



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**MICROBIOTA RUMINAL DE NOVILHOS MANTIDOS A PASTO,
SUPLEMENTADOS COM QUITOSANA E DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DE
DIFERENTES DIETAS PARA RUMINANTES**

MARIANAVIEGAS DOS SANTOS

Dourados, MS

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**MICROBIOTA RUMINAL DE NOVILHOS MANTIDOS A PASTO,
SUPLEMENTADOS COM QUITOSANA E DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DE
DIFERENTES DIETAS PARA RUMINANTES**

MARIANAVIEGAS DOS SANTOS

Orientador: Rafael Henrique de
Tonissi e Buschinelli de Goes

Co-orientador: Jefferson Rodrigues
Gandra

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação da Universidade
Federal da Grande Dourados, como
parte dos requisitos à obtenção do
título de Mestre em Zootecnia. Área
de Concentração: Produção Animal.

Dourados, MS

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S237m Santos, Mariana Viegas Dos
MICROBIOTA RUMINAL DE NOVILHOS MANTIDOS A PASTO,
SUPLEMENTADOS COM QUITOSANA E DIGESTIBILIDADE IN VITRO
DE DIFERENTES DIETAS PARA RUMINANTES / Mariana Viegas Dos
Santos – Dourados: UFGD, 2018.
65f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Goes
Co-orientador: Jefferson Rodrigues Gandra

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias,
Universidade Federal da Grande Dourados.
Inclui bibliografia

1. manipulação ruminal. 2. microrganismos ruminais. 3. aditivos. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

**MICROBIOTA RUMINAL DE NOVILHOS MANTIDOS A PASTO,
SUPLEMENTADOS COM QUITOSANA E DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DE
DIFERENTES DIETAS PARA RUMINANTES**

por

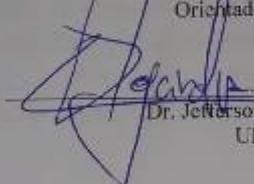
MARIANA VIEGAS DOS SANTOS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título
de MESTRE EM ZOOTECNIA

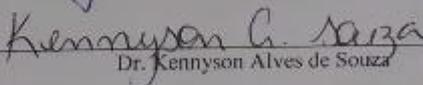
Aprovada em: 16/04/2018



Dr. Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Goes
Orientador – UFGD/FCA



Dr. Jefferson Rodrigues Gandra
UFGD/FCA



Dr. Kennyson Alves de Souza

*Os sonhos de Deus são maiores que os teus
Tão grandes que nem pode imaginar
Não desanime, filho eu vim te consolar
Nas minhas promessas volte a acreditar
Os sonhos de Deus são maiores que os teus
Por isso vale à pena acreditar
O dia está chegando, eu vou te renovar
Na minha presença tu vais prosperar
(Preto no Branco)*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me guiar, iluminar e abençoar em todos os caminhos e em minhas decisões, por ser a força que me motiva a viver e lutar por meus sonhos e ideais.

À minha família, meus pais Josival e Edna, meus irmãos Josivaldo e Carol por me apoiarem, incentivarem e me aconselharem em todas as decisões. Sou privilegiada por ter uma família tão especial, sempre unida e presente.

Aos meus melhores amigos Vanessa, Apatche, Ana Lucia e Alfred por todo apoio, incentivo, motivação, obrigado pelos seus ouvidos e também pelos puxões de orelha.

Aos professores Dr. Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Goes e Dr. Jefferson Rodrigues Gandra meus orientadores, em primeiro por aceitarem me orientar e pela realização desse projeto, por todo tempo, paciência, conselhos e pelos conhecimentos que me foram transmitidos.

A todos os professores envolvidos no programa de pós-graduação em Zootecnia, pela formação e oportunidade de realização deste curso, que só vem a acrescentar nas profissões das ciências agrárias.

Aos alunos da graduação do curso de zootecnia integrantes do grupo de pesquisa NERU, obrigada por todo auxílio e dedicação, sem vocês o desenvolvimento deste trabalho não seria possível.

A Amanna Gonzaga Jacaúna por todo auxílio, ajuda, amizade, nas coletas e análises, e principalmente por ter me acolhido e dado todo suporte quando precisei em Dourados e em Cuiabá, muito obrigado.

Ao Professor Dr. Luciano da Silva Cabral por todo apoio, auxílio e ter me permitido realizar as análises laboratoriais nos laboratórios da Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT, campus Cuiabá - MT.

Ao Felipe Cacite e demais orientados do professor Luciano da UFMT que me deram todo suporte na realização das análises laboratoriais.

A Capes pela concessão da bolsa de estudos para execução do projeto.

Obrigada a todos, pois à sua maneira, todos contribuíram.

BIOGRAFIA

Mariana Viegas dos Santos, filha de Josival Pereira dos Santos e Edna de Jesus Barbosa Viegas dos Santos, nasceu em 18 de Outubro de 1993, na cidade de Dourados situada no Mato Grosso do Sul.

Em fevereiro de 2011 ingressou no curso de Zootecnia pela Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD, graduando-se em Julho de 2016.

Em abril de 2016 iniciou o programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, na Universidade Federal da Grande Dourados, desenvolvendo estudos na área de Produção de Ruminantes.

SUMÁRIO

	Pag.
CAPITULO 1	
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 MODULADORES DE FERMENTAÇÃO RUMINAL.....	2
2.1.1 QUITOSANA.....	2
2.1.2 LÍQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DE CAJU.....	6
2.1.3 ÁCIDO RICINOLEICO.....	8
2.1.4 MONENSINA.....	8
2.2 CARACTERÍSTICAS DO RUMEN.....	9
2.3 MICRORGANISMOS RUMINAIS.....	10
2.4 QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS RUMINAIS.....	13
2.5 DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i>	13
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
4. OBJETIVOS.....	22
CAPITULO 2	
MICROBIOTA RUMINAL DE NOVILHOS MANTIDOS A PASTO E SUPLEMENTADOS COM QUITOSANA	
RESUMO.....	23
ABSTRACT.....	24
INTRODUÇÃO.....	25
MATERIAL E METODOS.....	26
RESULTADOS.....	28
DISCUSSÃO.....	30
CONCLUSÃO.....	33
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
CAPITULO 3	
DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DE DIFERENTES ADITIVOS EM DIETAS PARA RUMINANTES	
RESUMO.....	36
ABSTRACT.....	37
INTRODUÇÃO.....	38
MATERIAL E METODOS.....	39
RESULTADOS.....	42

DISCUSSÃO.....	43
CONCLUSÃO.....	46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
APÊNDICE.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nichos tróficos e principais produtos de espécies bacterianas e <i>Archaea</i> mais estudadas.....	11
Tabela 2. Primers utilizados na identificação dos microrganismos ruminais.....	27
Tabela 3. Disponibilidade de forragem de matéria seca verde, consumo e digestibilidade aparente total da MS, pH ruminal e N-NH ₃ (mg/dL) do líquido ruminal, eficiência de síntese Microbiana e Balanço de Nitrogênio de novilhos suplementados com diferentes níveis de inclusão de quitosana.....	28
Tabela 4. Rendimento e qualidade da extração do DNA de amostras do rúmen de novilhos suplementados com quitosana.....	29
Tabela 5. Grupos de microrganismos presentes no rúmen de novilhos suplementados com quitosana.....	29
Tabela 6. Teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), matéria orgânica (MO) e fibra em detergente neutro (FDN) das dietas.....	39
Tabela 7. Coeficiente de digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS), fibra em detergente neutro (DIVFDN), matéria orgânica (DIVMO) e proteína bruta (DIVPB) dos aditivos.....	43
Tabela 8. Coeficiente de digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS), fibra em detergente neutro (DIVFDN), matéria orgânica (DIVMO) e proteína bruta (DIVPB) dos aditivos dentro de cada ração volumoso: concentrado (V: C).....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura primária da (a) quitosana, (b) quitina e (c) celulose.....	3
Figura 2. Estruturas polimórficas da quitina.....	3
Figura 3. Valores de concentração de DNA do conteúdo ruminal de novilhos suplementados com quitosana.....	30

LISTA DE APÊNDICE

EXTRAÇÃO DO DNA.....46

RESUMO

SANTOS, Mariana Viegas, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados MS, Abril de 2018. **Microbiota ruminal de novilhos mantidos a pasto, suplementados com quitosana e digestibilidade *in vitro* de diferentes dietas para ruminantes.** Orientador: Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Goes; Co-orientador: Jefferson Rodrigues Gandra.

Objetivou-se avaliar a microbiota do rúmen de bovinos alimentados com inclusão de quitosana na dieta e avaliar o efeito da adição de aditivos (monensina (MON); líquido da casca da castanha de caju (LCC); quitosana (Q) e ácido ricinoléico (AR) sobre a digestibilidade *in vitro* dos nutrientes para ruminantes. Para a avaliação da microbiota do rúmen foram utilizados cinco (5) novilhos mestiços canulados no rúmen com peso médio de 350 kg mantidos em piquetes individuais de *Urochloa brizantha* cv Marandu e distribuídos em quadrado latino 5x5. Os animais foram suplementados diariamente na proporção de 0,15% peso corporal (PC). A quitosana (85% desatilação) foi fornecida em associação a um suplemento mineral protéico 30%. As doses de quitosana utilizadas foram de 0; 400; 800; 1200 e 1600 mg / kg de MS. Para a digestibilidade *in vitro* foram utilizados dois bovinos da raça Jersey, adultos, castrados, peso médio de 350 kg, providos de canula ruminal, e mantidos em pasto de *Urochloa brizantha* cv Marandu, recebendo suplementação mineral. Após o final da extração e purificação do DNA, a concentração do DNA e os grupos de microrganismos foram quantificados em um equipamento de espectrofotometria. A pureza e rendimento do DNA foi avaliada por espectrofotometria a partir de razões de absorbância variando de A260 nm/A230 nm e A260 nm/A280 nm. Para realização do ensaio de Digestibilidade *in vitro* foi utilizado três relações volumoso e concentrado (100:00, 50:50 e 20:80) e quatro aditivos para analisar a matéria seca (DIVMS), matéria orgânica (DIVMO), fibra em detergente neutro (DIVFDN) e proteína (DIVPB). O rendimento e a pureza do DNA extraído de amostras do rúmen total de bovinos foram considerados adequados, com quantidade e qualidade satisfatória. É possível observar que com a inclusão das doses crescente de quitosana na dieta dos novilhos houve efeito quadrático no grupo das bactérias celulolíticas e nas *archaea*, porém no grupo das bactérias amilolíticas não houve efeito da inclusão da quitosana. A concentração de DNA extraído também apresentou efeito quadrático com a inclusão das doses de quitosana. No ensaio da Digestibilidade *in vitro* foi verificado o efeito dos fatores principais e da interação entre os aditivos e as razões V: C na DIVMS, DIVPB, DIVMO e DIVFDN. A inclusão de MON, LCC, Q e AR

aumentaram o coeficiente de digestibilidade da MS, devido os aditivos causarem alterações nos padrões de fermentação ruminal. Mas os aditivos MON e Q não diferiram do grupo controle. Na DIVMO e DIVPB a inclusão dos aditivos não causou efeito. Na DIVFDN a Q e o LCC reduziram a digestibilidade. Foi verificado efeito significativo ($P < 0,001$) apenas para as razões volumoso: concentrado sobre a DIVMS, DIVPB e DIVMO, para a DIVFDN ($P = 0,09$). A inclusão de quitosana na proporção de 741,67 mg/kg MS atua alterando benéficamente a microbiota ruminal. Os aditivos MON, LCC, Q e AR quando adicionados na dieta de ruminantes agem como moduladores da fermentação ruminal, resultando em efeitos positivos na digestibilidade dos nutrientes, possibilitando substituir os antibióticos ionóforos.

ix

Palavras-Chave: manipulação ruminal, microrganismos ruminais, aditivos

ABSTRACT

SANTOS, Mariana Viegas, Federal University, Dourados MS, April 2018, **Ruminal microbial of steers kept on pasture, supplemented with chitosan and in vitro digestibility of different diets for ruminants.** Advisor: Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Goes; Co-Advisor: Jefferson Rodrigues Gandra.

The objective of this study was to evaluate the microbiota of the rumen of cattle fed with chitosan inclusion in the diet and to evaluate the effect of the addition of additives (monensin (MON), cashew nut Shell (LCC), powdered chitosan (Q) and ricinoleic acid (AR)) on the in vitro digestibility of nutrients for ruminants. Five (5) rumen cannulated crossbred steers with an average weight of 350 kg were kept in individual paddocks of *Urochloa brizantha* cv Marandu and distributed in a 5x5 Latin square. The animals were supplemented daily at a ratio of 0.15% body weight (CP). Chitosan (85% distillation) was supplied in combination with a 30% protein mineral supplement. The doses of chitosan used were 0; 400; 800; 1200 and 1600 mg / kg DM. For the in vitro digestibility, two adults, castrated Jersey cattle with an average weight of 350 kg were used. They were kept in a *Urochloa brizantha* cv Marandu pasture, receiving mineral supplementation. In order to perform the test, three voluminous and concentrated ratios (100: 00, 50:50 and 20:80) and four additives on the in vitro digestibility of organic matter (IVDMD), dry matter (IVDMD), neutral detergent fiber (DIVFDN) and protein (VPB). DNA extraction was performed following the methodology described by Stevenson and Weimer (2007). The yield and purification of the DNA were obtained by spectrophotometry. The yield and purity of the DNA extracted from samples of the total bovine rumen were considered adequate, with satisfactory quality. Because protocols for extracting DNA based on chloroform with phenol, and a mechanical lysis step extract DNA with higher quantity and quality, requiring no further purification. The bacterial DNA concentration showed a quadratic effect. The inclusion of chitosan acts by altering the concentration of ruminal microorganisms. It was verified effect on the variables IVDMD and DIVFDN for the different additives under study. In the IVDMD there was an increase in the inclusion of the additives, but treatments with the inclusion of MON and Q did not differ from the control treatment. In the DIVFDN there was a reduction with the inclusion of Q. The other additives did not influence the variable. After analysis of variance, significant effect ($P < 0.001$) was observed only for the voluminous: concentrate relationships on IVDMD, VPB, and IVDMD for DIVFDN (P

= 0.09). There was no significant interaction of treatments within the different voluminous: concentrate relationships on IVDMD, DIVFDN, VPB, and DEMO. The additives alone, added to the ruminant diet, act as modulators of ruminal fermentation, resulting in positive effects on nutrient digestibility, allowing the replacement of ionophore antibiotics.

Key words: ruminal manipulation, ruminal microorganisms, additive

CAPITULO 1

1. INTRODUÇÃO

O rúmen é um ambiente microbiano bem distinto, com características ideais para o desenvolvimento de microrganismos como as bactérias, protozoários e fungos. É anaeróbio, apresenta temperatura variando entre 39 a 42°C, pH na faixa de 6,0 - 7,0 dependendo do alimento, constante presença de substratos e atividade fermentativa, mesmo variando na intensidade. A massa microbiana do rúmen pode ser alterada conforme a dieta, consumo e tempo pós - ingestão. (KOZLOSKI, 2009).

Na determinação da qualidade do alimento, os principais fatores são o consumo e a digestibilidade. Ter conhecimento sobre as proporções de nutrientes da dieta, que estão disponíveis a serem absorvidos é permitido pela avaliação da digestibilidade (Borges et al., 2013). Conhecer o valor nutritivo dos alimentos, bem como a utilização dos nutrientes, é de suma importância quando se tem por objetivo alcançar o máximo potencial produtivo e reprodutivo dos animais. (Yamamoto et al., 2005).

A manipulação dos padrões de fermentação ruminal pode melhorar o desempenho dos animais por meio do aumento de energia da dieta, pois durante o processo de digestão da fibra as bactérias gram-positivas produzem os ácidos acético e butírico, estes ácidos são responsáveis pela maior ineficiência dos ruminantes devido a perda de energia (RUSSEL; STROBEL 1989). A Modificação da população microbiana do rúmen pela seleção das bactérias gram-negativas em comparação às gram-positivas aumenta a proporção molar de ácido propiônico em relação ao acético, tornando a digestão e absorção dos nutrientes mais eficientes (PASCOAL et al., 2000).

O emprego da quitosana na dieta de ruminantes quando comparado a indústria alimentícia e medicina humana não é muito utilizado, mas apresenta grande potencial para a produção animal e sanidade animal como aditivo alimentar ou na forma terapêutica (HUANG et al., 2005; ŞENEL; MCCLURE, 2004).

A quitosana é avaliada como provável modulador da fermentação ruminal, melhorando a eficiência alimentar dos ruminantes (GOIRI et al., 2009a); atuando de forma similar ao uso de moduladores como a monensina utilizados na nutrição de não ruminantes, selecionando os microrganismos benéficos que agem em simbiose com o animal.

Recentemente o conhecimento sobre os microrganismos ruminais era obtido por meio da utilização de técnicas clássicas de cultivo, como o isolamento, caracterização e enumeração celular, que representava uma pequena população microbiana entre 10 a

20%. Devido aos avanços na ecologia microbiana estas estão sendo complementadas por técnicas moleculares, pois estas são mais acuradas e realizada em menor tempo. A técnica molecular baseada no gene 16S rRNA permite que a microbiota ruminal seja identificada e quantificada (MCSWEENEY; MACKIE, 2012).

O foco neste estudo foi analisar a população das bactérias *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Streptococcus Bovis*, *Selenomonas ruminantium* e *Archaea*, de acordo com a dieta dos animais e avaliar o efeito da adição de diferentes aditivos sobre a digestibilidade *in vitro* dos nutrientes para ruminantes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MODULADORES DA FERMENTAÇÃO RUMINAL

A produção pode ser impulsionada com a utilização de aditivos na alimentação animal. Pois melhorar o desempenho animal por meio da dieta é o objetivo de se buscar a manipulação do processo de fermentação ruminal, sendo este foco de pesquisas com diversas espécies. Os ionóforos têm recebido destaque, pois são substâncias que interagem passivamente com íons, formando complexos lipossolúveis que agem no transporte iônico pelas membranas biológicas devido a alterações na homeostase intracelular ocasionando distúrbios celulares funcionais e morfológicos (BEZERRA et al., 2000; NICODEMO, 2001).

A União Européia em 2006 proibiu a utilização de monensina sódica como promotor de crescimento na alimentação animal, como uma medida preventiva motivado por este apresentar características de intoxicação quando mal administrado, mesmo quando em pequenas quantidades. Desta forma torna - se necessária a utilização de novos aditivos como os naturais para que a atividade continue se desenvolvendo e atendendo as demandas do setor (FERELI et al., 2010).

2.1.1 QUITOSANA

A quitina é o componente principal do exoesqueleto de crustáceos e insetos, podendo ser encontrado também na parede celular de bactérias e fungos (ŞENEL; MCCLURE, 2004), possui cadeia linear composta de unidades de N-acetil-2-dioxi-Dglicopirranose, que apresentam ligações glicosídicas $\beta(1,4)$ (NITSCHKE, 2011). Sua estrutura molecular é semelhante à fibra vegetal conhecida como celulose sendo o segundo biopolímero mais abundante da natureza (Figura 1), que pode ter variação em

função do grau de acetilação e da massa molecular (ABREU et al., 2013; AZEVEDO et al., 2007).

Conforme sua origem a existência da quitina pode ser de três formas diferentes que são definidas de acordo com a disposição das cadeias constituintes do polímero. Na α -quitina as cadeias poliméricas são dispostas antiparalela, sendo a mais estável e abundante podendo ser encontrada no exoesqueleto dos artrópodes atribuindo maior rigidez. Na β -quitina a disposição das cadeias poliméricas é paralela e pode ser encontrada nas lulas conferindo flexibilidade e resistência. Já a γ -quitina possui uma variação das duas posições, segundo o esquema da Figura 2 (MATSUI, 2007).

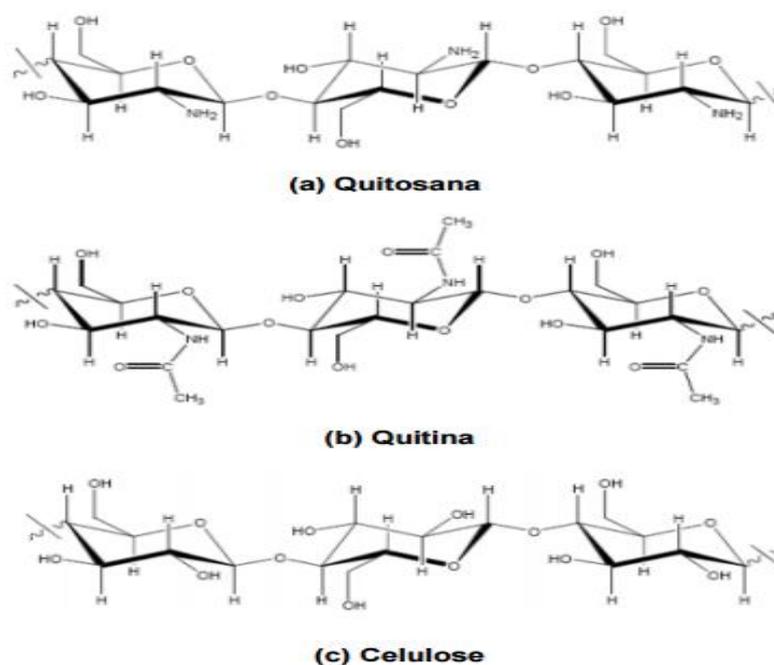


Figura 1 - Estrutura primária da (a) quitosana, (b) quitina e (c) celulose (Adaptado de Antonino, 2007).

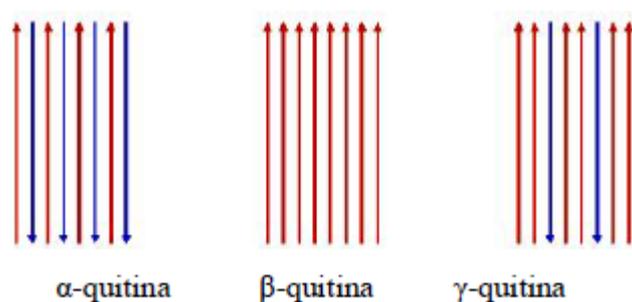


Figura 2 – Estruturas polimórficas da quitina (Adaptado de ANTONINO, 2007).

A quitosana é um polímero obtido após o processo de desacetilação alcalina da quitina por meio de soluções de alta concentração de hidróxido de sódio (NaOH, 40-50%) conseguindo assim a sua degradação. Durante o processo de desacetilação, os grupos acetamido (-NHCOCH₃) da quitina são decompostos em diferentes graus, em grupos amina (NH₂), aonde surge a quitosana (COSTA, 2013; OLIVEIRA, 2006). Durante esta hidrólise há remoção de todos ou da grande maioria dos grupos de acetila da quitina, liberando assim os grupos amina que são da natureza catiônica da quitosana (OLIVEIRA, 2006; SENEL; MCCLURE, 2004).

A quitosana possui grupos ativos diferentes, dois destes são do grupo hidroxil, sendo primário e secundário e o grupo amina presente nas posições C-2, C-3 e C-6. O grupo amina é de suma importância, pois possui relação com a solubilidade da quitosana, onde uma característica muito importante é o grau de desacetilação, pois atribui o rótulo de polímero quitinico ou quitosânico. Assim, quanto maior o grau de desacetilação maior será a solubilidade em meio aquoso, conferindo carga positiva para quitosana o que melhora conseqüentemente as reações com carga negativas e polímeros aniônicos (TORRES, 2009).

Segundo Azevedo et al. (2007) a quitosana é um produto natural renovável e biodegradável que apresenta baixo custo e ampla importância tanto econômica como ambiental, pois a indústria pesqueira tem descartado fartamente as carapaças dos crustáceos por considerar estes poluentes. Quando utilizada na produção farmacêutica, nutrição animal, entre outras pode reduzir os impactos ambientais que são causados pela aglomeração destes em locais aonde são armazenados.

A quitosana é um composto insolúvel em água, em solventes orgânicos e em bases, mas é solúvel na maioria das soluções de ácidos orgânicos, com pH inferior a 6,0. Os ácidos acético e fórmico apresentam maior utilização na dissolução da quitosana, ácidos inorgânicos diluídos, como nítrico e clorídrico também podem ser utilizados para preparar uma dispersão de quitosana, mas necessita de prolongada agitação e aquecimento (RINAUDO; MILAS, 1997).

A quitosana apresenta uma gama de propriedades físico-químicas e biológicas, e uma aplicação bem vasta em áreas como no tratamento de água e dejetos, na agricultura, fábricas de tecido, cosméticos, nutrição animal e processamento de alimentos, por não apresentar toxicidade e ação alergênica. A biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioatividade tornam a quitosana uma substância muito atrativa em

aplicações como farmacêuticas e clínicas (ILLUM, 1998; SINGLA; CHAWLA, 2001). Segundo Li et al. (1992), a quitosana também apresenta propriedade quelante, aonde de maneira seletiva esta se une a substâncias como colesterol, gorduras, proteínas, células cancerígenas, e também a íons metálicos, acarretando sua exploração em distintas aplicações (KURITA et al., 1986; MATHUR; NARANG, 1990; ROBERTS, 1992).

Em estudos de Goiri et al. (2009a), os autores propõem que a quitosana apresenta atividade antimicrobiana e a sua utilização pode modular a fermentação e a digestão ruminal, apresentando bons resultados.

A quitosana possui atividade antimicrobiana reconhecida contra várias bactérias e fungos, mas pode ser influenciada por fatores como o tipo de quitosana, o grau de polimerização e algumas propriedades químicas e físicas (CHOI et al., 2001, NO et al., 2002). Normalmente a maior atividade antimicrobiana da quitosana é contra bactérias gram-positivas do que gram-negativas, sendo que esta atividade é conseguida em baixo pH (4.5 - 5.9) (SENEL; McCLURE, 2004). Quando solubilizada em soluções ácidas, as cargas positivas da quitosana interferem com a carga negativa de macromoléculas presentes na superfície celular bacteriana, possivelmente competindo com Ca^{+2} por sítios negativos na membrana sem atribuir estabilidade, tornando a membrana permeável (BÉGIN; VAN CALSTEREN, 1999). Nos EUA a quitosana recebeu o status de segura e pode ser utilizada como uma alternativa aos antibióticos na nutrição animal (PAIVA, 2015).

Em não ruminantes os estudos são mais desenvolvidos com o intuito de melhorar a retenção de nitrogênio, a eficiência alimentar e desempenho de frangos de corte (HUANG et al., 2005; SUK, 2004) e de leitões recém desmamados (HUANG et al., 2005).

Goiri et al. (2010) investigaram os efeitos da quitosana na fermentação ruminal e cecal em ovinos, e observaram que o tratamento com a quitosana causou aumento da proporção de propionato, e também aumentou a relação de propionato : acetato. Concluindo que a quitosana deslocou a fermentação ruminal para rotas energeticamente mais eficientes, sem reduzir a digestibilidade aparente de matéria orgânica.

Araújo et al (2015) adicionando quitosana nas doses de 50, 100 e 150 mg / kg de PV e Dias et al (2017) adicionando nas doses de 0, 400, 800, 1200 ou 1600 mg / kg de MS para novilhos não encontraram efeito sobre o pH ruminal, mas observaram efeito quadrático sobre a concentração de nitrogênio amoniacal (NH_3) no fluido ruminal, as

quais podem estar associado ao aumento da digestibilidade total da PB e menor degradação da proteína.

Belanche et al (2016) avaliando o modo de ação de saponinas e quitosana sobre a fermentação ruminal e metanogênese em vacas pôde observar redução na produção de metano sem impactar de forma negativa na digestibilidade, pois a quitosana não modificou a estrutura e a diversidade da comunidade de bactérias metanogênicas em comparação com o grupo controle sem adição de aditivo, mas reduziu a porcentagem da população de bactérias metanogênicas em relação às bactérias totais (-45%) e promoveu substituição de certos gêneros de bactérias dentro da família *Methanomassiliicoccaceae*.

Belanche et al. (2015) avaliando os efeitos de terras diatomáceas, quitosana insolúvel, quitosana solúvel, farinha de algas, *Ascophyllumnodosum*, *Laminariadigitata*, óleo de Neem e um extrato de hera rico em saponinas sobre a manipulação do rúmen *in vitro* observaram que a quitosana insolúvel possui pouco efeito no rúmen; causando pequena redução na atividade dos protozoários quando utilizado doses elevadas (2 gL^{-1}), enquanto a quitosana solúvel diminuiu a fermentação ruminal e teve efeito antiprotozoário, promovendo uma diminuição da atividade protozoárias em até -56%, quando incubados a 2 g L^{-1} , e também observaram redução nas emissões de metano.

Mingoti et al (2016) avaliando os efeitos de diferentes níveis de inclusão de quitosana sobre a ingestão de matéria seca, digestibilidade de nutrientes, e desempenho de vacas leiteiras em lactação, não encontraram efeito, porem observaram aumento linear na digestibilidade aparente da proteína total e efeito quadrático sobre a digestibilidade da MS, MO e FDN. Devido à capacidade da quitosana de alterar os microrganismos do rúmen e os processos digestivos, atuando principalmente nas bactérias Gram-positivas, o que justifica a melhora na digestibilidade de FDN e PB.

2.1.2 LÍQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DE CAJU

O cajueiro faz parte da família dos Anacardiaceae, e seu nome científico é *Anacardium occidentale* L. Esta árvore apresenta uma aparência exótica, com troncos tortuosos, folhas masculinas e hermafroditas e fruto reniforme, com folhas glabras. Possui pedúnculo bem desenvolvido e muito procurado pela suculência que apresenta e normalmente é confundido com o fruto, quando na verdade é apenas o pseudofruto, que

cientificamente é chamado de pedúnculo floral, apresentando variação na coloração desde o amarelo até o vermelho (MAZZETTO et al., 2009).

A castanha de caju como é conhecido o fruto do cajueiro, é um fruto de apenas uma semente que apresenta variação no seu comprimento e largura. A casca é coriácea lisa com mesocarpo alveolado repleto de líquido escuro próximo a cor preta, cáustico e inflamável, sendo chamado de líquido da casca da castanha de caju (LCC). Internamente da castanha se localiza a amêndoa, que é composta de dois cotilédones carnosos e oleosos, que fazem parte da composição da parte que é comestível do fruto, sendo revestida por uma película em tons avermelhados (MAZZETTO et al., 2009).

O líquido da casca da castanha de caju é considerado um óleo funcional e composto fenólico natural, melhor fonte e barata de fenóis insaturados, pois possui na sua composição 10% cardol (dicarboxipentadica-dienilbenzeno), 50% de cardanol e 30% de ácido anacárdico (carbopenta-dica dienilfenol), os quais possuem na sua estrutura uma cadeia lateral acíclica, contendo até três insaturações a partir de C-8. Devido a estas características há o importante desempenho da atividade antibactericida e, por possuir um grupo aromático e alifático, desempenha comportamento hidrofílico e lipofílico capaz de atravessar a membrana celular, principalmente das bactérias Gram-positivas, produtoras de metano, que são menos resistentes, pois não possuem uma camada lipídica presente nas bactérias Gram negativas (HIMEJIMA; KUBO, 1991; NAGAJARA et al., 1997; CORREIA et al., 2006; DÍAZ et al., 2015).

Segundo KUBO et al. (2003) o modo de ação dos princípios ativos do líquido da casca da castanha de caju demonstram que o ácido anacárdico tem ação sobre a membrana física das bactérias causando ruptura e inibindo a cadeia respiratória das bactérias. Os ácidos anacárdicos apresentam atividade antimicrobiana, principalmente em bactérias gram-positivas (MUROI; KUBO, 1993).

O líquido da casca da castanha de caju é considerada uma alternativa na alimentação animal, por melhorar o metabolismo microbiano e favorecer o aumento das concentrações de propionato no rúmen e, a digestibilidade total da dieta (MAIA et al., 2006; HESS et al., 2008). Sua atividade admite que ocorra a quebra dos lipídios da membrana celular das bactérias e mitocôndrias, desorganizando as estruturas, tornando assim o ambiente celular mais permeável. Neste processo a célula começa a gastar energia na tentativa de defesa, mecanismo chamado de hidrofobicidade, que leva ao extravasamento de íons, a translocação de proteínas, a fosforilação e outras reações pelas

enzimas dependentes, causando a morte da bactéria (AMORATI et al., 2001; BURT, 2004; MAZZETTO et al., 2009).

2.1.3 ÁCIDO RICINOLEICO

A mamona (*Ricinus communis L.*) faz parte da família Euphorbiaceae, que compreende uma grande variedade de plantas nativas da região tropical. É uma planta de hábito arbustivo, apresenta diversas colorações de caule, folhas e racemos (cachos), podendo ou não possuir cera no caule e pecíolo. Os frutos possuem espinhos e, em alguns casos, são inermes. As sementes são de diferentes tamanhos, formatos e de grande variabilidade de coloração (CONEGLIAN, 2009).

O ácido ricinoléico presente no óleo de mamona é extraído a partir da prensagem das sementes, atribuindo ao óleo suas características particulares, possibilitando ampla gama de utilização industrial, tornando a cultura da mamoneira um importante potencial econômico e estratégico ao país (CONEGLIAN, 2009).

Segundo Vieira et al.; (2001) o ácido graxo ricinoléico é muito parecido com o ácido oléico, pois apenas se diferencia pela presença de um radical hidroxila presente no ácido ricinoléico e ausente no oléico. Também conhecido como hidroxioleico. O ácido ricinoléico funciona como um ionóforo divalente.

Tem se poucas informações sobre o modo de ação do ácido ricinoléico na alimentação animal, mas já se sabe que apresenta efeito antioxidante (OLOYEDE, 2012; MURAKAMI; EYNG; TORRENT, 2014), laxativo, anti-inflamatório, aumenta a motilidade e permeabilidade intestinal (VIEIRA et al., 2001). Possui ação antimicrobiana (NICOLIELO, 2008; VALERA et al., 2013), anticoccidiano (MURAKAMI; EYNG; TORRENT, 2014) e antifúngico (TAKANO et al., 2007; VALERA et al., 2013), devido apresentar a característica de ionóforo divalente (VIEIRA et al., 2001) e pela presença do grupo hidroxila (ATTRAPADUNG et al., 2010; MEDEIROS et al., 2014), assim beneficia os processos fermentativos e, em consequência, a eficiência energética dos animais (GANDRA et al., 2014), pois, segundo Burt (2004) compostos que possuem um grupo hidroxila interagem com as proteínas da membrana celular das bactérias gram - positivas, levando à ruptura e morte desta.

2.1.4 MONENSINA

A monensina sódica é um antibiótico muito utilizado com o intuito de aprimorar o desenvolvimento dos animais e a eficiência energética (FERELI et al., 2010). Segundo Embrapa (2001) a monensina quando no fluido ruminal, líquido abomasal e nas fezes é estável, e não é degradada e absorvida pelos microrganismos. Quando suplementada, cerca de 50% desta é absorvida e metabolizada pelos bovinos.

A monensina tem como característica proporcionar melhor eficiência alimentar, ocasionando mudanças na população microbiana do rúmen e no padrão de fermentação dos alimentos. Na dieta dos ruminantes, quando adicionada atua no crescimento das bactérias gram-positivas, de forma que ocorram vantagens nutricionais, metabólicas e no desempenho animal devido à produção de alguns produtos durante o metabolismo das bactérias gram-positivas (Oliveira et al, 2005).

Os ionóforos carboxílicos, em especial a monensina sódica, têm comprovada eficiência de utilização e facilmente é comercializada, atualmente é de grande importância como fonte aditiva na produção de carne intensivamente. A monensina atua sobre a membrana celular causando uma troca de cátions do meio interno (corpo bacteriano) para o meio externo (fluido ruminal) e assim vice-versa. A monensina permite que o H^+ do meio intracelular saia e diminua a concentração interna deste componente e que íons Na^+ possam entrar para o interior da célula. A monensina no meio ruminal combina com estes cátions, fazendo com que se tornem permeáveis à membrana lipoproteica, se difundindo pelo interior desta. No final, a monensina quando atinge o lado oposto da membrana permanece sujeita ao ambiente polar, e libera o cátion no interior da célula e volta sua forma aniônica, combinando com um cátion H^+ , que dessa vez o libera no meio extracelular (SALMAN, et al. 2006).

A monensina atua selecionando as bactérias ruminais que, ocasionalmente tem-se aumento na relação de propionato e acetato, redução na produção de metano e na degradação de proteínas da dieta, e em consequência redução no incremento calórico, que acaba guardando aminoácidos destinados à gliconeogênese (DUFFIELD et al., 2008). Desta forma há aumento na eficiência alimentar, mas ocorre variações nas respostas quanto ao ganho de peso, produção de leite e consumo dos animais (MORAIS et al., 2011).

2.2 CARACTERÍSTICAS DO RUMEN

Com o processo de evolução os animais ruminantes ampliaram sua habilidade de poder utilizar de maneira eficiente os carboidratos estruturais como uma fonte de

energia e compostos nitrogenados não-protéicos como fonte de proteína (VALADARES FILHO; PINA, 2006).

A habilidade de poder utilizar os nutrientes é devido ao desenvolvimento dos pré-estômagos e da relação de simbiose que se tem com os microrganismos. A população bacteriana fibrolítica é que realiza o processo de digestão da fibra, pois o animal não é capaz de realizar. Sendo assim estes microrganismos irão sintetizar os nutrientes como proteína microbiana, ácidos graxos voláteis (principal fonte de energia para os ruminantes) e algumas vitaminas. As mudanças anatômicas ocorridas no sistema digestivo nos ruminantes tiveram como consequência melhor uso da fibra dietética e ocasionaram a não dependência da necessidade de ingerir externamente fontes de vitaminas do complexo B e os aminoácidos essenciais (VAN SOEST, 1994).

Alguns fatores do ambiente ruminal são determinantes para a preservação do ambiente favorável ao desenvolvimento contínuo dos microrganismos do rúmen, tais como: manutenção da temperatura entre 38 e 42°C, pelos mecanismos termorreguladores do animal; anaerobiose, embora algum oxigênio livre possa às vezes ser encontrado, provavelmente, oriundo do alimento ou da água ingeridos; pH, que de modo geral, varia entre 5,5 e 7,0, sendo influenciado pelo tipo de alimento ingerido e sua estabilidade garantida pela saliva, que possui alto poder tampão; suprimento contínuo de alimentos e líquidos bem como absorção e remoção constante dos produtos da fermentação proporcionando assim com que não se altere o equilíbrio ideal que possibilita a fermentação ruminal (LANA, 2005).

Devido a toda essa complexidade, estudar a caracterização, quantificação e identificação dos microrganismos ruminais acaba se tornando mais difícil. Pesquisas tradicionais feitas em população microbiana ruminal, eram realizadas com a utilização de técnicas tradicionais, tais como: roll-tube technique (HUNGATE, 1969) ou a técnica de quantificação dos números mais prováveis (DEHORITY et al., 1989). Entretanto, nem todos os microrganismos são identificados por meio dessas técnicas, já que o cultivo dos mesmos *in vitro* é dificultoso, sendo poucos microrganismos identificados, representando uma pequena fração da comunidade.

2.3 MICRORGANISMOS RUMINAIS

Devido as características morfofisiológicas do rúmen, os ruminantes possuem condições para que ocorra a fermentação dos nutrientes pela microbiota ruminal, que é

composta por bactérias (10^{10} /ml de conteúdo de rúmen), fungos (10^4 /ml) e protozoários (10^6 /ml) (LANA, 2007).

As bactérias ruminais são essenciais para a produtividade e saúde dos ruminantes. As bactérias apresentam a maior diversidade no conteúdo ruminal, tanto em número quanto em atividade metabólica. São muito importantes ao processo de fermentação e na degradação de lignina, celulose, hemicelulose, demais proteínas, amido e óleo presente nos alimentos (WELKIE et al., 2010).

Conforme Kozloski (2011) as bactérias são fermentadoras ativas, sendo as mais estudadas e de maior importância nutricional, pela importância econômica na relação com o processo de degradação da fibra vegetal. São classificadas pelo tipo de substrato utilizado e os produtos oriundos de sua fermentação. A classificação consiste em bactérias fermentadoras de carboidratos estruturais, fermentadoras de carboidratos não estruturais, lipolíticas, proteolíticas e as lácticas. Quanto aos protozoários e fungos, têm-se poucos estudos a respeito do seu metabolismo e fisiologia (KOZLOSKI, 2009), na Tabela 1 podem ser observados os principais grupos de bactérias ruminais e suas características.

Tabela 1 – Nichos tróficos e principais produtos de espécies bacterianas e *Archaea* mais estudadas.

Espécie	Nichos tróficos	Principais Produtos
Fermentadores de carboidratos estruturais		
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Parede celular (PC), Celulose pura (Cel)	Succinato (Su), Formato (Fo), Acetato (Ac)
<i>Ruminococcus albus</i>	PC, Cel	Ac, Fo, Etanol (Et)
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	PC, Cel	Su, Fo, Ac
<i>Butyrivibrio fibrosolvens</i>	PC, Cel, Hemicelulose (Hemicel), Amido (Am), Pectina (Pec), Açúcares diversos (AD)	Butirato (Bu), Fo, Lactato (La), Ac
Fermentadores de carboidratos não estruturais		
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	Amido (Am)	Su, Fo, Ac
<i>Selenomonas ruminantium</i>	Am, La, AD	LA, Ac, Propionato (Pro), Bu, Hidrogênio (H ₂)
<i>Prevotella sp.</i>	Am, Hemicel, Pec, Beta-glucanos, Proteínas	Su, Ac, Fo, Pro
<i>Succinomonas amylolytica</i>	Am	Su, Ac, Pro
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	Maltodextrinas (Mal)	Su, Ac, Pro, La
<i>Streptococcus bovis</i>	Am, AD	La, Ac, Fo, Et
<i>Eubacterium ruminantium</i>	Mal, AD	Ac, Fo, Bu, La
<i>Megasphaera elsdeni</i>	La, Mal, Aminoácidos (AA)	Ac, Pro, Bu, Ácidos graxos cadeia

ramificada (AGCR)		
Organismos fermentadores de pectinas		
<i>Lachnospira multiparus</i>	Pec, AD	La, Ac, Fo
Lipolíticos		
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	Glicerol (Gli), La	Ac, Su, Pro
Proteolíticos		
<i>Peptostreptococcus sp.</i>	Peptideos (Pep), AA	AGCR, Ac
<i>Clostridium aminophilum</i>	Pep, AA	Ac, Bu
<i>Clostridium Sticklandii</i>	Pep, AA	Ac, Bu, Pro, AGCR
<i>Wolinella succinogenes</i>	Mal, Fumarato	Su
Facultativos *		
<i>Lactobacillus sp</i>	Am, La, AD	La, Ac, Pro, Bu, H ₂
<i>Enterobacter sp</i>	Am, La, AD	La, Ac, Pro, Bu, H ₂
<i>Streptococcus sp</i>	Am, La, AD	La, Ac, Pro, Bu, H ₂
Archaea (Metanogênicos)		
<i>Methanobrevibacter sp.</i>	H ₂ , CO ₂ , Fo	CH ₄
<i>Methanosarcina sp.</i>	H ₂ , CO ₂ , Ac, Metanol, Metilaminas	CH ₄
<i>Methanomicrobium sp.</i>	H ₂ , CO ₂ , Fo	CH ₄
<i>Methanobacterium sp.</i>	H ₂ , CO ₂ ,	CH ₄

*Gêneros discriminados, pois espécies exclusivamente ruminais não foram suficientemente definidas. Substratos e subprodutos indicados de forma genérica. Adaptado a partir de ARCURI et al., 2011.

Segundo Dehority (1998) as principais espécies de bactérias fermentadoras de carboidratos estruturais, se aderem às fibras dos alimentos e degradam especificamente a celulose e hemicelulose, são elas *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Fibrobacter succinogenes*. Estas apresentam como produtos da fermentação, o propionato, butirato, succinato, formato, CO₂, H₂O e, principalmente, o acetato.

Entre as bactérias fermentadoras de carboidratos não estruturais, algumas espécies do gênero *Bacteroides*, aproveitam o amido como fonte de energia, a espécie *Bacteroides amylophilus* que faz parte deste gênero utiliza o amido, contudo, não consegue utilizar a glicose ou outros monossacarídeos (CALDWELL et al., 1969; MIURA et al., 1980).

Segundo COSTERTON (1981) e COSTERTON; CHENG (1982) a microbiota é dividida em três populações: a população do líquido ruminal; a aderida à fração sólida da digesta e a população ligada à parede do rúmen. A primeira população é a mais estudada, por causa da metodologia rotineira na coleta das amostras e do cultivo do conteúdo do rúmen. CZERKAWSKI (1986) classificou um quarto grupo como “intermediário” entre a população do líquido e da digesta sólida, e tem como função permitir a transferência de material microbiano, de nutrientes e produtos da fermentação

entre as populações da fase sólida e líquida do conteúdo ruminal, devido sua intensa atividade metabólica tem se a criação de um gradiente de concentração que auxilia no suprimento de nutrientes e na remoção dos produtos a serem excretados.

A microbiota ruminal depois de estabelecida pode sofrer alterações no seu desenvolvimento e estabilidade por diversos fatores. A composição da dieta é o mais comumente e importante no equilíbrio da microbiota ruminal devido sua estrutura física e composição química, pois após a fermentação do alimento ingerido, há liberação de compostos secundários que atuam em conjunto ou em parte da população ruminal, alterando também o pH (ARCURI et al., 2011).

2.4 QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS RUMINAIS

Diversas técnicas moleculares podem ser utilizadas para estudos da microbiota ruminal, e todas apresentam suas vantagens e desvantagens. A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é uma técnica que tem sido muito utilizada como ferramenta para se estudar a microbiota ruminal, devido à técnica permitir a multiplicação de segmentos específicos do DNA por meio da utilização de *primer* de PCR. A técnica pode ser obtida por análise tradicional ou em Tempo real. A análise em tempo real permite a comparação de amostras e realiza a mensuração gênica, que na técnica tradicional apenas há a detecção da amplificação do segmento específico no final da reação (KOO; JAYKUS, 2000; MCSWEENEY et al., 2006).

De acordo com Koo; Jaykus (2000), a reação em cadeia pela polimerase (PCR) possui como principais vantagens a rapidez, devido à técnica ser executada em equipamentos “fast-cycling”, probabilidade menor de contaminação laboratorial e a grande sensibilidade e especificidade, que a torna uma ferramenta perfeita para utilização na identificação e quantificação de microrganismos.

2.5 DIGESTIBILIDADE *IN VITRO*

Os sistemas *in vitro*, no início eram utilizados na avaliação de alimentos volumosos, bem como na degradação de forragens. Com o aperfeiçoamento do método, foi permitido avaliar diferentes alimentos, assim como estudar os mecanismos de fermentação microbiana e o modo de ação de fatores anti - nutricionais, aditivos e suplementos alimentares. A avaliação dos parâmetros de digestibilidade de um alimento compõe um fator decisivo para a disponibilidade dos nutrientes aos animais, assim é possível realizar o adequado balanceamento das dietas, suprimindo as demandas de manutenção e produção (DETMANN et al., 2006).

Uma alternativa promissora é a técnica *in vitro* utilizando sacos de filtro . Pois é utilizada uma pequena quantidade de amostra em cada saco de poliéster, e são inoculados dentro de um recipiente de fermentação em incubadoras rotativas, assim é possível analisar um grande numero de amostras em uma única vez, e permite determinar a matéria seca (MS), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) que são realizadas com o resíduo presente nos sacos de filtro (LÓPEZ, 2005). Por meio deste sistema é possível observar os efeitos de mudança no ambiente ruminal sobre a digestibilidade dos alimentos, assim como quando adicionado alguma substancia (LEMOS, 2011).

As técnicas *in vitro* têm como principio manter as amostras de alimentos em contato com o conteúdo ruminal tamponado dentro de um recipiente que seja possível reproduzir as condições do rúmen, tais como a presença de microrganismos, anaerobiose, temperatura de 39° C e pH de 6,9 (MOULD et al., 2005). Devido a simulação das condições naturais da digestão, a técnica permite que os resultados obtidos sejam representativos e confiáveis (Oliveira et al., 1999).

O método mais utilizado ainda é o de Tilley; Terry (1963) com duas etapas, a primeira simula a digestão ruminal durante 48 horas e a segunda por uma digestão ácida com pepsina por mais 48 horas. O resíduo indigestível é constituído de microrganismos e outros materiais insolúveis em pepsina.

Na avaliação da digestibilidade dos alimentos, a técnica *in vitro* proporciona como vantagens sua rapidez, a uniformidade físico-química do local de fermentação, e a manutenção de poucos animais fistulados (ALCALDE et al., 2001)

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, F. O. M. D. S. et al. Propriedades e Características da Quitosana Obtida a Partir do Exoesqueleto de Caranguejo-Uçá Utilizando Radiação de Micro-Ondas. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, v. 23, n. 5, p. 630–635, 2013.

ALCALDE, C. R.; MACHADO, R. M.; SANTOS, G. T.; PICOLLI, R.; JOBIM, C. C. Digestibilidade *in vitro* de alimentos com inóculos de líquido de rúmen ou de fezes de bovinos. **Acta Scientiarum**. v. 23, n. 4, p. 917-921, 2001.

AMORATI, R., PEDULLI, G. F., VALGIMIGLI, L., ATTANASI, O. A., FILIPPONE, P., FIORUCCI, C. & SALADINO, R. Absolute rate constants for the reaction of peroxy radicals with cardanol derivatives. **Journal of the Chemical Society**, Perkin Transactions 2, n.11, p.2142-2146. 2001.

ANTONINO, N. D. A. Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira paraibana. p. 89, 2007.

ARCURI, P.B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. Microbiologia do rúmen. IN: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. Nutrição de Ruminantes. Jaboticabal: Funep, 133-138 p. 2011.

ATTRAPADUNG, S.; YOSHIDA, J.; KIMURA, K.; MIZUNUMA, M.; MIYAKAWA, T.; THANOMSUB, B. W. Identification of ricinoleic acid as a inhibitor of Ca²⁺ signal mediated cell-cycle regulation in budding yeast. **Federation of European Microbiological Societies Yeast Research**, v.10, s/ n., p. 38-43, 2010.

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2.3, p. 27–34, 2007.

BÉGIN, A.; VAN CALSTEREN, M. R. Antimicrobial films produced from chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, n. 1, p. 63–67, 1999.

BEZERRA, P. S. et al. Intoxicação experimental por monensina em equinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 102–108, 2000.

BELANCHE, A. et al. 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, 2016.

BELANCHE, A.; RAMOS-MORALES, E.; NEWBOLD, C. J. In vitro screening of natural feed additives from crustaceans, diatoms, seaweeds and plant extracts to manipulate rumen fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 9, p. 3069–3078, 2015.

BORGES, G.D.S; MACEDO, V.P.; MAEDA, E.M., SILVEIRA, A.L.F.; CASTRO, J.M. Digestibilidade de dietas contendo níveis de glicerina bruta em substituição ao milho fornecidas a caprinos de corte. **Synergismus scyentifica UTFPR**, v.8, n.2, 2013.

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

CALDWELL D. R.; KEENEY, M.; VAN SOEST, P. J. Effects of carbon dioxide on growth and maltose fermentation by *Bacteroides amylophilus*. **Journal of Bacteriology**, v. 98, p. 668, 1969.

CHOI, B. K.; KIM, K. Y.; YOO, Y. J.; OH, S. J.; CHOI, J. H.; KIM, C. Y. In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against

Actinobacillus actinomycetemcomitans and *Streptococcus mutans*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 18, 553-557, 2001.

COALHO, M. R.; NOGUEIRA FILHO, J. C. M.; CUNHA, J. A.; LIMA, C. G. De. Estudo dos protozoários ciliados em bovinos consumindo dietas com diferentes níveis de proteína não degradável no rúmen. **Acta Scientiarum**. Animal Sciences, Maringá, v. 25, n. 1, p. 193- 199, 2003.

CONEGLIAN, S. M. Uso de Óleos Essenciais de Mamona e Caju em dietas de Bovinos. 2009. 100f. **Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Estadual de Maringá**, Maringá. 2009.

CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de a nacardiaceae. *Química Nova*, v.29, p.1287-1300, 2006.

COSTA, A. C. S. Nanopartículas de quitosana para aplicação em sanidade de tabaquis amazônicos (*colossoma macropomum*). 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - **Universidade Federal do Pará /Instituto de Ciências da Saúde. BELÉM – PARÁ**, 2013.

COSTERTON, J. W.; CHENG, K. J. Autochthonous populations: colonization of tissue surfaces by autochthonous bacteria. In: SCHILESSINGER, D. (Ed.). *Microbiology*. Washington: A.S.M. P. 266- 273. 1982.

COSTERTON, J. W. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, 35: 299, 1981.

CZERKAWSKI, J.W. Degradation of solid feeds in the rumen: spatial distribution of microbial activity and its consequences. In: MILLIGAN, L.P.; GROVUM, W.L.; DOBSON, A. (Eds.). *Control of digestion and metabolism in ruminants*. Englewood Cliffs: Reston, p. 158 – 172. 1986.

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, n. January, p. 73–80, 2017.

DIAZ, T.G.; TEODORO, A.L.; OSMARI, M.P.; SALAB, B.L; MATOS, L.F.; GIOTTO, F.M. Líquido da casca da castanha de caju em dietas para ruminantes. *Campo Digital: Revista de Ciências Exatas e da Terra e Ciências Agrárias*, v. 10, n. 1, p. 1-10, Ago, 2015.

DEHORITY, B. A.; TIRABASSO, P. A.; GRIFO, A. P. Most-probable-number procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium. *Applied Environment Microbiology*, Washington, v. 55, n. 11, p. 2789–2792, 1989.

DEHORITY, B. A. Microbial interactions in the rumen. *Revista de La Facultad de Agronomía Luz*, v. 15, p. 69-86. 1998.

DEHORITY, B.A. Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa. Florida: **CRC Press Inc**. 96p. 1993.

DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; PINA, D. S.; CAMPOS, J. M. S; PAULINO, M. F.; OLIVEIRA, A. S.; SILVA, P. A. Estimação da digestibilidade do extrato etéreo em ruminantes a partir dos teores dietéticos: desenvolvimento de um modelo para condições brasileira. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 1469-1478, 2006.

DUFFIELD, T. F.; RABIEE, A. R.; LEAN, I. J. A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. part 1. Metabolic effects. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 4, p. 1334-1346, 2008.

EMBRAPA, **Uso de Aditivos na Dieta de Bovinos de Corte**. Documentos 106, out., 2001.

FERELI, F. et al. Monensina sódica e *Saccharomyces cerevisiae* em dietas para bovinos: fermentação ruminal, digestibilidade dos nutrientes e eficiência de síntese microbiana. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 1, p. 183–190, 2010.

GANDRA, J. R.; NUNES GIL, P. C.; GANDRA, E. R. S.; VALE, T. A. DEL; BARLETTA, R. V.; ZANFERARI, F.; FERREIRA DE JESUS, E.; TAKIYA, C. S.; MINGOTI, R. D.; ALMEIDA, G. F.; PAIVA, P. G.; GOBESSO, A. A. O. Productive performance of simmental dairy cows supplemented with ricinoleic acid from castor oil. **Archivos de Zootecnia**, v. 63, n. 244, p.1-10, 2014.

GOIRI, I.; GARCIA-RODRIGUEZ, A.; OREGUI, L. M. Effect of chitosans on in vitro rumen digestion and fermentation of maize silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 148, n. 2–4, p. 276–287, 2009a.

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.

HESS, B.W.; MOSS, G.E.; HULE, D.C. A decade of developments in the area of fat supplementation research with beef cattle and sheep. **Journal of Animal Science**, v.86, p.188-204, 2008.

HIMEJIMA, M.; KUBO I. Antibacterial Agents from the Cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) Nut Shell Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.39, p.418-421, 1991.

HUANG, R. L. et al. Effect of dietary oligochitosan supplementation on ileal digestibility of nutrients and performance in broilers. **Poultry science**, v. 84, n. 9, p. 1383–1388, 2005.

HUNGATE, R. E. A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. In: *Methods in Microbiology*, Norris, J.R. and D.W. Ribbons (Ed). New York Academic Press, p. 117 - 132. 1969.

ILLUM. L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical Research*, 15, 1326-1331, 1998.

KOO, K.; JAYKUS, L. A. Selective amplification of bacterial RNA: use of a DNA primer containing mismatched bases near its 3' terminus to reduce false-positive signals. **Letter Applied Microbiology**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 187 - 192, 2000.

KOZLOSKI, G. V. *Bioquímica dos ruminantes*. 2.ed. – Santa Maria: Ed. da UFSM, 216p., 2009.

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

KUBO, I., NIHEI, K., TSUJIMOTO, K. Antibacterial action of anacardic acids against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.51, p.7624-7628, 2003.

- KURITA, K.; KOYAMA, Y.; TANIGUCHI, A. Studies on chitin. IX. Crosslinking of water - soluble chitin and evaluation of the products as adsorbents for cupric ion. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 31, n. 5, p. 1169–1176, 1986.
- LANA, R. P. **Nutrição e alimentação animal**. 1. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 343p. 2005.
- LANA, R. P., *Nutrição e alimentação animal: mitos e realidades*. 2a ed. Viçosa: UFV, v. 1. 2007.
- LI, Q. et al. Applications and Properties of Chitosan. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 7, n. 4, p. 370–397, 1992.
- LEMOS, B. J. M. Avaliação da digestibilidade *in vitro* de alimentos para ruminantes. In: Seminários aplicados do Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. (Mestrado) Goiânia. 2011.
- LÓPEZ, S. *In vitro* and *in situ* techniques for estimating digestibility. In: DIJKSTRA, J.; FORBES, J. M.; FRANCE, J. (Ed.). **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. 2 ed. Cambridge: CABI Publishing, p. 87-121. 2005.
- MAIA, F.J.; BRANCO, A.F.; MOURO, G. F.; CONEGLIAN, S.M.; SANTOS, G.T.dos.; MINELLA, T.F.; MACEDO, F. A.F. Inclusão de fontes de óleo na dieta de cabras em lactação: Digestibilidades dos nutrientes e parâmetros ruminais e sanguíneos. **Revista Brasileira da Zootecnia**, v.35 n.4, Viçosa, p. 1496-1503, Jul/Ago. 2006.
- MATHUR, N. K.; NARANG, C. K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemical Education**, v. 67, n. 11, p. 938, 1990.
- MATSUI, M. Correlações Entre Estrutura Química, Super-estrutura Macromolecular e Morfológica das Blendas e Redes poliméricas à Base de Quitina e Poliuretano. p. 136, 2007.
- MAZZETTO, S.E., LOMONACO, D., MELE, G. Óleo da castanha de caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. **Química Nova**. p.32, v.732-741, 2009.
- MCSWEENEY, C.S. et al. Application of recent DNA/RNA-based techniques in rumen ecology. AAAP Conference, Korea. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v.20, p.283-294, 2006.
- McSWEENEY, C. S.; MACKIE, R. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. Micro-organisms and ruminant digestion: State of knowledge, trends and future prospects. **Background Study Paper (FAO)**, n. 61, p. 1-62, 2012.
- MEDEIROS, E.; QUEIROGA, R.; OLIVEIRA, M.; MEDEIROS, A.; SABEDOT, M.; BOMFIM, M.; MADRUGA, M. Fatty acid profile of cheese from dairy goats fed a diet enriched with castor, sesame and faveleira vegetable oils. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 992-1003, 2014.
- MINGOTI, R. D. et al. Dose response of chitosan on nutrient digestibility, blood metabolites and lactation performance in holstein dairy cows. **Livestock Science**, v. 187, p. 35–39, 2016.
- MIURA, H.; Horiguchi, M.; MATSUMOTO, T. Nutritional interdependence among rumen bacteria, *Bacteroides amylophilus*, *Megasphaera elsdenii* and *Ruminococcus albus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 40, p. 294-300, 1980.

- MORAIS, J. A. da S.; BERCHIELLI, T. T.; REIS, R. A. Aditivos. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. de. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed., Jaboticabal: Funep, p. 565-600. 2011.
- MOULD, F. L., KLIEM, K. E., MORGAN, R., MAURICIO, R. M. *In vitro* microbial inoculum: a review of its function and properties. **Animal Feed Science and Technology**. 123-124: 31-50, 2005.
- MURAKAMI, A. E.; EYNG, C.; TORRENT, J. Effects of functional oils on Coccidiosis and apparent metabolizable energy in broiler chickens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 27, n.7, p. 981-989, 2014.
- MUROI, H., KUBO, I. Bactericidal activity of anacardic acids against *Streptococcus mutans* and their potentiation. **Journal Agricultural and Food Chemistry**.v.41, p.1780-1783, 1993.
- NAGARAJA, T. G; NEWBOLD, C. J; VAN NEVEL, C. J. Manipulation of ruminal fermentation, In: Hobson , P.N.; Stewart, C.S. (Eds). The rumen microbial ecosystem. *Blackie Academy & professional*, London.P. 523, 1997.
- NICODEMO, M. L. F. M. L. . **Uso de aditivos na dieta de Bovinos de Corte**. Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1517- 3747; 106). 2001.
- NICOLIELO, J. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de ésteres orgânicos derivados do óleo de mamona**. 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Universidade de São Paulo, São Carlos. 2008.
- NITSCHKE, J.; ALTENBACH H.J.; MALOLEPSZY, T.; MÖLLEKEN, H.A new method for the quantification of chitin and chitosanin edible mushrooms. **Carbohydrate research**,v. 346, n. 11, p. 1307-1310, 2011.
- NO, H.K.; PARK, N.Y.; LEE, S.H.; MEYERS, S.P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights, *Int. J. Food Microbiol.* p. 65–72. 2002.
- OGIMOTO, K.; IMAI, S. **Atlas of rumen microbiology**. Tokyo: Japan ScientificvSocieties, 231p. 1981.
- OLEYEDE, G. K. Antioxidant activities of methyl ricinoleate and ricinoleic acid dominated *Ricinus communis* seeds extract using lipid peroxidation and free radical scavenging methods. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 6, n. 7, p. 511-520, 2012.
- OLIVEIRA, M. D. S.; SAMPAIO, A. A. M.; VIEIRA, P. F. FREITAS, J. C. M.; SHOCKEN-ITURRINO, R. P. Efeito de métodos de coleta de fluido ruminal em bovinos sobre alguns parâmetros ruminais e microbiológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 34, n. 5, p. 867-871, 1999.
- OLIVEIRA, M.V.M.; LANA, R.P.; JHAM. G.N.; PEREIRA, J.C.; PÉREZ, J.R.O.; VALADARES FILHO, S.C. Influência da Monensina no Consumo e na Fermentação Ruminal em Bovinos Recebendo Dietas com Teores Baixo e Alto de Proteína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.5, p.1763-1774, 2005.
- OLIVEIRA, J. L. Fotodegradação de corantes têxteis e aplicação da quitosana como tratamento terciário destes efluentes. p. 70, 2006.
- PAIVA, P. G. Estratégias de alimentação para vacas leiteiras: uso de glicerina como fonte energética e quitosana como modulador de fermentação ruminal. 2015. Tese

(Doutorado em Zootecnia) - Universidade estadual paulista/ UNESP campus de Jaboticabal, 2015.

PASCOAL, L.L. Uso de ionóforos e minerais no confinamento e em pastagem cultivada. In: RESTLE, J. **Eficiência na produção de Bovinos de Corte**. (Ed.). Santa Maria: Imprensa Universitária - UFSM, 94 p. 2000.

RINAUDO, M.; MILAS, M.; DESBRIÈRES, J. **Characterization and solution properties of chitosan and chitosan derivatives**. In: Biopolymers Utilizing Nature's Advanced Materials. Symposium at the Fifth Chemical Congress of North America, Cancun: American Chemical Society. Nov, 1997.

ROBERTS, G. **Chitin Chemistry**. London, The Macmillan Press LTD. 349 p. 1992.

RUSSELL, J.B.; STROBEL, H.J. The effect of ionophores on rumen fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. -6, 1989.

RUSSEL, J. B. Low-affinity, high-capacity system of glucose transport in the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*: evidence for a mechanism of facilitated diffusion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3304, 1990.

SALMAN, A. K.; PAZIANI, S. F.; SOARES, J. P. G. Utilização de ionóforos para bovinos de corte. Porto Velho: **Embrapa Rondônia**. Documento 101, 24p. Julho, 2006.

SINGLA, A. K.; CHAWLA, M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects – an update. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 53, 1047-1067, 2001.

ŞENEL, S.; MCCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 10, p. 1467–1480, 2004.

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

TAKANO, E. H.; BUSO, C.; GONÇALVES, E. A. L.; CHIERICE, G. O.; CATANZARO-GUIMARÃES, S. A.; CASTRO-PRADO, M. A. A. de. Inibição do desenvolvimento de fungos fitopatogênicos por detergente derivado de óleo da mamona (*Ricinus communis*). **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1235-1240, 2007.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Journal of British Grassland Society**, v. 18, p. 104-111, 1963.

TORRES, A. A. F. N.; SOUZA, J. M. O.; AMORIM, A. F. V.; LIMA, M. L. M.; ARAÚJO, R. S. Microesferas de quitosana para utilização como Sistemas de liberação controlada de fitoterápicos. In: **IV Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica**. Belém, 2009.

VALADARES FILHO, S. C.; PINA, D. S. **Fermentação Ruminal**. IN: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. Nutrição de Ruminantes. Jaboticabal: Funep, 583p. 2006.

VALERA, M. C.; MAEKAWA, L. E.; OLIVEIRA, L. D. de; JORGE, A. O. C.; SHYGEI, E.; CARVALHO, C. A T. In vitro antimicrobial activity of auxiliary chemical substances and natural extracts on *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* in root canals. **Journal of Applied Oral Science**, v. 21, n. 2, p. 118-123, 2013.

VAN SOEST, P.J. Nutritional ecology of the ruminant. 2.ed. New York: Cornell University Press, 476p. 1994.

VIEIRA, C.; FETZER, S.; SAUER, S. K.; EVANGELISTA, S.; AVERBECK, B.; KRESS, M.; REEH, P. W.; CIRILLO, R.; LIPPI, A.; MAGGI, C. A.; MANZINI, S. Pro-and anti-inflammatory actions of ricinoleic acid: similarities and differences with capsaicin. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 364, n. 2, p. 87–95, 2001.

WELKIE, D.G.; STEVENSON, D.M.; WEIMER, P.J. analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. *Anaerobe*, 2010, 16(2):94–100.

WILLIAMS, A. G.; COLEMAN, G. S. The rumen protozoa. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Eds.). *The Rumen Microbial Ecosystem*. 2. Ed. London: Blackie Academic, 1997. P. 73-139.

YAMAMOTO, S.M.; MACEDO, F.A.F.; ZUNDT, M.; MEXIA, A.A.; SAKAGUTI, E.S.; ROCHA, G.B.L.; REGAÇONI, K.C.T.; MACEDO, R.M.G. Fontes de óleo vegetal na dieta de cordeiros em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.2, p.703-710, 2005.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar os possíveis efeitos da inclusão de quitosana na dieta de novilhos sobre a população microbiana do rúmen como um possível manipulador do conteúdo ruminal e avaliar o efeito da adição de diferentes aditivos: monensina; líquido da casca da castanha de caju (LCCC); quitosana (Q) e ácido ricinoléico (AR) sobre a digestibilidade *in vitro* dos nutrientes em dietas para ruminantes.

4.1 Objetivos específicos

- Avaliar o rendimento e pureza do DNA extraído do conteúdo ruminal de novilhos suplementados a pasto, com a inclusão de quitosana;
- Avaliar as alterações na microbiota ruminal de novilhos suplementados a pasto, com a inclusão de quitosana;
- Avaliar o efeito dos aditivos na digestibilidade *in vitro* da MS, FDN e PB, em dietas com diferentes razões volumoso: concentrado.

CAPITULO 2

MICROBIOTA RUMINAL DE NOVILHOS MANTIDOS A PASTO, SUPLEMENTADOS COM QUITOSANA

Resumo: Objetivou-se avaliar a microbiota do rúmen de bovinos alimentados com inclusão de quitosana na dieta como potencial manipulador do conteúdo ruminal. Foram utilizados cinco (5) novilhos mestiços canulados no rúmen com peso médio de 350 kg mantidos em piquetes individuais de *Urochloa brizantha* cv Marandú e distribuídos em quadrado latino 5x5. Os animais foram suplementados com premix diariamente na proporção de 0,15% peso corporal (PC). A quitosana (85% desatilação) foi fornecida em associação a um suplemento mineral protéico 30% PB (43,5% de milho, 4% de farelo de soja, 8,5% ureia, 44% de mineral). A quitosana foi utilizada nas doses de utilizadas foram de 0; 400; 800; 1200 e 1600 mg / kg de MS. Após o final da extração e purificação do DNA, a concentração do DNA e os grupos de microrganismos foram quantificados em um equipamento de espectrofotometria. A pureza e rendimento do DNA foram avaliados por espectrofotometria a partir de razões de absorbância variando de A260 nm/A230 nm e A260 nm/A280 nm. O rendimento e a pureza do DNA extraído de amostras do rúmen total de bovinos foram considerados adequados, com quantidade e qualidade satisfatória. É possível observar que com a inclusão das doses crescente de quitosana na dieta dos novilhos houve efeito quadrático no grupo das bactérias celulolíticas e nas *archaea*, porém no grupo das bactérias amilolíticas não houve efeito da inclusão da quitosana. A concentração de DNA extraído também apresentou efeito quadrático com a inclusão das doses de quitosana. A inclusão de quitosana na proporção de 741,67 mg/kg MS atua alterando benéficamente a microbiota ruminal.

Palavras-Chave: alteração microbiana, microrganismos ruminais, aditivo

RUMEN MICROBIOTA STEERS KEPT AT PASTURE, SUPPLEMENTED WITH CHITOSAN

Abstract: The objective was to evaluate the addition of chitosan as modular fermentation in supplements for grazing cattle. Five (5) rumen cannulated crossbred steers with average weight of 350 kg were kept in individual paddocks of *Urochloa brizantha* cv Marandú and distributed in 5x5 Latin Square. The animals were supplemented with premix daily at a rate of 0.15% body weight (PC). Chitosan (85% desatilação) was provided in combination with a proteinaceous mineral supplement 30% (43,5% corn, 4% soybean meal, 8.5% urea, 44% mineral) second balanced NRC (2000). The chitosan doses used were 0, 400, 800, 1200 and 1600mg of chitosan per kg DM. DNA extraction followed protocol according to Stevenson and Weimer (2007). The purity and yield of the DNA were evaluated by means of spectrophotometric equipment from A260 nm / A230 nm and A260 nm / A280 nm. The yield and purity of the DNA extracted from samples of the total bovine rumen were considered adequate, with satisfactory quantity and quality. The mean concentration of extracted DNA showed a quadratic effect with the inclusion of chitosan doses. The inclusion of chitosan acts by altering the concentration of ruminal microorganisms.

Key words: microbial change, ruminal microorganisms, additive

1. INTRODUÇÃO

Microbiologistas do rúmen e nutricionistas tendem a manipular o ecossistema microbiano ruminal com o uso de aditivos que interferem na população microbiana alterando-a, objetivando maximizar a eficiência na conversão alimentar para a produção de carne e leite que irão ser consumidos pelos humanos (JACAÚNA, 2016).

Na alimentação animal ainda se utiliza o ionóforo como um aditivo na busca da maximização da produção e menores custos nos produtos necessários para a produção (NAGARAJA, 2016). Mas levando em consideração o “Princípio da Precaução”, em janeiro de 2006 (Regulamento 1831/2003/ CE) foi proibido na União Européia à utilização de antibióticos na alimentação animal como promotor de crescimento por conta da preocupação que houvesse resíduos e estirpes de bactérias resistentes nos produtos finais cárneos. Desta forma é necessário que estes antibióticos sejam substituídos. Alternativas como substâncias naturais atendem as exigências das empresas, e tem como objetivo evitar que sejam desenvolvidas bactérias patogênicas aos humanos (GUSTAFSON; BOWEN, 1997).

A quitosana é um agente antimicrobiano natural, renovável e biodegradável derivado da desacetilação da quitina (Polímero de N-acetilglucosamina); tem um alto peso molecular e é o segundo biopolímero natural mais abundante, comumente encontrado em conchas de crustáceos marinhos e nas paredes celulares de fungos, apresenta baixo custo e grande importância tanto econômica como ambiental (AZEVEDO et al., 2007; DI MARTINO et al., 2005). Suas propriedades antimicrobianas tem tido grande aceitação (MUZZARELLI et al., 1990). A quitosana quando adicionada em dietas de ruminantes atua no rúmen modificando de forma positiva a fermentação *in vitro* e *in vivo* (GOIRI et al., 2009a, GOIRI et al., 2009b; GOIRI et al., 2009c).

Em estudos buscando avaliar os efeitos da quitosana sobre a fermentação ruminal foi possível observar que diversos autores encontraram resultados parecidos com relação ao aumento nas proporções de propionato, que torna a fermentação mais eficiente com menor gasto de energia e produção de metano, e atividade antimicrobiana principalmente contra bactérias gram-positivas (Muzzarelli, 1990; GOIRI et al., 2009a;

GOIRI et al 2009b; GOIRI et al., 2009c; ARAÚJO, 2011; TSAI et al., 2011; BELANCHE et al., 2016; PAIVA et al., 2016)

Neste contexto e pelas escassas informações referentes ao uso de quitosana em bovinos mantidos em pastagem, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos níveis de quitosana sobre a microbiota ruminal.

2. MATERIAL E METODOS

O experimento foi realizado nas dependências do setor de Nutrição de Ruminantes da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados no Estado do Mato Grosso do Sul, e no Laboratório de Biologia molecular e Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal do estado do Mato Grosso, campus Cuiabá.

Foram utilizados cinco (5) novilhos mestiços canulados no rúmen com peso médio de 350 kg mantidos em piquetes individuais e distribuídos em quadrado latino 5 x 5. Os animais foram suplementados diariamente na proporção de 0,15% do peso corporal (PC). O suplemento fornecido apresentava 300 g de Proteína Bruta (PB) kg⁻¹ de MS e era constituído de 435 g kg⁻¹ de milho, 40 g kg⁻¹ de farelo de soja, 85 g kg⁻¹ de uréia e 440g kg⁻¹ de núcleo mineral. A quitosana (produto comercial com 85% desacetilação) foi adquirida da empresa Polymar® e foi adicionada ao suplemento nas quantidades de 0, 400, 800, 1200 e 1600 mg kg⁻¹ de MS. Ao final de cada período experimental os animais foram pesados e os suplementos ajustados de acordo com o peso.

Os piquetes foram formados numa área de 0,3 ha constituídos de *Urochloa brizantha* cv Marandu (syn. *Brachiaria brizantha*), e divididos por cerca elétrica de dois fios, com bebedouro e cocho. O curral para manejo dos animais era localizado próximo aos piquetes, e os animais eram conduzidos através de corredores.

O experimento foi dividido em cinco períodos de 18 dias. Compreendendo os primeiros 14 dias de cada período para a adaptação dos animais ao manejo. No 16º dia do início de cada período experimental, 4 horas após a alimentação dos animais foi realizado manualmente por meio da fistula ruminal a coleta do conteúdo ruminal de cada animal, onde 25 mL de líquido e 25 g de sólido foram armazenados em tubos falcon devidamente identificados e mantidos sob refrigeração a -80°C até serem analisados.

As amostras de conteúdo ruminal foram transportadas para o laboratório de nutrição animal da UFMT Cuiabá, onde a extração do DNA da microbiota ruminal (ver apêndice) foi realizada usando a técnica descrita por Stevenson e Weimer (2007), com pequenas modificações (na falta do homogeneizador *bead beater* foi utilizado o moinho de bola).

Após o final da extração e purificação do DNA, a concentração do DNA de todas as amostras individuais e os grupos de microrganismos (bactérias: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Streptococcus Bovis*, *Selenomonas ruminantium* e *Archaea*) foi quantificada em um equipamento de espectrofotometria.

A pureza do DNA foi avaliada por meio de equipamento de espectrofotometria a partir de absorbâncias variando de A260 nm/A230 nm e A260 nm/A280 nm para indicar alguma possível contaminação do DNA com sais tampão e compostos orgânicos.

O DNA total foi submetido a uma PCR em tempo real para amplificação do gene que codifica para o 16S rRNA para bactérias e 18S rRNA para protozoários com a utilização de *primers* (os pares de iniciadores para análise quantitativa podem ser visualizados na Tabela 2).

Tabela 2 – *Primers* utilizados na identificação dos microrganismos ruminais

Táxon alvo e cepas específicas testadas	Conjunto de <i>Primer</i>	Seqüência de <i>Primer</i>
<i>Fibrobacter succinogene sS85</i>	FibSuc3F FibSuc3R	GCGGGTAGCAAACAGGATTAGA CCCCCGGACACCCAGTAT
<i>Ruminococcus albus</i> 7	RumAlb3F RumAlb3R	TGTTAACAGAGGGAAGCAAAGCA TGCAGCCTACAATCCGAACTAA
<i>Selenomonas ruminantium</i> D	SelRum2F SelRum2R	CAATAAGCATTCCGCCTGGG TTCCTCAATGTCAAGCCCTGG
<i>Streptococcus bovis</i> JB1	Strbov2F Strbov2R	TTCCTAGAGATAGGAAGTTTCTTCGG ATGATGGCAACTAACAATAGGGGT
<i>Methanogen archaea</i>	MB1174f Arch1406-1389r	GAGGAAGGAGTGGACGACGGTA ACGGGCGGTGTGTGCAAG

Adaptado de Stevenson e Weimer (2007).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e regressão polinomial pelo comando PROC MIXED do programa Statistical Analysis System versão 9.2 (SAS,

2009), seguindo o modelo: $Y_{ijl} = \mu + D_i + P_j + A_l + e_{ijl}$; em que μ = média geral, D_i = efeito fixo de dieta, P_j = efeito aleatório de período, A_l = efeito aleatório de animal e e_{ijl} = erro.

Nos dados de leituras de absorvência relativa foram realizados análise descritiva.

3. RESULTADOS

A Tabela 3 apresenta os valores de disponibilidade de forragem de matéria seca verde, consumo e digestibilidade aparente total da MS, pH ruminal e N-NH₃ (mg/dL) do líquido ruminal, eficiência de síntese microbiana e balanço de nitrogênio de novilhos suplementados com diferentes níveis de inclusão de quitosana, principais resultados encontrados pela autora Dias (2016), onde os dados deste trabalho complementam os da autora.

O rendimento e a pureza do DNA extraído de amostras do rúmen total de bovinos foram considerados adequados, com quantidade e qualidade satisfatória (Tabela 4).

Tabela 3 - Disponibilidade de forragem de matéria seca verde, consumo e digestibilidade aparente total da MS, pH ruminal e N-NH₃ (mg/dL) do líquido ruminal, eficiência de síntese Microbiana e Balanço de Nitrogênio de novilhos suplementados com diferentes níveis de inclusão de quitosana

Variáveis	Níveis de inclusão de quitosana (mg/kg MS)				
	0	400	800	1200	1600
TON MS Verde/ha	1,95	2,23	1,85	1,77	2,2
Consumo total (kg/dia)	8,45	10,23	14,05	12,01	10,48
Coefficiente de digestibilidade MS (%)	61,77	66,64	65,64	66,39	67,46
Coefficiente de digestibilidade PB (%)	75,05	80,80	77,36	78,10	78,45
pH	6.50	6.46	6.55	6.53	6.54
N-NH ₃ (mg/dL)	11.67	12.29	12.63	16.21	10.61
Síntese de nitrogênio (g/dia)	60,14	64,79	74,74	63,73	59,29
Proteína bruta microbiana (g/dia)	375,91	404,96	467,16	398,33	370,59
Balanço de nitrogênio (consumo g/dia)	183.26	243.67	267.59	287.80	230.18
Absorvido (balanço g/dia)	50.13	107.84	109.42	127.53	97.23
Retido (balanço g/dia)	3.66	39.06	67.64	67.11	60.42

Adaptado de Dias, 2016.

Tabela 4 – Rendimento e qualidade da extração do DNA de amostras do rúmen de novilhos suplementados com quitosana

TRATAMENTO	[] DNA (ng/ul)	A260/230nm	A260/280nm
0 (mg/kg MS)	401,74	2,0	1,90
400 (mg/kg MS)	415,78	1,93	1,83
800 (mg/kg MS)	232,98	1,99	1,87
1200 (mg/kg MS)	328,70	1,92	1,89
1600 (mg/kg MS)	579,34	1,79	1,87
Padrão	195,456	1,86	1,92

Na Tabela 5 é possível observar que com a inclusão das doses crescente de quitosana na dieta dos novilhos houve efeito quadrático no grupo das bactérias celulolíticas e nas *archaea*, porém no grupo das bactérias amilolíticas não houve efeito da inclusão da quitosana.

Tabela 5 – Grupos de microrganismos presentes no rúmen de novilhos suplementados com quitosana

Variáveis	Níveis de quitosana (mg/kg MS)					EPM	Valor de P	
	0	400	800	1200	1600		Linear	Quad
Bactérias Celulolíticas								
<i>Fibrobacter succinogenes</i> ^a	3.97	3.90	3.88	3.98	4.19	0.06	0.654	0.045
<i>Ruminococcus albus</i> ^b	4.35	4.25	4.16	4.18	4.23	0.04	0.754	0.048
Bactérias Amilolíticas								
<i>Selenomonas ruminantium</i>	5.73	5.58	5.60	5.58	5.58	0.07	0.986	0.722
<i>Streptococcus Bovis</i>	3.27	2.91	3.27	3.11	3.19	0.03	0.659	0.654
<i>Archaea</i> ^c	3.74	3.40	3.58	3.70	3.84	0.08	0.887	0.039

^a $Y = 3,977 - 0,00035X + 3,035 \times 10^{-7}X^2$, $r^2 = 0,47$; ^b $Y = 4,354 - 0,00037X + 1,831 \times 10^{-7}X^2$, $r^2 = 0,36$; ^c $Y = 3,68 - 0,00051X + 4,017 \times 10^{-7}X^2$, $r^2 = 0,42$.

As médias de concentração de DNA extraído apresentaram efeito quadrático ($P = 0.034$) com a inclusão das doses de quitosana como pode ser observado na figura 3.

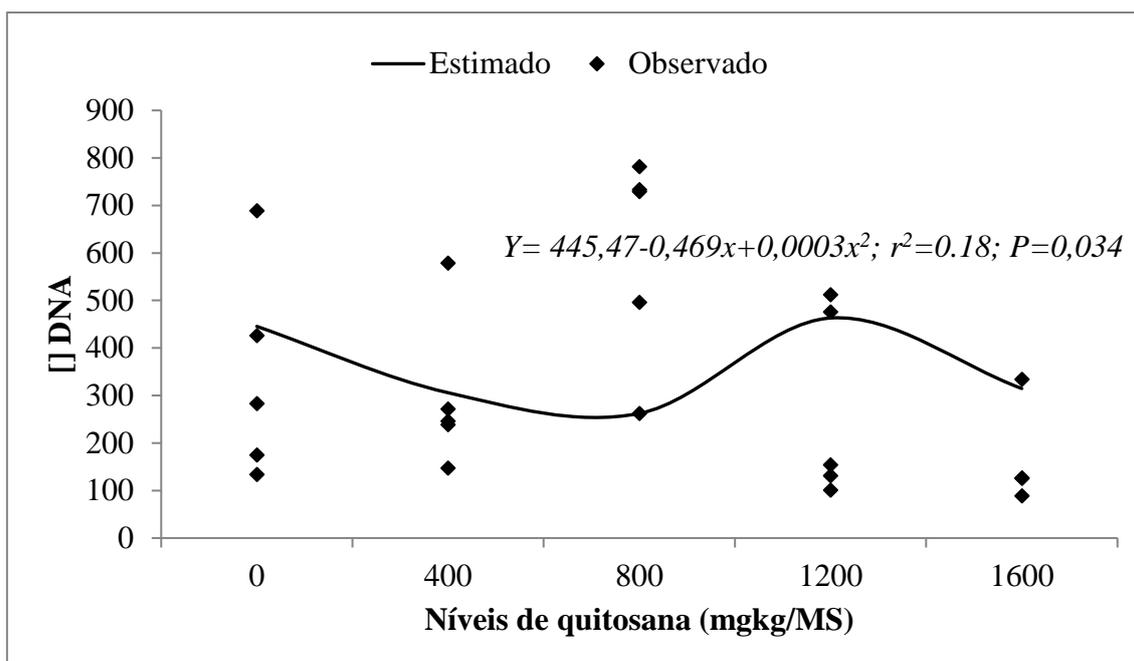


Figura 3 – Valores de concentração de DNA do conteúdo ruminal de novilhos suplementados com quitosana.

4. DISCUSSÃO

A disponibilidade de MS verde foi de 1998,15 kg, estando de acordo com a disponibilidade adequada de forragem de 1.200 kg MS verde /ha para que haja seletividade do animal. Os animais foram submetidos à oferta de folhas e caule suficiente para garantir o pastejo seletivo. O consumo total de matéria seca ($P=0,043$), apresentou comportamento quadrático com nível ótimo de quitosana de 895 mg/kg de MS. O aumento no consumo total de matéria seca proporcionou melhora no coeficiente de digestibilidade da mesma. Com a inclusão de quitosana na suplementação não houve aumento da digestibilidade da MS, pois a quitosana age de forma semelhante à monensina, aumentando a digestibilidade do FDN, razão que pode intervir diretamente na digestibilidade da MS (NRC, 1996). A digestibilidade da proteína bruta apresentou aumento à medida que se aumentou a concentração de quitosana.

Não houve efeito da inclusão de quitosana sobre o pH ruminal dos animais ($P>0,05$), obtendo média entre os tratamentos de 6,5, valores estes superiores ao limite mínimo de 6,2 proposto por Russell; Wilson (1996), para que ocorra a máxima atividade dos microrganismos. Houve efeito quadrático ($P=0,005$) para as concentrações de $N-NH_3$ ruminal, onde o nível de inclusão ótimo foi de 875 mg/kg MS. As concentrações de amônia ruminal podem estar relacionadas à degradação da proteína e a

síntese de proteína microbiana (MAKKAR et al., 1998). No ambiente ruminal com pH próximo a neutralidade os grupos $-NH_2^+$ da quitosana podem interagir eletrostaticamente com a carga negativa do grupo carboxila do AA, protegendo contra a degradação ruminal (CHIANG et al., 2009), o que confirma as afirmações de Fadel El Seed, et al.,(2003), de que a quitosana é uma fonte de proteína indegradável no rúmen.

O aumento do nitrogênio amoniacal ruminal proporcionou aumento na síntese de nitrogênio e de proteína bruta microbiana, onde o nível ótimo foi de 850 mg/kg MS sem alterar o Balanço de nitrogênio dos animais. A quitosana aumenta a concentração de amônia duas (2) horas após a alimentação, onde ocorre a sua degradação inicialmente pela deaminação da quitosana pelas bactérias ruminais (BEIER; BERTILSSON, 2013), a degradação do grupo amina ($R-NH_2$), em amônia (NH_3), pode explicar as maiores concentrações de amônia nas dietas com quitosana. Não houve efeito da adição de quitosana para o balanço de nitrogênio, onde todos os tratamentos apresentaram balanço positivo com retenção de Nitrogênio. Mesmo não apresentando significância, os dados sugerem que os animais suplementados com quitosana apresentaram melhor utilização do nitrogênio que os animais que recebiam apenas o suplemento (110,51 x 50,13 g/dia).

Amostras oriundas de conteúdo ruminal apresentam muitas substâncias como taninos, e estas podem atrapalhar a PCR (MCSWEENEY et al.,2001). A qualidade do DNA extraído pode ser obtida através da pureza do DNA, que é referenciada através da análise de leitura de absorvância relativa ($A_{260} / 230$ nm para carboidratos, compostos aromáticos, ácidos húmicos, fenólicos, $A_{260} / 280$ nm para proteína), que deve exibir valores de 2,0 a 2,2 para $A_{260} / 230$ nm e 1,8 para $A_{260} / 280$ nm para a maioria das aplicações de biologia molecular.

Segundo Henderson et al. (2013), protocolos de extração de DNA baseados em clorofórmio com fenol, e uma etapa de lise mecânica extraem DNA com maior quantidade e qualidade, não exigindo purificação adicional, o que está de acordo com os valores encontrados neste trabalho.

Autores como Goiri et al., (2009a); Choi et al (2001); No et al (2002) afirmam que a quitosana apresenta atividade antimicrobiana. Os resultados desde trabalho confirmam com os autores, pois foi observado alteração na população microbiana com a inclusão de doses crescentes de quitosana na dieta, apresentando nível ótimo de 741,67 mg/kg MS.

Na tabela 5 pode ser observado que a inclusão da quitosana causou efeito quadrático no grupo das bactérias celulolíticas, com ponto mínimo de 576,60 mg/kg MS

para a *Fibrobacter succinogenes* e 1010,40 mg/kg MS para *Ruminococcus albus*, pois estas utilizam a amônia como fonte de nitrogênio para que ocorra a síntese de proteínas, que consequentemente causou também efeito quadrático no grupo das *archaea*, apresentando ponto mínimo de 634, 80 mg/kg MS, devido à utilização dos hidrogênios quando alterada a relação acetato : propionato (DEHORITY, 2004).

Belanche et al., (2016), em seu estudo com a utilização de quitosana observou mudança nas concentrações de DNA bacteriano e metanogênico. Dados parecidos com os encontrados neste trabalho, afirmando a ação antimicrobiana da quitosana, que age alterando a permeabilidade celular devido às interações entre a quitosana e as cargas eletronegativas sobre as superfícies microbianas.

Gandra et al., (2016), em estudo com adição de quitosana observou redução no fluxo microbiano, que segundo os autores está associada com sua atividade antimicrobiana, atuando principalmente sobre bactérias gram positivas, sendo estes efeitos reduzidos quando em pH ácidos (SENEL & MCCLURE, 2004).

5. CONCLUSÃO

A inclusão de quitosana na proporção de 741,67 mg/kg MS atua alterando benéficamente a microbiota ruminal.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ARAUJO, A. P. C. Efeito de diferentes concentrações de quitosana na dieta de novilhos Nelore. 2011. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. Faculdade de medicina veterinária e zootecnia. Pirassununga. 2011.

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2.3, p. 27–34, 2007.

BEIER, S, BERTILSSON, S. Bacterial chitin degradation-mechanisms and ecophysiological strategies. **Frontiers In Microbiology**, v.4 (article149), p.1–12, 2013.

BELANCHE, A. et al. 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, 2016.

CHIANG, Y. W., T. H. WANG, W. C. LEE. Chitosan coating for the protection of amino acids that were entrapped within hydrogenated fat. **Food Hydrocolloids**. v.23, n.06, p.1057 - 1061, 2009.

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

DIAS, A. O. C. Quitosana em suplemento para bovinos em pastejo. 2016. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados – MS. 2016.

DI MARTINO A, SITTINGER M, RISBUD MV. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*. 26: 5983–5990. 2005.

FADEL EL-SEED, A. N. M. A., KAMEL, H. E. M., SEKINE, J., HISHINUMA, M. AND HAMANA, K. Chitin and chitosan as possible novel nitrogen sources for ruminants. **Canadian Journal Animal Science**, v.83, n.01, p. 161–163, 2003.

GANDRA, E.R.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**. 45(3): 130-137.2016.

GOIRI I, GARCIA-RODRIGUEZ A, OREGUI LM. Effect of chitosans on in vitro rumen digestion and fermentation of maize silage. **Anim Feed Sci Technol**. 2009a; 148: 276–287.

GOIRI I, GARCIA-RODRIGUEZ A, OREGUI LM. Effect of chitosan on mixed ruminal microorganisms fermentation using the Rumen Simulation Technique (Rusitec). **Anim Feed Sci Technol**. 2009b; 152: 92–102.

GOIRI I, OREGUI LM, GARCIA-RODRIGUEZ A. Dose-response effects of chitosans on in vitro rumen digestion and fermentation of mixtures differing in forage-to-concentrate ratios. **Anim Feed Sci Technol**. 2009c; 151: 215–227.

GUSTAFSON, R.; BOWEN, R. Antibiotic Use in Animal Agriculture. **Applied Microbiology**, v. 83, n. 5, p. 531–541, 1997.

HENDERSON, G. et al. Effect of DNA Extraction Methods and Sampling Techniques on the Apparent Structure of Cow and Sheep Rumen Microbial Communities. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e74787, 2013.

- JACAÚNA, A.G. avaliação *in vitro* da quitosana como aditivo em dietas para ruminantes. 2016. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2016.
- MAKKAR, H. P. S.; S. SEM; M. BLUMMEL; K. BECKER. Effects of fractions containing saponins from *Yucca schidigera*, *Quillaja saponaria*, and *Acacia auriculoformis* on rumen fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.46, p.4324–4328. 1998.
- MUZZARELLI R, TARSIS R, FILIPPINI O, GIOVANETTI E, BIAGINI G, VARALDO PE. Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. *Antimicrob Agents Ch*. 1990; 34: 2019–2023.
- NAGARAJA, T. G. Microbiology of the Rumen. IN: MILLEN, D. D.; ARRIGONI, M. B.; PACHECO, R. L. *Rumenology*. **Springer International**. 2016.
- NO, H.K.; PARK, N.Y.; LEE, S.H.; MEYERS, S.P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights, *Int. J. Food Microbiol*. 74 (2002) 65–72.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7.ed. Washington, D.C.: National Academy of Science, 242p. 1996.
- 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**. 2016.
- RUSSEL, J.B., WILSON, D.B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? **Journal of Dairy Science**, v.79, p. 1503-1509, 1996.
- STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J. Dominance of Prevotella and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.75, p.165–174, 2007.
- TSAI, T.; CHIEN, H.F.; WANG, T.H.; HUANG, C. T.; KER, Y. B.; CHEN, C. T. Chitosan Augments Photodynamic Inactivation of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, may 2011, p. 1883–1890.
- WENCELOVÁ, M.; VARADYOVA, Z.; MIHALIKOVA, K.; KISIDAYOVA, S.; JALC, D. Evaluating the effects of chitosan, plant oils, and different diets on rumen metabolism and protozoan population in sheep. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**. (2014) 38: 26-33.

CAPITULO 3

DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DE DIFERENTES DIETAS PARA RUMINANTES

Resumo: Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes aditivos (monensina (MON); líquido da casca da castanha de caju (LCCC); quitosana em pó (Q) e ácido ricinoléico (AR)) sobre a digestibilidade *in vitro* dos nutrientes em dietas com diferentes razões volumoso: concentrado para ruminantes. Como doadores do líquido ruminal foram utilizados dois bovinos da raça Jersey, adultos, castrados, peso médio de 350 kg, providos de cânula ruminal, e mantidos em pasto de *Urochloa brizantha cv Marandu*, recebendo suplementação mineral. Para realização do ensaio foi utilizado três razões volumoso: concentrado (100:00, 50:50 e 20:80) e quatro tipos de aditivos sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO), matéria seca (DIVMS), fibra em detergente neutro (DIVFDN) e proteína (DIVPB). No ensaio foi verificado o efeito dos fatores principais e da interação entre os aditivos e as razões V: C na DIVMS, DIVPB, DIVMO e DIVFDN. A inclusão de MON, LCC, Q e AR aumentaram o coeficiente de digestibilidade da MS, devido os aditivos causarem alterações nos padrões de fermentação ruminal. Mas os aditivos MON e Q não diferiram do grupo controle. Na DIVMO e DIVPB a inclusão dos aditivos não causou efeito. Na DIVFDN a Q e o LCC reduziram a digestibilidade. Foi verificado efeito significativo ($P < 0,001$) apenas para as razões volumoso: concentrado sobre a DIVMS, DIVPB e DIVMO, para a DIVFDN ($P = 0,09$). Os aditivos MON, LCC, Q e AR quando adicionados na dieta de ruminantes agem como moduladores da fermentação ruminal, resultando em efeitos positivos na digestibilidade dos nutrientes, possibilitando substituir os antibióticos ionóforos.

Palavras-Chave: modulação ruminal, aditivos naturais, eficiência.

IN VITRO DIGESTIBILITY OF DIFFERENT DIETS FOR RUMINANTS

Abstract: The objective of this study was to evaluate the effect of different additives (monensin (MON), liquid cashew nuts (LCCC), chitosan powder (Q) and ricinoléic acid (AR)) on the in vitro digestibility of nutrients in diets with different voluminous proportions: concentrate for ruminants. As donors of the ruminal fluid, two adults, castrated Jersey cattle with an average weight of 350 kg were used, with a ruminal cannula, and kept in *Urochloa brizantha* cv Marandu pasture, receiving mineral supplementation. In order to perform the assay, three voluminous and concentrated ratios (100: 00, 50:50 and 20:80) and four types of additives were used in the in vitro digestibility of organic matter (IVDMD), dry matter (IVDMD), detergent fiber neutral (DIVFDN) and protein (VPB). In the assay, the effect of the main factors and of the interaction between the additives and the V: C relationships in the IVDMD, DIVPB, DIVMO, and DIVFDN were verified. The results demonstrate that the inclusion of the additives increased the digestibility of DM because the additives cause alterations in ruminal fermentation patterns. But the additives MON and Q did not differ from the control group. In DEMO and DIVPB the inclusion of the additives had no effect. In the DIVFDN the Q and the LCC reduced the digestibility. A significant effect ($P < 0.001$) was observed only for the voluminous: concentrate relationships on IVDMD, VPB, and IVDMD for DIVFDN ($P = 0.09$). Additives when added to the ruminant diet act as modulators of ruminal fermentation, resulting in positive effects on nutrient digestibility, allowing the replacement of ionophores antibiotics.

Key words: ruminal modulation, natural additives, efficiency.

1. INTRODUÇÃO

Os ruminantes respondem de formas diferentes às dietas ou alimentos e estabelecem o comportamento alimentar conforme suas necessidades nutricionais, especialmente de energia. Os principais fatores que comprometem o desempenho animal é a ingestão de matéria seca e a digestibilidade dos nutrientes (JACAÚNA, 2016). Em confinamento, é muito importante conhecer o comportamento alimentar dos bovinos e a razão de utilização de volumosos e concentrados nas dietas, pois estes podem comprometer diretamente tanto no consumo como na produção dos animais (ARRIGONI et al., 2013)

Dentro da produção animal o desenvolvimento tecnológico tem ganhado cada vez mais espaço, isto desde as instalações a manejos racionais que promovem e reduzem a mão de obra, mas a alimentação ainda é o fator econômico primordial quanto ao custo final da produção. Assim, é necessário estudar estratégias que possam fornecer alimentos com maior digestibilidade e disponibilidade de nutrientes aos animais, reduzindo custos e aumentando o lucro (JACAUNA, 2016).

Uma maneira de aumentar a produção é com a utilização de aditivos na alimentação animal. Pois melhorar o desempenho animal por meio da dieta é o objetivo de se buscar a manipulação do processo de fermentação ruminal, sendo este o foco de diversas pesquisas em diferentes espécies. Os ionóforos tem se destacado dentre os já existentes para utilização na nutrição animal, são substâncias que interagem passivamente com íons, formando complexos lipossolúveis que agem no transporte iônico pelas membranas biológicas devido a alterações na homeostase intracelular ocasionando distúrbios celulares funcionais e morfológicos (BEZERRA JR. et al., 2000; NICODEMO, 2001).

Na nutrição animal os óleos funcionais têm sido foco de estudos, devido apresentar propriedades antimicrobianas e capacidade de modificação ruminal, podendo inibir a desaminação dos aminoácidos e conseqüentemente diminuir a concentração amoniacal no rúmen (MCINTOSH, 2003; VIEIRA, 2014).

Os óleos funcionais agem em diferentes funções orgânicas, mas seu mecanismo de ação ainda não é totalmente elucidado. Segundo Burt (2004) apresenta função antimicrobiana, antifúngicas (RASOOLI; ABYANEH, 2004), atividade antioxidante e de proteção celular, especialmente nos glóbulos vermelhos e glóbulos brancos (ASGARY, 2003).

Sendo assim este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de diferentes aditivos: monensina como controle positivo; líquido da casca da castanha de caju (LCCC); quitosana em pó (Q) e ácido ricinoléico (AR) sobre a digestibilidade *in vitro* dos nutrientes em dietas com diferentes razões volumoso: concentrado para ruminantes.

2. MATERIAL E METODOS

O trabalho foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de avaliação de Co-produtos de oleaginosas e de Nutrição Animal da Faculdade de Ciências Agrárias, da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados – Mato Grosso do Sul,. Durante o período de agosto de 2017.

O laboratório estava equipado com incubadores *in vitro* TE – 150 (Tecnal®), banho-maria, potenciômetro pH (Instrutherm, pH-1500, São Paulo), balança analítica, CO₂ e garrafas térmicas.

Os doadores de líquido ruminal foram dois bovinos da raça Jersey, adultos, castrados, peso médio de 350 kg, providos de cânula ruminal, e mantidos em pasto de *Urochloa brizantha* (syn *Brachiaria*) recebendo suplementação mineral. Os aditivos utilizados foram a quitosana (>85% de desacetilação), líquido da casca da castanha de caju (LCCC), ácido ricinoléico e monensina, como volumoso foi utilizado o feno de Tifton 85 (*Cynodon spp*), e o concentrado utilizado era composto por milho (60%), farelo de soja (35%) e mistura mineral (5%), e a composição bromatológica da dieta pode ser observada na Tabela 5.

Para realização do ensaio foi utilizado três razões volumoso: concentrado (100:00, 50:50 e 20:80) e quatro tipos de aditivos: monensina (controle positivo); líquido da casca da castanha de caju (LCCC); quitosana em pó (solúvel) (Q) e ácido ricinoléico (AR).

Tabela 6 - Teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), matéria orgânica (MO) e fibra em detergente neutro (FDN) das dietas

Razão V: C ⁽¹⁾	MS%	PB	MO	FDN
			MS%	
100:0	92,46	9,72	93,44	76,17
20:80	95,27	21,05	93,46	26,29
50:50	95,80	16,80	93,45	44,99

⁽¹⁾ Quantidade de volumoso e concentrado em 100%.

Foi utilizado um delineamento em blocos ao acaso em um ensaio de parcelas subdivididas, em que as incubadoras representavam os blocos, os jarros as parcelas e as três razões volumoso: concentrado (100:0, 50:50, 20:80) representaram as subparcelas. Cada jarro continha um aditivo nas doses de 100 mg/Kg de MS de monensina, 900 mg/Kg de MS de quitosana, 600 mg/Kg de MS de LCC e 750 mg/Kg de MS de ácido ricinoléico e todas as razões volumoso: concentrado em 6 repetições de cada, e 2 saquinhos brancos totalizando 20 amostras por jarro.

Foram realizadas análises para determinação de matéria seca (método 930.15; AOAC, 2000); a proteína bruta foi obtida multiplicando o fator de conversão fixo 6,25 pelo total de N, que foi determinado usando a técnica Kjeldahl de destilação (método 954.01; AOAC, 2000), as cinzas foram obtidas pela incineração das amostras a 600°C em mufla (942.05; AOAC, 2000) e a matéria orgânica foi calculada pela diferença: 100 – cinzas; e a fibra em detergente neutro (VAN SOEST, 1963; 1991).

A digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) foi determinada de acordo com metodologia descrita por Tilley; Terry (1963) modificada por Holden et al. (1999), utilizando o rúmen artificial (incubador *in vitro* TE – 150 - Tecnal®). Utilizou-se o método dos saquinhos filtrantes, que é uma técnica baseada na inoculação de substratos armazenados em saquinhos filtrantes (filter bags) e possibilita avaliar grande quantidade de amostras simultaneamente.

O preparo dos saquinhos filtrantes (TNT-100 g/cm², cortados e selados no tamanho de 5,0 x 5,0 cm), foi realizado conforme descrito por Casali et al (2008) e consistiu em: pré lavagem dos saquinhos filtrantes em acetona por três a cinco minutos para remover um surfactante que inibe a digestão microbiana, secagem completamente dos saquinhos filtrantes; pesagem de cada saquinhos filtrantes e registro do peso; logo após a balança analítica foi zerada e foram pesados 0,5 g de amostra diretamente no saquinhos filtrantes; todos os saquinhos foram selados, identificados e colocados nos frascos de digestão do aparelho incubador *in vitro* TE – 150 (Tecnal®), que comportam até 25 amostras por frasco, todos distribuídos uniformemente em ambos os lados da linha divisória; ainda, foram incluídos dois saquinhos filtrantes selados em branco (sem amostra) para calcular o fator de correção (ANKOM, 2016).

No laboratório haviam duas incubadoras providas de jarros, que foram ligadas previamente para permitir a estabilidade da temperatura dos jarros de digestão (39 –

41°C); para manter a temperatura das soluções tampão e equipamentos a 39°C foi utilizado o banho-maria; as garrafas térmicas foram pré-aquecidas a uma temperatura próxima a 39°C para coleta do líquido ruminal, que foi coletado logo pela manhã via fistula ruminal com inclusão de CO₂ e armazenado nas garrafas térmicas, que foram hermeticamente vedadas até chegada ao laboratório.

A quantidade de solução utilizada nas incubadoras foi calculada a partir da quantidade de amostras colocadas para digestão. Para cada 0,5g de amostra pesadas são requeridos 50 ml de solução, em que foi misturada na relação 1:4 (1 parte de inoculo/ 4 partes de solução tampão). Foi utilizada a solução tampão de Kansas, composta por solução A e B, que são preparadas nas seguintes proporções: Solução A – Dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄, anidro) (10,0 g/L), sulfato de magnésio (Mg SO₄. 7H₂O) (0,5 g/L), cloreto de sódio (NaCl) (0,5 g/L), cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl₂. 2H₂O) (0,1 g/L), Uréia (0,5 g/L); Solução B – carbonato de sódio (Na₂CO₃) (15,0 g/100ml) e sulfeto de sódio (Na₂S. 9H₂O) (1,0 g/100ml). A solução tampão foi ajustada para um pH final de aproximadamente 6,8 a 39 °C.

Para realizar a incubação foi retirado um jarro de digestão por vez do incubador *in vitro* TE – 150 (Tecnal®), as amostras foram distribuídas aleatoriamente e alocadas uniformes nos dois lados da divisória do jarro, logo após foram adicionadas as soluções tampão e líquido ruminal com injeção CO₂ durante trinta segundos (não permitindo que o CO₂ forme bolhas no inoculo tamponado) e a tampa foi fechada. Este processo se repetiu para todos os jarros. Cada jarro continha todas as relações volumoso: concentrado em seis repetições, dois saquinhos brancos e uma dose específica do aditivo.

A incubação consistiu em dois estágios sendo o primeiro descrito como fase fermentativa, que simula a digestão que ocorre no rúmen, durante 48 horas sob agitação contínua. Após as 48 horas ocorre a interrupção da fase fermentativa e inicia-se o segundo estágio descrito como fase química, que simula o abomaso (em meio ácido), em que cada jarro é aberto e são adicionados 40 mL de ácido clorídrico (HCl 6N) e 8 gramas de pepsina (Sigma 1:10000), conforme descrito por Holden (1999). A pepsina foi previamente dissolvida em 34 mL de água destilada a 35°C durante 5 minutos, e o pH da solução mantido entre 2,0 a 3,5 (HOLDEN, 1999). A incubação continuou por mais 24 horas a 39°C sob agitação contínua.

A digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), fibra em detergente neutro (DIVFDN), matéria orgânica (DIVMO) e da proteína bruta (DIVPB), foi obtida pelo

cálculo da diferença entre a concentração do nutriente na amostra antes e depois da incubação.

Foram separados 6 saquinhos de cada tratamento, os quais foram imersos em uma solução de detergente neutro durante 1 hora para determinação da FDN das amostras após a digestibilidade. Após a lavagem com esta solução os mesmos foram lavados 2 vezes com água destilada quente e 1 vez com acetona, sendo transferidos para estufa 105 °C por 12 horas, para determinação da DIVFDN. Outros 6 saquinhos de cada tratamento foram abertos e com peso conhecido transferidos para cadinhos de porcelana e levados à mufla a 550 – 600°C, para determinação da DIVMO.

Os saquinhos restantes foram utilizados para determinação da DIVPB, em que os resíduos foram transferidos para os tubos de digestão e submetidos ao procedimento de Kjeldhal de destilação.

Os coeficientes de digestibilidade foram determinados a partir da equação:

$$\text{Coef. Dig} = \frac{[P1 - (P2 - B)] * 100}{P1}$$

Em que: P1= peso inicial da amostra; P2= Peso da amostra pós digestibilidade *in vitro*; B= correção do saquinho branco.

Os dados obtidos da digestibilidade *in vitro* da MS, MO, FDN e PB foram submetidos à análise de variância pelo software estatístico SAEG 9,1 (UFV, 2007), aplicando o teste de média de Tukey a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS

Na tabela 7 podem ser observados os coeficientes de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), fibra em detergente neutro (DIVFDN), matéria orgânica (DIVMO) e proteína bruta (DIVPB) dos aditivos avaliados.

Foi verificado efeito sobre as variáveis DIVMS e DIVFDN para os diferentes aditivos em estudo. Na DIVMS houve aumento com a inclusão dos aditivos, com ponto máximo de coeficiente de digestibilidade foi de 0,7573 para o aditivo ácido ricinoléico, porem os tratamentos com a inclusão de MON e Q não diferiram do tratamento controle.

Na DIVFDN houve redução com a inclusão de Q. Os demais aditivos não influenciaram na variável, apresentando ponto máximo de coeficiente de digestibilidade de 0,6000 para o grupo controle. A utilização dos aditivos não influenciou na DIVMO e na DIVPB.

Tabela 7 - Coeficiente de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), fibra em detergente neutro (DIVFDN), matéria orgânica (DIVMO) e proteína bruta (DIVPB) dos aditivos

Variável	Aditivos					P-valor
	C	MON	LCC	AR	Q	
DIVMS	0, 7174 B	0, 7398 AB	0, 7551 A	0, 7573 A	0, 7278 AB	0.03556
DIVFDN	0, 6000 A	0, 5360 A	0, 5092 AB	0, 5345 A	0, 4368 B	0.00528
DIVMO	0, 6870	0, 7399	0, 7477	0, 7483	0, 7166	ns
DIVPB	0, 9077	0, 8581	0, 8780	0, 8471	0, 8617	ns

C: Controle; MON: Monensina; LCC: Líquido da casca da castanha de caju; AR: Ácido ricinoléico e Q: Quitosana.

Foi verificado efeito significativo ($P < 0,001$) apenas para as razões volumoso: concentrado sobre a DIVMS, DIVPB e DIVMO, para a DIVFDN ($P = 0,09$). Não houve interação significativa dos aditivos com as razões volumoso: concentrado sobre a DIVMS, DIVFDN, DIVPB e DIVMO (Tabela 7).

Tabela 8 - Coeficiente de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), fibra em detergente neutro (DIVFDN), matéria orgânica (DIVMO) e proteína bruta (DIVPB) dos aditivos dentro de cada razão volumoso: concentrado (V: C)

V: C	Aditivos					P-valores	
	C	MON	LCC	AR	Q	V: C	V: C
DIVMS							
100:00	0, 5373	0, 5831	0, 6104	0, 6291	0, 5623	0, 5845 C	
50:50	0, 7430	0, 7657	0, 7738	0, 7652	0, 7580	0, 7612 B	ns
20:80	0, 8717	0, 8705	0, 8810	0, 8775	0, 8630	0, 8728 A	<0,001
DIVFDN							
100:00	0, 5946	0, 4840	0, 4125	0, 5106	0, 4374	0, 4879 B	
50:50	0, 5734	0, 5526	0, 5961	0, 5435	0, 3611	0, 5254 AB	ns
20:80	0, 6319	0, 5712	0, 5190	0, 5493	0, 5116	0, 5566 A	0,0916
DIVPB							
100:00	0, 8686	0, 7780	0, 8253	0, 7223	0, 7901	0, 7969 C	
50:50	0, 9009	0, 8737	0, 8903	0, 8746	0, 8878	0, 8855 B	ns
20:80	0, 9535	0, 9226	0, 9183	0, 9445	0, 9072	0, 9293 A	<0,001
DIVMO							
100:00	0, 5431	0, 5773	0, 5816	0, 5844	0, 5405	0, 5654 C	
50:50	0, 7883	0, 7692	0, 7771	0, 7699	0, 7474	0, 7704 B	ns
20:80	0, 7296	0, 8731	0, 8843	0, 8907	0, 8618	0, 8479 A	<0,001

C: Controle; MON: Monensina; LCC: Líquido da casca da castanha de caju; AR: Ácido ricinoléico e Q: Quitosana.

4. DISCUSSÃO

Na literatura tem sido relatada a utilização de óleos funcionais na nutrição animal com o objetivo de melhorar a digestibilidade dos nutrientes, devido à alteração na

atividade enzimática e a manipulação dos produtos da fermentação ruminal (SCHEURMANN; CUNHA Jr, 2005; BERCHIELLE, 2006).

No presente estudo, a inclusão dos aditivos ocasionou em aumento na digestibilidade da MS, este resultado se deve ao fato dos aditivos causarem alterações nos padrões de fermentação ruminal. Porém, segundo Van soest; Demeyer (1996) os ácidos graxos insaturados de cadeia longa reduzem a digestibilidade, o que não foi observado neste trabalho, pois os efeitos dos compostos de óleos funcionais sobre a atividade microbiana no rúmen pode sofrer variação dependendo da dose e do tipo de óleo funcional. Mas os aditivos MON e Q não diferiram do grupo controle. Estes resultados concordam com o reportado na literatura com a utilização de monensina, de que ela atua melhorando a digestibilidade (HALL, 2000; Mc GUFFEY et al., 2001), mas diferem de Coneglian (2009) que encontrou aumento da digestibilidade da MS com tratamentos que forneceram monensina e óleos essenciais ao nível de 2 e 4 g/dia. Vieira (2017), avaliando a inclusão de Q, LCC e a associação dos dois aditivos observou aumento na DIVMS quando utilizado quitosana e redução no tratamento com a inclusão de LCC, dados que diferem deste trabalho, pois todos os aditivos aumentaram a digestibilidade, mas não diferiram entre os tratamentos.

Na DIVFDN a quitosana reduziu a digestibilidade, pois segundo Goiri et al (2009 a, b), a quitosana reduz a digestibilidade *in vitro* de compostos fibrosos, sugerindo atuação sobre as bactérias celulolíticas o que reduz a taxa de degradação da fibra. A inclusão de LCC também reduziu a digestibilidade da FDN, diferente de Vieira (2017) que observou aumento na digestibilidade, que pode estar relacionado à melhor atividade das bactérias celulolíticas. Já os demais aditivos não diferiram do grupo controle.

Segundo Perry et al., (1976); Russell et al., (1989) a razão volumoso:concentrado pode influenciar a fermentação ruminal, ocasionando maior eficiência metabólica de energia das bactérias ruminais e ou do animal, com alteração na proporção dos ácido graxos de cadeia curta e redução na produção de metano. Quando se melhora a alimentação, os níveis de inclusão dos alimentos bem como a alteração na microbiota ruminal, tem-se maior retenção de energia.

Nas razões V: C é possível observar que a razão 20:80 apresentou os maiores coeficientes de digestibilidade da MS, PB, MO e para a FDN tendeu a aumentar. Pois dietas com maior proporção de concentrado, a digestão ocorre mais rapidamente. Chapaval et al., (2006) também encontrou maiores valores de digestibilidade para o

tratamento com maior quantidade de concentrado (75%) e redução da digestibilidade da FDN. Fato que pode ser explicado devido às dietas com alto concentrado apresentarem menor porcentagem de FDA.

Rodrigues et al. (1996) também observaram maior digestibilidade da MS, com o aumento do nível de concentrado na dieta. Dados estes parecidos com os deste trabalho, que é devido à presença de maior quantidade de carboidratos totais digestíveis em relação aos carboidratos estruturais contidos na ração de baixa fibra.

5. CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que os aditivos isoladamente, adicionados a dieta de ruminantes agem como moduladores da fermentação ruminal, melhorando a digestibilidade dos nutrientes, possibilitando substituir os antibióticos ionóforos.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANKOM, Technology. Method 3: *In vitro* true digestibility using the DAISYII Incubator. Disponível em: http://www.ankom.com/media/documents/IVDMD_0805_D200.pdf.
- AOAC. 'Official methods of analysis.' 17th edn. **Association of Official Analytical Chemists**: Arlington, VA, 2000.
- ARRIGONI, M. D. B. et al. Níveis elevados de concentrado na dieta de bovinos em confinamento. **Veterinaria e Zootecnia**; 20(4): 539-551, 2013.
- ASGARY, S.; SHAMS ARDEKANI, M.; S.; NADERI, G.; H. et al. The antioxidant activity of the essential oils of Iranian conifers on red blood cell. Proceedings of XIIIth International Symposium on Atherosclerosis. Kyoto, Japan, 2003.
- BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. Nutrição de Ruminantes. Jaboticabal: Funep, 2006.
- BEZERRA JR, P.S.; ILHA, M.R.S.; LANGOHR, I.M.; BARROS, C.S.L. Intoxicação experimental por monensina em equinos. Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, v.20, n.3, p.102-108, 2000.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, p. 223-253, 2004.
- CASALI, A. O.; DETMANN, E., VALADARES FILHO, S.C., PEREIRA, J.C., HENRIQUES, L. T., FREITAS, S. G., PAULINO, M. F. Influence of incubation time and particles size on indigestible compounds contents in cattle feeds and feces obtained by in situ procedures. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 37, 335-342, 2008.
- CHAPAVAL, L.; MELOTTI, L. ; ROSSI JÚNIOR, P. ; OLIVINDO, C. S. ; REGO, J. P. A. Efeito das proporções volumoso:concentrado sobre a degradação ruminal de fontes protéicas de origem animal e vegetal: consumo e digestibilidade aparente. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.7, n.1, p. 20-26, 2006.
- CONEGLIAN, S. M. Uso de Óleos Essenciais de Mamona e Caju em dietas de Bovinos. 2009. 100f. **Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Estadual de Maringá**, Maringá. 2009.
- GOIRI, I.; GARCIA-RODRIGUEZ, A.; OREGUI, L. M. Effects of chitosans on *in vitro* rumen digestion and fermentation of maize silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 148, p. 276-287, 2009a.
- 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, 2009b.
- GOIRI, I., A. GARCIA-RODRIGUEZ, AND L. M. OREGUI. Effect of chitosan on mixed ruminal microorganisms fermentation using the Rumen Simulation Technique (Rusitec). **Animal Feed Science and Technology**. 152:92-102. 2009c.
- HALL, J.O. Ionophore use and toxicosis in cattle. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.** v.16, p.497-509, 2000.
- HOLDEN, L.A. Comparison of methods of *in vitro* matter digestibility for ten feeds. **Journal Dairy Science**, 2(8):1791-1794, 1999.

JACAÚNA, A.G. avaliação *in vitro* da quitosana como aditivo em dietas para ruminantes. 2016. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2016.

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

MCINTOSH, F.M. et. al. Effects of essencial oils on ruminal microorganisms ans their protein metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 5011-5014, 2003.

NICODEMO, M.L.F. Uso de aditivos na dieta de bovinos decorte. Campo Grande. Embrapa Gado de Corte. 2002.54p.(CNPGC. Documentos, 106). 2001.

PERRY, T. W.; BEESON, W. M.; MOHLER, M. T. Effect of monensin on beef cattle performance. *J Anim Sci.* 42:761-5. 1976.

RASOOLI, I.; ABYANEH, M. R. Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, n. 15, p. 479-483, 2004.

RODRIGUES, L.R.R., FONTES, C.A.A., JORGE, A.M. et al. Consumo de rações contendo quatro níveis de concentrado por bovinos holandeses e nelore e por bubalinos. *R. Soc. Bras. Zootec.*, 25(3): 568-581. 1996.

RUSSELL, J. B, STROBEL, H. J. Mini-review: the effect of ionophores on ruminal fermentations. *Appl Environ Microbiol.* 1989; 55:1-6.

SCHEUERMAN GN, CUNHA Jr A. Prospects for the use of plant products as alternative additives in poultry feed. Concórdia, SC: EMBRAPA Suínos e Aves, 56 p. 2005.

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **Journal British Grassland Society**, v.18, p.104-111, 1963.

VAN NEVEL, C.J.; DEMEYER, D. I. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents in vitro. **Reproduction. Nutrition. Development**, v.36, p. 53– 65, 1996.

VAN SOEST, P.J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. A rapid method for the determination of fiber and lignin. **Journal Association Official Agricultural. Chem.** v.46, p.829-835, 1963.

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

VIEIRA, E. R. Q. Avaliação do líquido da casca da castanha de caju e quitosana como aditivo para ruminantes. **Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Grande Dourados.** Dourados, 2017.

VIEIRA, L.L.R. **Extrato de plantas como aditivo na nutrição de ruminantes.** Goiânia, GO. Trabalho de conclusão de curso - Escola de Veterinária e Zootecnia. Universidade Federal de Goiás. 2014.

APÊNDICE

Extração do DNA:

As amostras de conteúdo ruminal (sólido e líquido) foram processadas separadamente e depois homogeneizadas segundo a técnica descrita por Stevenson e Weimer (2007).

O descongelamento da parte sólida das amostras foi realizada com água em temperatura ambiente, após foi feita a pesagem de 20 g das amostras e colocadas em um liquidificador previamente refrigerado junto com 60 mL de buffer de extração (EB: 100 mM Tris / HCl, 10 mM EDTA, NaCl 0,15 M, com pH de 8,0) e agitou durante 2 min. Este conteúdo foi transferido para tubos falcon de 50 mL e posto sob refrigeração, juntamente com 20 mL de EB frio utilizado para limpar o misturador. Esta suspensão foi então centrifugada em uma rotação de 500 g (5000 rpm) durante 15 minutos a 4°C para remover quantidade considerável de partículas de plantas mantendo as células bacterianas em suspensão. O sobrenadante foi filtrado através de gaze em um novo tubo falcon refrigerado de 50 mL. Os sólidos retidos na gaze foram colocados no próprio tubo falcon e adicionado 20 mL de EB e agitados de forma semelhante centrifugado e filtrado para o mesmo tubo falcon.

Após o processamento da parte sólida, esta foi misturada com a parte líquida e homogeneizada e transferido aproximadamente 12 mL do líquido para tubos de tampa em rosca para centrífuga. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 25 minutos e numa velocidade de rotação de 8.000 g ($78.453,2 \text{ m/s}^2$) e temperatura de 4°C. Após as amostras serem centrifugadas, a porção líquida é descartada. O pelete é ressuspensionado em agitador do tipo vórtex com 3 mL de *buffer* de extração (100mM TRIS/HCl, 10 mM EDTA, 0,15 M NaCl, com um pH de 8,0). A partir dessa nova mistura, transferiu-se 1000 µL para tubos de rosca de 2 ml para micro centrífuga contendo 0,5 g de cristais de vidro. Foi adicionado 50 µL de uma solução de 20% SDS (Dodecil sulfato de sódio) e 700 µL de fenol para DNA (pH 8,0). Esses tubos foram colocados em um homogeneizador *bead beater* adaptado no moinho de bola por 2 minutos, deixados em banho-maria de 60°C por 10 minutos e colocados novamente no homogeneizador por mais 2 minutos, novamente deixados em banho-maria de 60°C por 10 minutos e

colocados de volta no homogeneizador por mais 2 minutos. Logo após, são colocados em uma micro centrífuga por 10 minutos numa velocidade de 12.000 rpm.

Após as amostras serem centrifugadas, a porção sobrenadante, aproximadamente 1000 µL, foi transferida com o auxílio de pipetas de precisão e ponteiros descartáveis para novos tubos de micro centrífuga, desprezando o material sólido. Após essa primeira etapa, foi adicionado 500 µL de fenol para DNA. As amostras foram agitadas no agitador tipo vórtex por 10 segundos e imediatamente colocadas na micro centrífuga com a mesma velocidade de rotação por 10 minutos.

Na segunda extração, foi adicionado aproximadamente 700 µL do sobrenadante para tubos novos e 500 µL de fenol. Caso não fosse possível transferir o volume proposto, foi adicionado mais do *buffer* de extração, respeitando o volume máximo de 100 µL. As amostras foram novamente agitadas e colocadas na centrífuga, por 5 minutos.

Na terceira extração, foi retirado 650 µL da porção sobrenadante, e adicionado 500 µL de fenol. Observando da necessidade de adicionar mais *buffer*, agitado por 10 segundos e centrifugado por 5 minutos.

A quarta e quinta extração foi semelhante. Foi transferido 650 µL do sobrenadante, para novos tubos, e adicionado 250 µL de fenol para DNA e 250 µL de clorofórmio para DNA, verificando se a necessidade de adicionar mais *buffer*. Os tubos foram agitados e colocados novamente na centrífuga por 5 minutos.

Na sexta extração, retirou-se novamente 650 µL do sobrenadante e transferido em novos tubos, nessa penúltima etapa foram colocado 500 µL de clorofórmio para DNA e *buffer* se fosse preciso, as amostras foram agitadas no agitador, e centrifugadas por 5 minutos.

Na sétima e última extração, retirou-se 550 µL da porção sobrenadante e foi adicionado 400 µL de clorofórmio, caso necessário, adicionado mais *buffer*. Por fim, agitou-se por 10 segundos e centrifugado por 5 minutos. A necessidade de adicionar o *buffer* de extração em todas ou quase todas as etapas é em razão de não perder grande quantidade de DNA na porção líquida, e manter o volume constante.

Após as 7 etapas, a porção sobrenadante foi acondicionada em novos tubos, e o volume retirado foi anotado para que fosse calculado a quantidade de novos reagentes para adicionar no conteúdo retirado. Calculou-se a quantidade de 3M de acetato de sódio pela fórmula: “volume do sobrenadante x 0,11” também se calculou o volume de isopropanol adicionado, pela fórmula “volume do sobrenadante x 0,66”. A partir desse

momento, quando observado com atenção foi possível verificar os filamentos de DNA no líquido. Cuidadosamente o tubo foi agitado manualmente aproximadamente 10 vezes, e colocado na centrífuga mantendo a velocidade de 12 mil rotações por minuto, por um período de 20 minutos.

Após os 20 minutos os tubos foram retirados da centrífuga e no fundo do tubo foi possível observar um pélete, o que significa que a extração foi realizada de forma correta, descartou-se o líquido, e adicionou-se 1000 μL de uma solução de álcool 70, e centrifugou-se por 5 minutos. O líquido foi descartado, e repetido o procedimento, mas dessa vez com 500 μL de álcool 70. Centrifugou-se por 3 minutos, e descartou-se o líquido. Os tubos permaneceram abertos, no entanto protegidos para que não ocorresse contaminação das amostras e permitido que perdesse umidade. No dia seguinte adicionou-se 100 μL de TE (10 mM TRIS/HCl, 1 mM EDTA em pH 8,0) e foram estocados em freezer -20°C .