative digestion in the forestomach of dairy cows. **Journal of Animal Science**, v.75, n.5, p.1380-1392, 1997.

JENKINS, T.C.; WALLACE, R.J.; MOATE, P.J.; MOSLEY, E.E. Board-invented review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. **Journal of Animal Science**, v.86, n.2, p. 397-412, 2008.

JENKINS, T. C. Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 12, p. 3851-3863, 1993.

KANEKO, J. J., HARVEY, J. W., & BRUSS, M. L. (Eds.). **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008.

KANG, S.; WANAPAT, M.; PAKDEE, P.; PILAJUN, R.; CHERDTHONG, A. Effects of energy level and *Leucaena leucocephala* leaf meal as a protein source on rumen fermentation efficiency and digestibility in swamp buffalo. **Animal Feed Science and Technology**, v. 174, n. 3, p. 131-139, 2012.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n.1, p. 3-11, 2010.

KENWARD, M.G.; ROGER, J.H. Small sample inference for fixed effects from restricted maximum likelihood. **Biometrics**, v.53, n.3, p. 983-997, 1997.

KOBAYASHI, Y.; WAKITA, M.; HOSHINO, S. Effects of the ionophore salinomycin on nitrogen and long-chain fatty acid profiles of digesta in the rumen and the duodenum of sheep. **Animal feed science and technology**, v. 36, n. 1-2, p. 67-76, 1992.

KONG, M.; CHEN, X.G.; XING, K.; PARK, H.J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. **International journal of food microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51-63, 2010.

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

KOVACS, P.L.; SUDEKUM, K. H.; STANGASSINGER, M. Effects of intake of a mixed diet and time postfeeding on amount and fiber composition of ruminal and fecal particles and digesta passage from the reticulo-rumen of steers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 71, n.3-4, p. 325-340, 1998.

KRIZSAN, S.J.; AHVENJARVI, S.; VOLDEN, H.; BRODERICK, G.A. Estimation of rumen outflow in dairy cows fed grass silage-based diets by use of reticular sampling as an alternative to sampling from the omasal canal. **Journal of Dairy Science**, v.93, n.3, p.1138-1147, 2010.

KUMAR, A. B. V.; VARADARAJ, M. C.; GOWDA, L. R.; THARANATHAN, R. N. Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosan analysis with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. **The Biochemical Journal**, v. 391, n.2, p. 167–175, 2005.

KUMAR, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n.1, p. 1-27, 2000.

LE DUNG, P.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; DESBRIÈRES, J. Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 24, n. 3, p. 209-214, 1994.

LENG, R.A. Factors affecting the utilization of "poorquality" forages by ruminants particularly under tropical conditions. **Nutricional Research and Review**, v. 3, n. 3, p.277-303, 1990.

LI, C.Y.; ZHAO, X.H.; CAO, Y.C.; LEI, Y.G.; LIU, C.J.; WANG, H.X.; YAO, J.H. Effects of chitosan on in vitro ruminal fermentation in diets with different forage to concentrate ratios. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 12, n. 7, p. 839-845, 2013.

MARIZ, L. D. S.; VALADARES FILHO, S. C.; DETMANN, E.; PEREIRA, O. G.; PEREIRA, L. G. R.; MARCONDES, M. I.; SANTOS, S.A.; VILLADIEGO, F.A.C.; ZANETTI, D.; PRADOS, L.F.; NUNES, A. N. Intake and ruminal digestion determined using omasal and reticular digesta samples in cattle fed diets containing sugar cane in natura or ensiled sugar cane compared with maize silage. **Livestock Science**, v. 155, n. 1, p. 71-76, 2013.

MATHEW, S.; SAGATHEMAN, S.; THOMAS, J.; MATHEN, G. An HPLC method for estimation of volatile fatty acids of ruminal fluid. **Indian journal of animal sciences**, v. 67, n. 9, p. 805-807, 1997.

MCBRIDE, B.W.; MILLIGAN, L.P; TURNER, B.V. Endoscopic observations of digesta transfer from the reticulo-rúmen to omasum of cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v.64, suppl, p.84-85, 1984.

MIGLIANO, M. E. D. A.; SILANO, C.; MARTINS, C. M. D. M. R.; ARCARI, M. A.; SANTOS, M. V. D. Effect of dietary nitrogen source and crude protein content on nitrogen balance and lactating performance of dairy cows. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 1, p. 72-87, 2016.

MINGOTI, R.D.; FREITAS, J.E.; GANDRA, J.R.; GARDINAL, R.; CALOMENI, G.D.; BARLETTA, R.V.; VENDRAMINI, T.H.A.; PAIVA, P.G.; RENNÓ, F. P. Dose response of chitosan on nutrient digestibility, blood metabolites and lactation performance in Holstein dairy cows. **Livestock Science**, v. 187, p. 35-39, 2016.

MINGOTI, R. D.; GARDINAL, R.; CALOMENI, G. D.; ESLER, J. Consumo de matéria seca, produção e composição do leite de vacas em lactação suplementadas com doses crescentes de quitosana. **Anais do VI Simpósio de Pós-Graduação e Pesquisa em Nutrição e Produção Animal – FMVZ – USP – 2012**

NAGARAJA, T. G.; NEWBOLD, C. J.; VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. Manipulation of ruminal fermentation. In: **The rumen microbial ecosystem**. Springer Netherlands, p. 523-632. 1997.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids and new world camelids**. Washington: National Academic Press, 384 p. 2007.

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

NAVES, A.B.; BARLETTA, R.V.; GANDRA, J.R.; FREITAS JÚNIOR, J.E.; VERDURICO, L.C.; BENEVENTO, B.C.; MINGOTI, R.D.; RENNÓ, F.P. Desempenho e perfil plasmático de vacas leiteiras alimentadas com grão de soja integral ou moído. **Archivos de Zootecnia**, v. 62, n. 240, p. 579-588, 2013 .

NAVES, A. B. **Utilização de grão de soja integral e processado em rações de vacas em lactação**. Pirassununga, SP: USP, 2010. 73p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade de São Paulo, 2010.

NÖRNBERG, J. L.; LÓPEZ, J.; STUMPF JUNIOR, W.; COSTA, P. B.; SCHAFHÄUSER JUNIOR, J. Desempenho de vacas Jersey suplementadas com diferentes fontes lipídicas na fase inicial da lactação. **Revista brasileira de zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1431-1438, 2006.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Effects of corn grain conservation method on ruminal digestion kinetics for lactating dairy cows at two dietary starch concentrations. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n.1, p.184–194, 2003.

PAIVA, P.G.; JESUS, E.F.; DEL VALLE, T.A.; ALMEIDA, G.F.; COSTA, A.G.B.V.B.; CONSENTINI, C.E.C.; ZANFERARI, F.; TAKIYA, C.S.; BUENO, I.C.S.; RENNÓ, F.P. Effects of chitosan on ruminal fermentation, nutrient digestibility, and milk yield and composition of dairy cows. **Animal Production Science**, v. 57, n. 2, p. 301-307, 2016.

PALMQUIST, D. L.; MATTOS, W. R. S. **Metabolismo de Lipídeos**. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. *Nutrição de Ruminantes*, 2ª edição, Jaboticabal: Funep, cap. 10, p. 299-321. 2011.

PALMQUIST, D. L. Influence of Source and Amount of Dietary Fat on Digestibility in Lactating Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 4, p. 1354-1360, 1991.

PALMQUIST, D. L. Using rumen inert fats in dairy diets. In: **Proc. Pacific Northwest Nutr. Conf., Spokane, W. A.** p. 71. 1988.

PAUL, S. S; LAL, D. Nutrient requirements of buffaloes. Delhi: Satish Serial, p. 6-7. ISBN 81- 89304-76-3. 2010.

PEREIRA, C.M.A.; SILVA, J.F.C.; VALADARES FILHO, S.C.; CAMPOS, J.M.S.; CECON, P.R. Grão de soja moído na ração de vacas em lactação. 1. Consumo e digestibilidade dos nutrientes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 27, n.6, p. 1218-1224, 1998.

PEREIRA, F. M. **Uso de quitosana em dietas para cordeiros confinados**. 2017. 95f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2017.

PRADO, O.P.P.; ZEOULA, L.M.; MOURA, L.P.P.; FRANCO, S.L.; PRADO, I.N.; JACOBI, G. Effect of propolis and sodium monensin addition on digestibility and ruminal characteristics of buffaloes fed diet based on roughage. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 9, p. 2055-2065, 2010.

REDDY, P.V.; MORRIL, J.L.; NAGARAJA, T.G. Release of fatty acids from raw or processed soybeans and subsequent effects on fiber digestibilities. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.341-346, 1994.

RIBEIRO, R. **Digestibilidade ruminal obtida com digesta omasal, perfil de degradação obtido por esvaziamento ruminal e estimativa da fração digestível da fibra em detergente neutro de volumosos para bovinos**. 2013. 65 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2013.

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

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, n.3-4, p. 185-198, 2009.

ROGERES, J.A.; DAVIES, C.L. Rumen volatile acid production and nutrient utilization in steers fed a diet supplemented with sodium bicarbonate and monensin. **Journal of Dairy Science**, v.65, n.6, p.944-952, 1982.

ROTTA, P. P.; VALADARES FILHO, S. C.; DETMANN, E.; COSTA E SILVA, L. F.; PAULINO, M. F.; MARCONDES, M. I.; LOBO, A. A. G.; VILLADIEGO, F. A. C. Digesta sampling sites and marker methods for estimation of ruminal outflow in bulls fed different proportions of corn silage or sugarcane. **Journal of animal science**, v. 92, n. 7, p. 2996-3006, 2014.

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.; WILSON, D.B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH?. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 8, p. 1503-1509, 1996.

SAMPAIO, C. B.; DETMANN, E.; PAULINO, M. F.; VALADARES FILHO, S. C.; SOUZA, M. A.; LAZZARINI, I.; PAULINO, P. V. R.; QUEIROZ, A. C. Intake and digestibility in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. **Tropical Animal Health Production**, v. 42, n.7, p. 1471–1479, 2010.

SANTINI, F.J.; LU, C.D.; POTCHOIBA, M.J.; FERNANDEZ, J.M.; COLEMAN, S.W. Dietary fiber and milk yield, mastication, digestion, and rate of passage in goats fed alfalfa hay. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.1, p.209-219, 1992.

SCHAUFF, D.J. Effects of feeding lactating dairy cows diets containing soybeans and tallow. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.7, p.1923-1935, 1992.

SECUNDINO, B. S. S.; ARAKI, H. M. C.; PEDRINI, C.A.; ORBACH, N. D.; OLIVEIRA, E. R.; GOES, R. H.T. B.; GANDRA, J. R. Ingestive behavior of jersey heifers fed chitosan and whole raw soybeans In: IV Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão - ENEPEX, 2017, Dourados. Anais do ENEPEX, 2017.

SEGABINAZZI, L. R.; VIÉGAS, J.; FREITAS, L. D. S.; BRONDANI, I. L.; ARGENTA, F. M.; BINOTTO, J. Behavior patterns of cows with Charolais or Nellore breed predominance fed diets with plant extract or monensin sodium. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 12, p. 2954-2962, 2011.

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

SENEL, S.; MCCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n. 10, p. 1467-1480, 2004.

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

SILVA, D. J., & QUEIROZ, A. C. Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos). Viçosa, MG: Editora UFV, 235. 2002.

SILVA, M. M. C. **Suplementação de lipídios em dietas para cabras leiteiras**. 2005. 129 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2005.

SISSONS, J.W.; SMITH, R.H. Measurement of flow and sampling of digesta in the preruminant calf. **Journal of Physiology**, v.283, n.1, p.307-317, 1978.

SMITH, W. A. Fats for lactating dairy cows. **South African Journal of Animal Science**, v. 21, n. 1, p. 1-10, 1991.

SOUZA, S. R. M. B. O.; ÍTAVO, L. C. V.; RÍMOLI, J.; ÍTAVO, C. C. B. F.; DIAS, A. M. Comportamento ingestivo diurno de bovinos em confinamento e em pastagens. **Archivos de Zootecnia**, v. 56, n. 213, p. 67-70, 2007.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. User's guide. Cary: SAS Institute. Cary: SAS Institute, 525. 2002.

STERN, M.D.; ILLG, D.J. Empleo de soya integral e la alimentación de ruminantes. **Soya Not**, v.20, n.277, p.14-20, 1991.

SUTHERLAND, T.M. **Particle separation in the forestomachs of sheep**. In: Aspects of digestive physiology in ruminants, Cornell University Press, p.43-73, 1988.

VAN NEVEL, C.; DEMEYER, D. Lipolysis and biohydrogenation of soyabean oil in the rumen in vitro: inhibition by antimicrobials. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 12, p. 2797-2806, 1996a.

VAN NEVEL C.J.; DEMEYER D.I. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soyabean oil by rumen contents in vitro. **Reproduction Nutrition Développement**, v. 36, n. 1, p. 53-63, 1996c.

VAN SOEST, P. J., ROBERTSON, J. B., & LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, 74, 3583–3597. 1991.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2 ed. Cornell University Press, NY, p. 476. 1994.

VARGAS, L. H., LANA, R. D. P., JHAM, G. N., SANTOS, F. L., QUEIROZ, A. C. D., & MANCIO, A. B. Lipids in the ration of dairy cows: ruminal fermentation parameters, milk production and composition. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31(1), p. 522-529. 2002.

VENDRAMINI, T. H. A.; TAKIYA, C. S.; SILVA, T. H.; ZANFERARI, F.; RENTAS, M. F.; BERTONI, J. C.; CONSENTINI, C.E.C.; GARDINAL, R.; ACEDO, T.S.;

RENNÓ, F. P. Effects of a blend of essential oils, chitosan or monensin on nutrient intake and digestibility of lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 214, p. 12-21, 2016.

VENTURELLI, B. C. **Grão de soja cru e integral na alimentação de vacas leiteiras no terço final de lactação**. 2011. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, University of São Paulo, Pirassununga, 2011.

WELCH, J. G.; SMITH, A. M. Particle sizes passed from rumen. **Journal of Animal Science**, v. 46, p. 309-312, 1978.

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

WENCELOVA, M.; VARADYOVA, Z.; MIHALIKOVA, K.; KISIDAYOVA, S.; JALC, D. Evaluating the effects of chitosan, plant oils, and different diets on rumen metabolism and protozoan population in sheep. **Turkish Journal Of Veterinary & Animal Sciences**, v. 38, n. 1, p. 26-33, 2014.

WOULIJOKI, E.; HIRVELA, T.; YLITALO, P. Decrease in serum LDL cholesterol with microcrystalline chitosan. **Methods & Finding in Experimental & Clinical Pharmacology**, v. 21, n. 5, p. 357-362, 1999.

YIHUA, Y. U.; BINGLIN, H. E. A new low density lipoprotein (LDL) adsorbent. **Artificial Cells, Blood Substitutes and Immobilization Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 445-450, 1997.

ZAKLOUTA, M.; HILALI, M.; NEFZAOU, A.; HAYLANI, M. **Animal nutrition and product quality laboratory manual**. ICARDA, Aleppo, Syria. 2011. 92p.

ZEOULA, L.M.; PRADO, O.P.P.; GERON, L.J.V.; BELEZE, J.R.F.; AGUIAR, S.C.; MAEDA, E.M. Total digestibility and in situ degradability of bulky diets with the inclusion of ionophores or probiotics for cattle and buffaloes. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 2063-2076, 2014.

ANEXO 1



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB Autorizada pelo
Decreto Estadual nº 7344 de 27.05.98
Comitê de Ética No Uso de Animais – CEUA / UESB

Concordância do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA

O Protocolo 43/2013 referente ao projeto “Fluxo reticular e omasal de nutrientes e dinâmica ruminal em vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo quitosana associada a grão de soja cru e integral” sob responsabilidade do Dr. Jose Esler de Freitas junior - UFBA (Departamento de Zootecnia) foi **APROVADO e liberado para condução pelo pesquisador e equipe**, conforme determinação da reunião ocorrida em 03/06/2013 e reiterada pela reunião de 02/12/2013.

Lembramos ao pesquisador que:

- O responsável pelo projeto ou protocolo encaminhará à CEUA, ao final do estudo, um relatório de uso de animais. O relatório deverá conter informações básicas acerca do projeto ou protocolo de acordo com o roteiro publicado em conjunto com a RN nº 4 do CONCEA.
- No caso da necessidade da continuidade dos projetos ou protocolos usando animais para fins científicos ou didáticos é obrigatório o envio do Relatório à CEUA acrescido da justificativa.
- Para os casos da continuidade de projetos ou protocolos, após a análise do relatório e de esclarecimentos adicionais, se necessário, a CEUA pode deferir, suspender, ou requerer modificação dos mesmos, dentro de suas atribuições.

Itapetinga, 23 de Junho de 2014.

Sônia Martins Teodoro

Dr.^a Sônia Martins Teodoro

Coordenadora CEUA/UESB