



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

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA QUITOSANA COMO ADITIVO EM DIETAS PARA RUMINANTES

AMANNA GONZAGA JACAÚNA

Dourados – MS

2016



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

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA QUITOSANA COMO ADITIVO EM DIETAS PARA RUMINANTES

AMANNA GONZAGA JACAÚNA

Orientador: Leonardo de Oliveira Seno

Co-orientador: Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Goes

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

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

J12a	<p>Jacaúna, Amanna Gonzaga. Avaliação in vitro da quitosana como aditivo em dietas para ruminantes. / Amanna Gonzaga Jacaúna. – Dourados, MS : UFGD, 2016. 41f.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Seno. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Cinética da fermentação. 2. Digestibilidade. 3. Fermentação ruminal. 4. Parâmetros ruminais. I. Título.</p>
------	--

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA QUITOSANA, COMO ADITIVO EM DIETAS PARA RUMINANTES

por

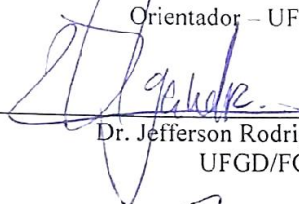
AMANNA GONZAGA JACAÚNA

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

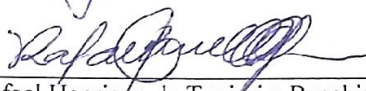
Aprovada em: 21/07/2016



Dr. Leonardo de Oliveira Seno
Orientador – UFGD/FCA



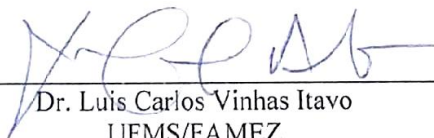
Dr. Jefferson Rodrigues Gandra
UFGD/FCA



Dr. Rafael Henrique de Tonjési e Buschinelli de Goes
UFGD/FCA



Dr. Luciano da Silva Cabral
UFMT/DZER



Dr. Luis Carlos Vinhas Itavo
UFMS/FAMEZ

“Nunca haverá impasse enquanto se está imbuído de desafios. Não se anda porque existe um caminho; por andar é que se abre o caminho.”

(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela luz que emana sobre minha mente que me faz destemida a enfrentar desafios; pela força que me impede de esmorecer nas piores dificuldades; pela esperança, que carregam meus olhos, a almejar novos desafios, novas conquistas.

À minha família: meu pai com seus isopores cheios das coisas mais gostosas de nossa terra que me sustentaram por meses e pela confiança; minha mãe, minha companheira, amiga, confidente, alicerce, detentora dos meus melhores predicados, a qual não desiste de mim por nada, que assume junto comigo meus sonhos, ideais, realidade. Ela que multiplica o pouco que tem para não nos deixar passar dificuldade, que acredita nas minhas investidas (até mais que eu mesma) e não imagina o quanto me encoraja a querer ser mais, e que eu amo com todas as forças que tenho dentro de mim; à minha irmã (Bay) e cunhado (Ader), pela confiança, pelo abrigo, pela força, e por não desistirem de mim. Sou-lhes muito grata.

Aos professores, Dr. Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Goes e o Dr. Leonardo de Oliveira Seno, meus orientadores, pelo tempo, paciência e humildade em compartilhar comigo um pouco dos seus conhecimentos, e posso dizer que foi o cimento que fechou as lacunas da minha obra e que me fez ver que tenho muitas outras a fechar.

À Aline Dias pelas orientações práticas de campo, análises no laboratório, documentações, caronas. Aos alunos da graduação (integrantes do grupo de pesquisa NERU) por perderem um pouco de sono para me ajudar no desenvolvimento do meu trabalho e nas análises de laboratório. Especialmente o Charles, Paulo, Raquel. Assim como os funcionários e colaboradores dos laboratórios da universidade.

Aos demais professores do programa pela construção intelectual e oportunidade de conhecer outras realidades; e ao secretário da pós-graduação em Zootecnia Ronaldo Araújo, pelas conversas, por solucionar minhas dúvidas (que não foram poucas), e por me indicar as melhores opções.

E aos meus amigos, Mari, Cegatos, Bonkoski, Hayanna, e outros não menos importantes, que foram minha família fora de casa. Agradeço pela companhia, aventuras, conversas e cuidado, são conquistadores de um lugar especial em minha vida e coração.

A todos que acreditaram e colaboraram com o sucesso do trabalho executado e minha formação.

BIOGRAFIA

Amanna Gonzaga Jacaúna, filha de Ezildomar Tavares Jacaúna e Maria do Socorro Gonzaga Jacaúna, nasceu dia 08 de outubro de 1991, na cidade de Parintins-AM.

Em Julho de 2008 ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Federal do Amazonas – UFAM, campus Parintins, graduando-se em Fevereiro de 2014.

Em agosto de 2014 iniciou o programa de Pós-Graduação, nível de Mestrado, em Zootecnia, na Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, desenvolvendo estudos na área de Produção de Ruminantes, submetendo-se à defesa de dissertação em 21 de julho de 2016.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	VIII
ABSTRACT	X
CAPITULO 1	
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	02
REVISÃO DE LITERATURA	04
Relação volumoso:concentrado em dietas de ruminantes	04
Quitosana e seu uso na alimentação de ruminantes	06
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
OBJETIVOS	16
Objetivo geral	16
Objetivos específicos.....	16
CAPITULO 2	17
INTRODUÇÃO	20
MATERIAL E MÉTODOS	21
RESULTADOS	28
DISCUSSÃO	34
CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
CONSIDERAÇÕES FINAIS	41

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química da quitina e quitosana	6
Figura 2 – Efeito da quitosana na digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca de cada relação volumoso:concentrado.....	28
Figura 3 – Efeito da quitosana na digestibilidade <i>in vitro</i> da proteína de cada relação volumoso:concentrado.....	29
Figura 4 – Valores médios de N-NH ₃ (mg/dL) do líquido ruminal da digestibilidade de diferentes relações V:C no tempo.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN) das relações volumoso:concentrado.....	21
Tabela 2 – Médias (\pm EPM) dos coeficientes de digestibilidade da matéria seca (DIVMS) dentro de cada relação volumoso:concentrado (V:C).....	28
Tabela 3 – Médias (\pm EPM) dos coeficientes de digestibilidade da proteína (DIVPB).....	29
Tabela 4 – Médias (\pm EPM) dos coeficientes de digestibilidade da matéria orgânica (DIVMO) dentro de cada relação volumoso:concentrado (V:C).....	30
Tabela 5 – Médias (\pm EPM) dos coeficientes de digestibilidade médios da fibra em detergente neutro (DIVFDN) dentro de cada relação volumoso:concentrado (V:C).....	30
Tabela 6 – Resultado do teste de esferecidade de Mauchly para os dados de pH e N-NH ₃	30
Tabela 7 – Resultado da análise multivariada das variáveis pH e N-NH ₃ , considerando o delineamento inteiramente casualizado e testando os efeitos de tempo, relação volumoso:concentrado (V:C), níveis de quitosana (N.Q) e V.C x N.Q	31
Tabela 8 – Médias do efeito da relação V:C nos valores de pH ruminal	31
Tabela 9 – Médias (\pm EPM) dos parâmetros cinéticos da fermentação ruminal de dietas com diferentes relações volumoso:concentrado (V:C) e níveis crescentes de quitosana.....	33

RESUMO

JACAUNA, Amanna Gonzaga. Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, Dourados/MS, Março de 2016. **Avaliação *in vitro* da quitosana como aditivo em dietas para ruminantes.** Orientador: Leonardo de Oliveira Seno; Co-orientador: Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Góes.

Existem mecanismos que permitem aprimorar o desempenho dos ruminantes através da manipulação dos padrões da fermentação ruminal, de modo que, alterações no ecossistema ruminal potencializem a síntese de produtos provenientes da digestão dos alimentos, tornando-a mais eficaz e menos dispendiosa em termos de energia. A quitosana é um polissacarídeo de ocorrência natural que tem revelado grande versatilidade e propriedades promissoras para sua utilização segura em ampla variedade de produtos e aplicações, sua flexibilidade química é uma das vantagens que permite a otimização de seu perfil biológico. Como alternativa a substituição de aditivos antibióticos, este estudo objetivou avaliar o efeito da inclusão de níveis de quitosana sobre dietas com diferentes relações volumoso:concentrado. Foram realizados três experimentos em que: o *Experimento 1* avaliou o efeito de níveis de quitosana na digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO), matéria seca (DIVMS), fibra em detergente neutro (DIVFDN) e proteína (DIVPB) em diferentes relações volumoso:concentrado na digestibilidade *in vitro* da MS e nutrientes; o *Experimento 2* avaliou os parâmetros ruminais no líquido ruminal *in vitro* com diferentes relações volumoso:concentrado combinado com níveis de quitosana; e o *Experimento 3* avaliou o efeito de níveis de quitosana nos parâmetros de cinética da degradação feita *in vitro* no sistema de produção de gases com diferentes relações volumoso:concentrado. Como doadores de inóculo ruminal foram utilizados dois bovinos da raça Jersey providos de canula ruminal, com peso médio aproximado de 360 kg, mantidos em piquetes formados por capim Marandu, recebendo somente suplementação mineral. Para a determinação da digestibilidade *in vitro* de nutrientes e dos parâmetros de fermentação *in vitro*, foram utilizados: quatro níveis de quitosana (0, 1625, 3500 e 7500 mg/kg de MS) e cinco relações de volumoso:concentrado (100:0, 65:35, 50:50, 35:65, 20:80); e para o ensaio sobre cinética de fermentação pela técnica de produção de gases foram avaliados cinco níveis de quitosana (0, 400, 800, 1200 e 1600 mg/kg MS) e seis relações volumoso concentrado (100:0; 80:20; 65:35; 50:50; 35:65; 20:80). No *Experimento 1* foi verificado efeito dos fatores principais e da interação entre os níveis de quitosana e as relações V:C na DIVMS e DIVPB. Foi observado efeito apenas dos fatores principais na DIVMO e DIVFDN. Os resultados demonstraram que a quitosana afeta

negativamente a digestibilidade da matéria seca com o aumento das doses independente das dietas. No *Experimento 2* foi verificado efeito significativo apenas da relação V:C e do tempo para os valores de pH, que mantiveram seus valores médios no limite mínimo para de 6,2, para que ocorra a máxima atividade dos microrganismos, bem como crescimento microbiano, fermentação ruminal e degradação da FDN; efeito da interação do tempo com as relações V:C para as concentrações de amônia ruminal. Corroborando com os dados de digestibilidade, que apresentaram diminuição da DIVPB indicando uma redução na deaminação das dietas, com efeito quadrático decrescente. No *Experimento 3* foi observado efeito significativo da quitosana nos parâmetros A (fração rápida), C (tempo – lag time), D (fração lenta), e A+D (produção cumulativa de gás das frações rápida e lenta); efeito significativo das relações V:C para os parâmetros A, C, D, E (taxa de produção da fração lenta por hora) e A+D; efeito significativo da interação dos fatores principais para os parâmetros A, C, D, E e A+D. Com a adição crescente de quitosana, aumenta a produção de gás e diminui o tempo de fermentação de dietas com alto concentrado, caracterizando maior eficiência na degradabilidade da dieta confirmando seu potencial uso em dietas mais energéticas para ruminantes. A quitosana altera os parâmetros avaliados mais eficientemente na dose mínima de 1722 mg/kg de MS para todas as dietas.

Palavras-Chave: cinética da fermentação, digestibilidade, fermentação ruminal, parâmetros ruminais.

ABSTRACT

JACAUNA, Amanna Gonzaga. Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, Dourados/MS, Março de 2016. ***In vitro* evaluation of chitosan as an additive in ruminant diets.** Orientador: Leonardo de Oliveira Seno; Co-orientador: Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Góes.

There are mechanisms to enhance the performance of ruminant through manipulation of ruminal fermentation patterns, so that changes in the ruminal ecosystem leverage the synthesis products from digestion of food, making it more effective and less costly in terms of energy. Chitosan is a naturally occurring polysaccharide that has shown great versatility and promising properties for safe use in a wide variety of products and applications, chemical flexibility is one of the advantages that allows the optimization of their biological profile. As an alternative to replace antibiotics additives, this study aimed to evaluate the effect of including chitosan levels on diets with different forage: concentrate. Three experiments were conducted in which: Experiment 1 evaluated the effect of chitosan levels in vitro digestibility of organic matter (IVOMD), dry matter (DM), neutral detergent fiber (IVNDFD) and protein (IVCPD) in different forage: concentrate in vitro digestibility MS and nutrients; Experiment 2 evaluated the ruminal fermentation in rumen fluid in vitro with different forage: concentrate combined with chitosan levels; and Experiment 3 evaluated the effect of chitosan levels in kinetic parameters of degradation made in vitro in gas production system with different forage: concentrate. As rumen fluid donors used two from Jersey cows fitted with rumen cannula, with approximate average weight of 360 kg, kept in paddocks consist of grass Marandu, receiving only mineral supplementation. For determining the in vitro digestibility of nutrients and in vitro fermentation parameters were used: four levels of chitosan (0, 1625, 3500 and 7500 mg / kg DM) and five ratio forage to concentrate (100: 0, 65:35, 50:50, 35:65, 20:80); and the test for fermentation kinetics for gas production technique were evaluated five levels of chitosan (0, 400, 800, 1200 and 1600 mg / kg DM) and six ratio forage concentrate (100: 0; 80:20; 65 : 35; 50:50; 35:65; 20:80). In Experiment 1 was no effect of the main factors and the interaction between the chitosan levels and ratio V:C in IVDMD and IVCPD. effect was observed only major factor in IVDMD and IVNDFD. The results showed that chitosan negatively affects the digestibility of dry matter with increasing doses irrespective of the diets. In Experiment 2 was observed significant effect in relation V C and the time for the pH, which maintained their mean minimum limit of 6.2 for the occurrence of the maximum activity of microorganisms, as well as microbial growth, ruminal fermentation and degradation of NDF; time interaction effect with the relations V:C for concentrations of ruminal ammonia. Corroborating the digestibility data, which showed a decrease in IVCPD indicating a reduction in deamination of diets with decreasing quadratic effect. In Experiment 3 was a significant effect of chitosan on the parameters A (fast fraction), C (time - lag time), D (slow fraction), and A + D (cumulative gas production of fast and slow fractions); significant effect relations of V C for parameters A, C, D, E (production rate of the slow

fraction per hour), and A + D; significant interaction of the main factors for the parameters A, C, D, E and A + D. With the increasing addition of chitosan increases gas production and reduces the time of fermentation with high concentrate diets, featuring greater efficiency in the diet degradability confirming its potential use more energy for ruminant diets. Chitosan changes the parameters evaluated more efficiently at the lowest dose of 1722 mg / kg DM for all diets.

Keywords: kinetics of fermentation, digestibility, ruminal fermentation, ruminal parameters.

CAPÍTULO 1

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Em meio à desenvolvimentos tecnológicos que cada vez mais ganham espaço dentro da produção animal, desde as instalações a manejos racionais que facilitam e reduzem o uso de mão de obra, a alimentação ainda é o principal fator econômico de extrema importância nos custos finais da produção animal. Dessa maneira, estratégias que forneçam alimentos com maior digestibilidade e disponibilidade de nutrientes para os animais, podendo reduzir os custos finais de produção aumentando a lucratividade devem ser estudados.

Durante muitos anos os antibióticos ionóforos foram utilizados na alimentação animal como um aditivo estratégico para maximizar a produção e atingir custos mais baixos dos produtos (NAGARAJA, 1995). Entretanto, ao considerar o “Princípio da Precaução”, a União Europeia em janeiro de 2006 (Regulamento 1831/2003 / CE) proibiu o uso de antibióticos na alimentação animal como promotores de crescimento devido às preocupações com o aparecimento de resíduos e estirpes de bactérias mais resistentes nos produtos finais (GUSTAFSON e BOWEN, 1997). Sendo assim, a substituição dos antibióticos por substâncias alternativas naturais vão ao encontro dos valores das empresas, buscando evitar o princípio sobre o desenvolvimento de resistência cruzada em bactérias patogênicas aos humanos.

Uma tendência entre os microbiologistas do rúmen e nutricionistas é manipular o ecossistema microbiano ruminal com aditivos que alterem a população microbiana, com o intuito de melhorar a eficiência da conversão alimentar para a produção de produtos de consumo para os seres humanos.

O conhecimento sobre as propriedades químicas e físicas da quitosana, permitiram a Goiri et al. (2009) proporem sobre sua utilização como possível modulador da fermentação ruminal e do processo digestivo. Alguns estudos na literatura avaliaram o efeito da inclusão de quitosana sobre a fermentação ruminal nos últimos anos (GOIRI et al., 2009a, 2009b, 2009c, 2010; WENCELOVA et al, 2014; ARAÚJO et al., 2015; BELANCHE et al., 2015, 2016).

A quitosana por ser um bioplímero atóxico e biodegradável possui características que sobressaem a outros aditivos, com isso seu uso destaca-se nas áreas médicas e de conservação, por possuir atividade antimicrobiana (SHAHIDI et al., 1999; JEON et al., 2002) contra bactérias, fungos e leveduras (SUDARSHAN et al., 1992; FANG et al., 1994).

Com isso, realizou-se este estudo a fim de se avaliar o efeito da quitosana na digestibilidade de dietas e nos padrões de fermentação buscando maior eficiência de utilização de energia no ecossistema ruminal, e assim torná-lo um produto alternativo na

nutrição animal, que possa melhorar as condições de desempenho e que influencie no fator econômico da produção animal, aperfeiçoando a produção e atendendo as exigências dos consumidores.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Relação Volumoso:Concentrado em dietas de ruminantes

Ruminantes são animais que respondem de forma diferente às dietas ou alimentos e ajustam o comportamento alimentar de acordo com suas necessidades nutricionais, sobretudo de energia. A ingestão de matéria seca e a digestibilidade dos nutrientes são os principais fatores que afetam no desempenho animal. Arrigoni et al. (2013) afirmaram que, em confinamento, conhecer o comportamento alimentar dos bovinos e a relação de utilização de volumosos e concentrados em suas dietas pode afetar diretamente no consumo desses animais.

Zambom et al. (2005) afirmaram ainda que a resposta animal aos níveis de concentrado dietéticos tem se expressado de forma curvilínea. Logo, o ponto ótimo de concentrado na dieta é variável e tem como fatores determinantes o sexo, a raça, a idade, a qualidade do volumoso e do concentrado (MEDEIROS et al., 2007). Segundo dados do NRC (1996), o consumo de dietas com alto teor de fibra é controlado por fatores físicos como enchimento ruminal e taxa de passagem, ao passo que as dietas com altos teores de concentrado (alta densidade energética) têm seu consumo controlado pela demanda energética do animal e por fatores metabólicos.

Leme et al. (2002) relataram que o fornecimento de dietas com elevados teores de concentrado para animais jovens tem sido utilizadas com o objetivo de intensificar o sistema de produção, permitindo o abate de animais com menor idade, com acabamento de gordura adequado e sem prejuízos à qualidade da carne. Nos últimos anos, dietas com alto teor de concentrado tornaram-se economicamente viáveis em função da elevação no custo de produção de volumosos, redução no preço dos concentrados e ao aumento da oferta de co-produtos da indústria (BORGES et al., 2011; GERON et al., 2011).

O processo de fermentação ruminal pode ser influenciado por diferentes proporções de volumosos e concentrado, pela frequência de alimentação e pelas fontes de proteína e carboidratos da dieta. Com isso, poderá ocorrer alterações nas concentrações de ácidos graxos voláteis e de nitrogênio amoniacal do fluido ruminal que reflete na flutuação do pH ruminal e a digestão da fibra (ZEOULA et al., 2006; MAEDA et al., 2007).

Medeiros et al. (2007) relataram que altos níveis de concentrado acarretam aumento na ingestão de matéria seca e de nutrientes e diminuição do consumo de fibra; e ainda, afirmam que dietas contendo níveis de concentrado acima de 40% melhoram a digestibilidade de matéria seca e nutrientes, porém, em níveis superiores a 61,45 e 73,15% de concentrado, as digestibilidades de extrato etéreo e carboidratos não fibrosos diminuem.

Avaliando bovinos confinados com diferentes graus de sangue Zebu em dietas com níveis crescentes de concentrado, foi observado que animais com maior proporção de sangue europeu se mostraram mais eficientes tanto na ruminação da matéria seca quanto do FDN (SARTI et al., 2007).

Em outro estudo, ocorreu diminuição no tempo de alimentação e tempo de mastigação total dos animais e consequente aumento no tempo em ócio devido a diminuição dos teores de fibra e aumento na porcentagem de energia das dietas até atingir 85% de concentrado (MARIANI, 2010). É provável que estes animais tenham atingido a saciedade mais rapidamente, o que poderia ser reflexo da maior produção e absorção de ácidos graxos de cadeia curta no rúmen.

Em um estudo que utilizou relações volumoso:concentrado (70:30, 50:50 e 30:70 na base de matéria seca), com feno de capim *coast cross* de diferentes qualidades, verificou-se que dietas com relação de 30:70 resultaram em menores proporções de metano comparando com relações de 50:50 e 70:30 (GASTALDI, 2008). Logo, pode-se afirmar que a relação volumoso:concentrado influencia a fermentação ruminal, em que seus benefícios biológicos podem ser classificados em maior eficiência do metabolismo energético das bactérias ruminais e/ou do animal, modificando a proporção dos ácidos graxos de cadeia curta produzidos no rúmen e diminuindo a produção de metano (PERRY et al., 1976; RUSSEL et al., 1989).

O perfil de fermentação exerce papel de grande importância sobre a emissão de gases, principalmente o metano, que segundo Johnson et al. (1995), varia de uma alta emissão, caracterizada por alta relação acetato:propionato, a uma baixa emissão, caracterizada por baixa relação acetato:propionato. Em casos que as dietas são ricas em cereais, o coeficiente molar acetato:propionato é igual a 1, e dietas com alta proporção de forragem, o coeficiente molar acetato:propionato é de 3 (NUSSIO, 2006).

A melhora no valor nutritivo dos alimentos, relacionada aos níveis fornecidos assim como a alteração da microbiota ruminal permitem maior retenção de energia, diminuição das perdas por metano, melhora no desempenho animal e, consequentemente, menor produção de metano por unidade de produto (metano/ kg carne, leite, etc.) que pode ser obtido por meio de sistemas intensivos de confinamento, bem como em sistemas de produção a pasto em que o manejo da forragem e a utilização de suplementos é otimizada (MONTERIO, 2009).

Há algumas estratégias que permitem a redução na emissão do gás metano pela manipulação da fermentação ruminal por meio de diferentes ferramentas. Uma dessas estratégias é o uso de aditivos, que segundo a Instrução Normativa 15/2009/MAPA, é

definido como substância, microrganismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizado normalmente como ingrediente, que tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios e atenda às necessidades nutricionais ou tenha efeito anticoccidiano.

Dentre os aditivos liberados para o uso no Brasil estão entre os principais os ionóforos, antibióticos não ionóforos, glicerol, tanino, saponinas, leveduras e os óleos/lipídeos, vacinas, anticorpos policlonais.

2.2 Quitosana e seu uso na alimentação de ruminantes

A quitosana (N- acetil- D polímero glucosamina) é um biopolímero natural derivado da desacetilação da quitina (Figura 1), que é o principal componente do exoesqueleto de insetos e crustáceos, parede celular de alguns fungos e algas, sendo que a diferenciação entre a quitina e a quitosana é feita pela porcentagem de unidades GlcNAc (N-acetilglucosamina) e GlcN (Glucosamina), sendo o grau médio de acetilação, um parâmetro estrutural importante para suas propriedades físico-químicas e aplicações. A quitosana é biocompatível, não antigênica, atóxica e biofuncional (HIRANO et al., 1990; KEAN; THANOU, 2010). O nome "quitosana" não indica um único composto, mas sim uma família de compostos em que cada produto possui diferente peso molecular e grau de acetilação. Além disso, de acordo com Muzzarelli (1997), o composto é metabolizado por enzimas, especialmente a lisozima, tornando-a biodegradável.

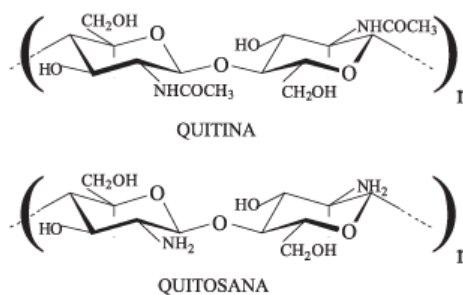


Figura 1. Estrutura química da quitina e quitosana

A quitosana vem demonstrando ampla funcionalidade nas aplicações tecnológicas, farmacêuticas e biomédicas, o que representa grande oportunidade para a comunidade científica e industrial (AJUN, 2009; LARANJEIRA; FÁVERE, 2009). A flexibilidade

química da molécula de quitosana é uma das vantagens que permite otimização de seu perfil biológico (HEIN et al., 2008; KEAN; THANOU, 2010).

Este polissacarídeo foi isolado pela primeira vez em 1811, pelo francês Henri Braconnot, extraída de fungos superiores e por isso denominada “fungina” (SKAUGRUD; SARGENT, 1990). E a importância desse polímero natural tem crescido significativamente em função de sua bioatividade e biocompatibilidade, assim como por ser fonte renovável e biodegradável nas últimas décadas (ALLAN; HADWIGER, 1979; SUDARSHAN et al., 1992; SINGLA; CHAWLA 2001).

A atividade antibacteriana da quitosana foi proposta pela primeira vez por Allan e Hardwiger (1979), quando foram testados os efeitos da quitosana e quitina sobre diferentes gêneros de fungos, apresentando a quitosana um efeito mais sensível a grande maioria dos fungos utilizados. Tang et al. (2010), afirmaram que esse polissacarídeo possui amplo espectro de ação com doses mínimas inibitórias contra bactérias gram positivas e gram negativas.

O mecanismo de ação antimicrobiana da quitosana não está bem elucidado, porém várias hipóteses surgem a respeito, dentre a mais provável é a mudança na permeabilidade celular devido às interações entre a quitosana policatiônica e as cargas eletronegativas na superfície da célula. A quitosana interage com a superfície lipopolissacarídea (LPS) das bactérias gram negativas e da mesma forma com a fração peptidoglicana das bactérias gram positivas, ambas aniônicas. Todavia, determinados estudos apontam que bactérias gram positivas são mais susceptíveis a quitosana do que as bactérias gram negativas (WANG, 1992; NO et al., 2002; SENEL et al., 2004; KUMAR et al., 2005).

Um dos primeiros estudos avaliando a quitosana na alimentação de ruminantes foi utilizando-a como uma fonte alternativa de nitrogênio, porém, Fadel El-Seed et al., (2003), relataram que a quitosana não sofre degradação no rúmen, indicando uma possível atividade protetora contra a ação ruminal, tornando verossímil sua digestão no intestino delgado, como encontrado por Hirano et al. (1990), com animais não ruminantes.

Contudo, Goiri et al. (2009) e Belanche et al. (2015), propuseram o uso da quitosana como possível moduladora da fermentação ruminal com finalidade de otimizar a eficiência alimentar em ruminantes, devido a sua ação antimicrobiana. Utilizando seis diferentes graus de desacetilação da quitosana em ensaios “*in vitro*”, Goiri et al. (2009) observaram que os graus >95 conferem redução na produção de metano e do total de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), aumento da proporção de propionato, além da redução da relação

acetato:propionato (C2:C3); concluindo que o maior grau de deacetilação aumenta a energia obtida por unidade de substrato fermentável.

A partir da obtenção da propriedade química ideal do composto, Goiri et al. (2009) avaliaram a dose-resposta *in vitro* sobre a fermentação ruminal considerando diferentes substratos, variando a relação volumoso: concentrado. Para dietas com alta proporção de forragem (80%), estes autores não observaram alteração na concentração total de AGCC e na proporção molar de acetato, porém houve redução da digestibilidade da matéria orgânica, concentração de butirato e ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR). Em relação ao propionato, houve aumento de sua concentração com o aumento da dose de quitosana além da redução na relação C2:C3. Os resultados obtidos por Goiri et al. (2009) demonstraram que a dose de quitosana utilizada *in vitro* influencia a fermentação microbiana ruminal, e que a dose ótima a ser utilizada depende da natureza do substrato utilizado para incubação e da especificação da quitosana utilizada.

Souza et al. (2011), informaram que a quitosana apresenta baixa estabilidade quando exposta ao ambiente ruminal devido a sua estrutura ser similar a celulose, o que indica que ela pode ser degradada (BELANCHE, et al., 2015); no entanto poucas bactérias foram identificadas como possíveis degradadoras de quitosana no rúmen (KOPECNY; HODROVA 2000).

Belanche et al. (2015), avaliaram diferentes produtos naturais destacaram que uso de quitosana solúvel (>85% de desacetilação), alteraram os padrões de fermentação ruminal, e apresentaram um forte efeito anti protozoário, causando uma redução da atividade dos protozoários no rúmen em mais de 56%; modificando a produção de butirato e de propionato; reduzindo a metanogênese e a matéria orgânica fermentável. Isso ocorre devido alterações nos padrões de fermentação em que a redução da concentração de H₂ reduziria a emissão de gás metano; esta ação pode ocorrer devido a menor atividade dos protozoários, e/ou alteração na população bacteriana ruminal; além de produção de compostos não metanogênicos (ex: Succinato, lactato e propionato) e uma ação direta sobre as bactérias metanogênicas.

Araújo et al. (2011) avaliaram diferentes concentrações de quitosana em dietas para novilhos Nelore confinados destacando melhorias na digestibilidade da matéria seca e nutrientes e que a quitosana altera o metabolismo animal para rotas energéticas mais eficientes através da glicose plasmática.

Em estudos *in vitro* realizados por Wencelová et al. (2014), constatou-se que a quitosana diminui a digestibilidade da MS e da FDN em dietas com alta forragem. A mesma redução também foi observada em estudos anteriores conduzidos com níveis de quitosana

(1625, 3500, 7500mg/kg de MS) e dietas com silagem de milho e dietas com diferentes relações volumoso:concentrado (GOIRI et al., 2009a; GOIRI et al., 2009b). Uma das explicações para que ocorra esse efeito pode estar associado aos efeitos adversos da quitosana sobre os protozoários e bactérias celulolíticas. Belanche et al., (2015) demonstraram efeitos de diminuição da população microbiana pela quitosana principalmente sobre bactérias celulolíticas como *Fibrobacter*; *Butyrivibrio* e *Ruminococcus* e bactérias Hemicelulolíticas (*Eubacterium*), estes efeitos estão correlacionados com o total de bactérias e podem ser compensadas pelas baixa abundância de bactérias celulolíticas.

A estrutura da quitosana também sofre perdas de grupos nitrogênio (amida e amino), o que pode ser um indicativo de seu possível uso como nitrogênio não proteico para síntese proteica (FADEL EL SEED, et al., 2003). Ensaio *in vitro* demonstraram que a quitosana aumenta a eficiência do uso de energia, pois reduz a digestibilidade sem alterar a produção total de ácidos graxos (GOIRI et al., 2009b).

A redução de bactérias fibrolíticas (predominante Gram-positiva) junto ao aumento das bactérias amilolíticas e da atividade amilolítica parece apoiar a idéia de que o modo de ação da quitosana é baseado na interação eletrostática com a parede celular das bactérias (SUDARSHAN; HOOVER AND KNORR, 1992).

Alternativamente, o potencial de hidrólise da quitosana por amilases (WU, 2011) também poderia favorecer a proliferação dessas bactérias capazes de usar a quitosana como fonte de energia (por exemplo, bactérias amilolíticas) conduzindo para mudanças na estrutura da comunidade bacteriana e nos produtos de fermentação.

Segundo Kong et al. (2010), quando o pH é abaixo do pka da quitosana, a interação eletrostática entre a estrutura policatiônica e aniônica dos componentes de superfície dos microrganismos desempenham um papel importante na atividade antibacteriana. Isso porque as moléculas de quitosana tornam-se policatiônicas em um pH abaixo do pka das moléculas (6,3 – 6,5) (LIM & HUDSON, 2004). De outro modo, efeitos quelantes e hidrofóbicos são responsáveis pela atividade antibacteriana da quitosana quando o pH do ambiente é acima do pka das moléculas (KONG et al., 2010)

Belanche et al., (2016), relataram que o aumento da concentração de amônia pode ter ocorrido devido o suprimento extra de amônia pela quitosana e baixa captação de amônia pelos microrganismos em vez de um aumento da proteólise dos alimentos. A baixa incorporação de N bacteriano pode ser devido uma baixa quebra de proteína bacteriana (BELANCHE et al., 2011) melhorando a eficiência de utilização da proteína em dietas

contendo quitosana, sendo essa melhora observada em termos de fluxo de proteína microbiana e eficiência da síntese.

Considerando o potencial de ação da quitosana, que demonstram mudanças no padrão de fermentação, torna-se possível sua utilização na alimentação de bovinos, porém seu uso deve ser melhor explorado e avaliado para que sejam estabelecidas recomendações padronizadas para cada tipo de quitosana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJUN, W.; YAN, S; LI, G; HUILLI, L. Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and *in vitro* release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 566-574, 2009.
- ALLAN, C, R; HADWIGER, L. A. The fungicidal effects of chitosan on fungi and varying in cell wall composition. **Experimental Micology**, v.3, p.285-287, 1979.
- ARAÚJO, Ana Paula Chaves, Efeito de diferentes concentrações de quitosana na dieta de novilhos Nelore. 2011, 90f. Dissertação. (Mestrado em ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2011.
- ARRIGONI, M. D. B. et al. Níveis elevados de concentrado na dieta de bovinos em confinamento. **Veterinaria e Zootecnia**; 20(4): 539-551, 2013.
- BADAWY, S. A.; YOUNIS, M.; SHALASH, M. R. et al. Monensin effects on rumen metabolic profile, methane production and protozoal population in buffalo-heifers. **Egyptian Journal of Veterinary Science**, v.30, p.49-56, 1996.
- BAGG, R. Mode of action of ionophores in lactating dairy cattle. Usefulness of ionophores in lactating dairy cattle. **Guelph: Ontario Veterinary College**, p.13-21, 1997.
- BELANCHE, A.; ABECIA, L.; HOLTROP, G.; GUADA, J.A.; CASTRILLO, C.; DE LA FUENTE, G.; BALCELLS, J. Study of the effect of presence or absence of protozoa on rumen fermentation and microbial protein contribution to the chyme. **Journal of Animal Science**, v.89, n. 12, p. 4163–74. 2011.
- BELANCHE, A., MORALES, E.R., NEWBOLD, C. J. *In vitro* screening of natural feed additives from crustaceans, diatoms, seaweeds and plant extracts to manipulate rumen fermentation. (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2015.
- BORGES, C. A. A.; RIBEIRO, E. L. A.; MIZUBUTI, I. Y.; SILVA, L. D. F.; PEREIRA, E. S.; ZARPELON, T. G.; CONSTANTINO, C.; FAVERO, R. Substituição de milho grão inteiro por aveia preta grão no desempenho de cordeiros confinados recebendo dietas com alto grão. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 2011-2020, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 15/2009** [acessado 2016 jan 22]. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>.
- 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: 161–163, 2003.
- FANG, S. W., C. F. Li and D. Y. C. Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat. **Journal Food Protection**. 57:136-140, Shih.1994.

GASTALDI, K. A. Produção “*in vitro*” de metano, dióxido de carbono e oxigênio utilizando líquido ruminal de bovinos alimentados com diferentes rações [tese]. Jaboticabal: **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**, Universidade Estadual Paulista; 2008.

GERON, L. J. V.; ZEOULA, L. M.; PAULA, E. J. H.; RUPPIN, R. F.; RODRIGUES, D. N.; MOURA, D. C. Inclusão do caroço de algodão em rações de alto concentrado constituído de co-produtos agroindustriais sobre o desempenho animal em tourinhos confinados. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 16, n. 3, p. 14-24, 2011.

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, 2009.

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.

GUSTAFSON, R. H. and BOWEN, R. E. Antibiotic use in animal agriculture. **Journal Applied Bacteriol.** 83: 531–5411, 1997.

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

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

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

JOHNSON, K. A.; JOHNSON, D. E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science.**;73:2483-92, 1995.

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

KOPECNY J, HODROVA B. Chitinolytic enzymes produced by ovine rumen bacteria. **Folia Microbiology**, v.45, p.465–468, 2000.

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

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

LEME, P.R.; SILVA, S. L.; PEREIRA, A.S.C. et al. Desempenho e características de carcaça de animais Nelore, ½ Caracu x Nelore e ¾ Caracu x Nelore confinados com dietas de alto concentrado. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39, 2002, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2002.

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

MAEDA, E. M.; ZEOULA, L. M.; GERON, L. J. V.; BEST, J.; PRADO, I. N.; MARTINS, E. N.; KAZAMA, R. Digestibilidade e características ruminais de dietas com diferentes níveis de concentrado para bubalinos e bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 3, p. 716-726, 2007.

MARIANI, T. M. Suplementação de anticorpos policlonais ou monensina sódica sobre o comportamento ingestivo e desempenho de bovinos Brangus e Nelore confinados [dissertação]. Botucatu: **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Universidade Estadual Paulista; 2010.

MAAS, J. A.; WILSON, G. F.; McCUTCHEON, S. N. et al. The effect of season and monensin sodium on the digestive characteristics of autumn and spring pasture fed to sheep. **Journal of Animal Science**, v.79, n.4, p.1052-1058, 2001.

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

MEDEIROS, G. R.; CARVALHO, F. F. R.; FERREIRA, M. A.; BATISTA, A. M. V.; ALVES, K. S.; MAIOR JÚNOR, R. J. S.; ALMEIDA, S. C. Efeito dos níveis de concentrado sobre o desempenho de ovinos Morada Nova em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 4, p. 1162-1171, 2007.

MONTERIO, R. B. N. C. Desenvolvimento de um modelo para estimativas da produção de gases de efeito estufa em diferentes sistemas de produção de bovinos de corte [dissertação]. Piracicaba: **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, Universidade de São Paulo; 2009.

MUZZARELI, R. A. A. Amphoteric derivatives of chitosan and their biological significance. In: Skjak - BRAEK, G. et al. Chitin and Chitosan, London, New York, **Elsevier Applied Science**, pp 87-99. 1997.

NAGARAJA, T. G. Ionophores and Antibiotics in Ruminants. p 173-204. In: **Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding**. Wallace, R. J. and A. Chesson (eds.), VCH Publ, NY, 1995.

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

NRC. Nutrient Requirements of Beef Cattle. 7th ed. **National Academy Press**, Washington, DC, 1996.

NUSSIO, L. G.; CAMPOS, F. P.; LIMA, M. L. M. Metabolismos de carboidratos estruturais. In: **Nutrição de ruminantes**. 2ª ed. Jaboticabal: Funep; 2006. p.183-223.

PERRY, T. W.; BEESON, W. M.; MOHLER, M. T. Effect of monensin on beef cattle performance. **Journal of Animal Science**; 42:761-5, 1976.

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

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

RUSSELL, J. B.; WALLACE, R. J. Energy-yielding and energy-consuming reactions. in: P.N. Hobson, C.S. Stewart (Eds.) **The Rumen Microbial Ecosystem**. 2nd ed. Blackie Academic & Professional, New York, NY; 246–282, 1997.

SARTI, L. M. N.; PACHECO, R. D. L.; MILLEN, D. D.; ARRIGONI, M. D. B.; FOSSA, M. V.; MATSUHARA, A. S.; et al. Evaluation of feeding behavior of young cattle from different genetic groups fed with high concentrate diets with different NDF levels [abstracts]. In: 2007 Joint Annual Meeting; San Antonio. San Antonio/Texas: ASAS. **Journal of Animal Science**; 85:552-3, 2007.

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

SHAHIDI. F. Food applications of chitin and chitosans. **Trend in Food Science and Technology**, 10:37-51, 1999.

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

SKAUGRUD, O; SARGENT, G. Chitin and Chitosan: Crustacen biopolymers with potential. In **Making Profits out of Seafood Wastes**. Ed. S. Keller, pp. 61-69. Alaska: Alaska Sea Grant College Program AK- SG-, 90, 07. 1990.

SOUZA, N.L.G.D.; BRANDÃO, H.M.; OLIVEIRA, L.C. Spectroscopic and thermogravimetric study of chitosan after incubation in bovine rumen. **Journal of Molecular Structure**, v.1005, p.186-191. 2011.

SUDARSHAN, N. R., HOOVER, D. G., KNORR, D. Antibacterial action of chitosan. **Food Biotechnology**, 6: 257–272, 1992.

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

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

WENCELOVA M, VARADYOVA Z, MIHALIKOVA K; KIŠIDAYOVÁ, 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**, v.38, p.:26–33.2014.

WU S. Preparation of water soluble chitosan by hydrolysis with commercial alpha-amylase containing chitosanase activity. **Food Chemistry**, v.128, p. 769–72. 2011.

ZAMBOM, M. A.; ALCALDE, C. R.; SILVA, K. T.; MACEDO, F. A. F.; SANTOS, G. T.; BORGHI, E. L.; BARBOSA, E. D. Ingestão, digestibilidade das rações e produção de leite em cabras Saanen submetidas a diferentes relações volumoso:concentrado na ração. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 6, p. 2505-2514, 2005.

ZEOULA, L. M.; FERELI, F.; PRADO, I. N.; GERON, L. J. V.; CALDAS NETO, S .F.; PRADO, O. P. P.; MAEDA, E. M. Digestibilidade e balanço de nitrogênio com diferentes teores de proteína degradável no rúmen e milho como fonte de amido em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 5, p. 2179- 2186, 2006.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar o efeito da adição de quitosana sobre a digestibilidade *in vitro* dos nutrientes em dietas para ruminantes.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da quitosana na digestibilidade *in vitro* da MS e dos nutrientes em dietas com diferentes relações volumoso:concentrado.

- Avaliar o efeito da quitosana sobre parâmetros de fermentação do líquido ruminal *in vitro* em dietas com diferentes relações volumoso: concentrado.

- Avaliar o efeito da quitosana sobre os parâmetros cinéticos da fermentação ruminal pela técnica de produção de gás das dietas com diferentes relações volumoso:concentrado.

CAPITULO 2

Níveis de quitosana em dietas para ruminantes

Resumo: Como alternativa a substituição de aditivos antibióticos, este estudo objetivou avaliar o efeito da inclusão de níveis de quitosana sobre dietas com diferentes relações volumoso:concentrado. Foram realizados três experimentos em que: o *Experimento 1* avaliou o efeito de níveis de quitosana na digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO), matéria seca (DIVMS), fibra em detergente neutro (DIVFDN) e proteína (DIVPB) em diferentes relações volumoso:concentrado na digestibilidade *in vitro* da MS e nutrientes; o *Experimento 2* avaliou os parâmetros ruminais no líquido ruminal *in vitro* com diferentes relações volumoso:concentrado combinado com níveis de quitosana; e o *Experimento 3* avaliou o efeito de níveis de quitosana nos parâmetros de cinética da degradação feita *in vitro* no sistema de produção de gases com diferentes relações volumoso:concentrado. Como doadores de inóculo ruminal foram utilizados dois bovinos da raça Jersey providos de canula ruminal, com peso médio aproximado de 360 kg, mantidos em piquetes formados por capim Marandu, recebendo somente suplementação mineral. Para a determinação da digestibilidade *in vitro* de nutrientes e dos parâmetros de fermentação *in vitro*, foram utilizados: quatro níveis de quitosana (0, 1625, 3500 e 7500 mg/kg de MS) e cinco relações de volumoso:concentrado (100:0, 65:35, 50:50, 35:65, 20:80); e para o ensaio sobre cinética de fermentação pela técnica de produção de gases foram avaliados cinco níveis de quitosana (0, 400, 800, 1200 e 1600 mg/kg MS) e seis relações volumoso concentrado (100:0; 80:20; 65:35; 50:50; 35:65; 20:80). No *Experimento 1* foi verificado efeito dos fatores principais e da interação entre os níveis de quitosana e as relações V:C na DIVMS e DIVPB. Foi observado efeito apenas dos fatores principais na DIVMO e DIVFDN. Os resultados demonstraram que a quitosana afeta negativamente a digestibilidade da matéria seca com o aumento das doses independente das dietas. No *Experimento 2* foi verificado efeito significativo apenas da relação V:C e do tempo para os valores de pH; efeito da interação do tempo com as relações V:C para as concentrações de amônia ruminal. Corroborando com os dados de digestibilidade, que apresentaram diminuição da DIVPB indicando uma redução na deaminação das dietas, com efeito quadrático decrescente. No *Experimento 3* foi observado efeito significativo da quitosana nos parâmetros A (fração rápida), C (tempo – lag time), D (fração lenta), e A+D (produção cumulativa de gás das frações rápida e lenta); efeito significativo das relações V:C

para os parâmetros A, C, D, E (taxa de produção da fração lenta por hora) e A+D; efeito significativo da interação dos fatores principais para os parâmetros A, C, D, E e A+D. Com a adição crescente de quitosana, aumenta a produção de gás e diminui o tempo de fermentação de dietas com alto concentrado, caracterizando maior eficiência na degradabilidade da dieta confirmando seu potencial uso em dietas para ruminantes. A quitosana altera os parâmetros avaliados mais eficientemente na dose mínima de 1722 mg/kg de MS para todas as dietas.

Palavras-Chave: cinética da fermentação, digestibilidade, fermentação ruminal, parâmetros ruminais.

Chitosan levels in ruminant diets

Abstract: As an alternative to replace antibiotics additives, this study aimed to evaluate the effect of including chitosan levels on diets with different relation forage: concentrate. Three experiments were conducted in which: Experiment 1 evaluated the effect of chitosan levels in vitro digestibility of organic matter (IVOMD), dry matter (DM), neutral detergent fiber (IVNDFD) and protein (DIVPB) in different roughage : focused on in vitro digestibility of DM and nutrients; Experiment 2 evaluated the ruminal parameters in rumen fluid in vitro with different relations forage: concentrate combined with chitosan levels; and Experiment 3 evaluated the effect of chitosan levels in kinetic parameters of degradation made in vitro in gas production system with different relations forage: concentrate. As rumen fluid donors used two from Jersey cows fitted with rumen cannula, with approximate average weight of 360 kg, kept in paddocks consist of grass Marandu, receiving only mineral supplementation. For determining the in vitro digestibility of nutrients and in vitro fermentation parameters were used: four levels of chitosan (0, 1625, 3500 and 7500 mg / kg DM) and five relations forage to concentrate (100: 0, 65:35, 50:50, 35:65, 20:80); and the test for fermentation kinetics for gas production technique were evaluated five levels of chitosan (0, 400, 800, 1200 and 1600 mg / kg DM) and six relations forage concentrate (100: 0; 80:20; 65 : 35; 50:50; 35:65; 20:80). In Experiment 1 was no effect of the major factors and the interaction between the chitosan levels and relations V: C in IVDMD and IVCPD. effect was observed only major factor in IVOMD and IVNDFD. The results showed that chitosan negatively affects the digestibility of dry matter with increasing doses irrespective of the diets. In Experiment 2 was observed significant effect in the relation V C and time for the pH values; time interaction effect with the relations V: C for concentrations of ruminal ammonia. Corroborating the digestibility data, which showed a decrease in IVCPD indicating a reduction in deamination of diets with decreasing quadratic effect. In Experiment 3 was a significant effect of chitosan on the parameters A (fast fraction), C (time - lag time), D (slow fraction), and A + D (cumulative gas production of fast and slow fractions); significant effect relations of V C for parameters A, C, D, E (production rate of the slow fraction per hour), and A + D; significant interaction of the major factors for the parameters A, C, D, E and A + D. With the increasing addition of chitosan increases gas production and reduces the time of fermentation with high concentrate diets, featuring greater efficiency in the diet degradability confirming its potential use in ruminant diets. Chitosan changes the parameters evaluated more efficiently at the lowest dose of 1722 mg / kg DM for all diets.

Keywords: fermentation kinetics, digestibility, ruminal fermentation, ruminal parameters.

1 INTRODUÇÃO

Diante de uma “Era natural”, em que os consumidores buscam ter uma alimentação mais saudável, o mercado se viu obrigado a disponibilizar produtos que atendam às exigências dos consumidores. O uso de aditivos na alimentação dos animais de produção entra em discussão no que se diz respeito a resíduos de substâncias nos produtos finais, o que tem exigido de órgãos governamentais a normatização de regras para o uso de aditivos na alimentação animal.

Em 1999 a União Européia (UE) banuiu o uso de aditivos antibióticos como promotores de crescimento devido preocupações com o aparecimento de resíduos e estirpes de bactérias mais resistentes; e em 2006, proibiu o uso de ionóforos, como a monensina e lasalocida sódica, baseado no “Princípio da Precaução” das autoridades da UE. Portanto, a busca por substâncias ou compostos naturais alternativos que possam ocasionar efeitos similares a esses antibióticos vêm de encontro às necessidades dos produtores e consumidores, especialmente quando os produtos visam a exportação ao mercado comum europeu.

A quitina é um componente dos exoesqueletos de invertebrados (insetos, crustáceos e moluscos) e de paredes celulares de alguns fungos e algas (SENEL et al., 2004) e a partir de sua desacetilação é originada a quitosana, a qual é formada por unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc) unidas por ligações glicosídicas_(1_4), enquanto a quitosana é composta predominantemente por unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN) unidas pelo mesmo tipo de ligação (ROBERTS, 1992).

A quitosana é um polissacarídeo natural que possui características que a enquadram como um produto aceitável devido ser um biopolímero atóxico e biodegradável com grande potencial de aplicações na medicina e na preservação de alimentos e por sua propriedade antimicrobiana (SHAHIDI et al., 1999; JEON et al., 2002) contra bactérias, fungos e leveduras (SUDARSHAN et al., 1992; FANG et al., 1994). O ótimo perfil biológico apresentado pela sua molécula é uma vantagem decorrente de sua flexibilidade química (HEIN et al., 2008; KEAN; THANOU, 2010). Nas últimas décadas o uso deste polímero tem crescido significativamente em função de sua bioatividade e biocompatibilidade, e por ser uma fonte renovável e biodegradável, representando grande oportunidade para a comunidade científica e industrial (BELANCHE et al; 2015).

Goiri et al. (2009a) avaliou a quitosana “*in vitro*”, e indicou sua possível utilização como um aditivo modulador da fermentação ruminal a fim de aperfeiçoar a eficiência alimentar dos animais ruminantes. Contudo, por seu estudo ser ainda muito recente, há uma necessidade de se explorar mais a fundo sua ação no ecossistema ruminal em situações

diferentes. Por isso, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de níveis de quitosana como aditivo modulador da fermentação ruminal na digestibilidade *in vitro* de nutrientes em dietas com diferentes proporções volumoso: concentrado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Três experimentos foram realizados com a finalidade de avaliar o efeito dos níveis de quitosana em diferentes relações volumoso:concentrado. Os experimentos (1, 2) foram conduzidos nas dependências do Laboratório de Digestibilidade *in vitro* e de Nutrição Animal da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul; e o terceiro no Laboratório de Nutrição Aplicada da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

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.

Como doadores de líquido ruminal 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* (syn *Brachiaria*) recebendo suplementação mineral. A quitosana (>85% de desacetilação, viscosidade: 50 cPs a 20°C, LVt 31, torque de 11,7%) utilizada era provinda da – Polymar ® - Ceará; 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%) (Tabela 1).

Tabela 1: Teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN) das dietas.

Relação V:C ⁽¹⁾	MS%	PB	FDN
		%MS	
100:0	89,53	9,72	76,17
80:20	88,94	12,55	63,71
65:35	88,34	14,67	54,35
50:50	87,79	16,80	44,99
35:65	87,24	18,92	35,65
20:80	86,67	21,05	26,29

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

Experimento 1

Foi utilizado em delineamento em blocos ao acaso em um ensaio de parcelas subdivididas, em que as incubadoras representavam os blocos, os jarros as parcelas e as cinco relações volumoso:concentrado (100:0, 65:35, 50:50, 35:65, 20:80) representaram as

subparcelas. Cada jarro continha uma dose de quitosana (0, 1625, 3500 ou 7500 mg/Kg de MS) e todas as relações volumoso:concentrado em 4 repetições de cada, totalizando 20 amostras por jarro

Foram realizadas análises para determinação de matéria seca (método 930.15; AOAC, 2000); 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 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 filter bags, que é uma técnica que se baseia na inoculação de substratos armazenados em saquinhos filtrantes (filter bags) e possibilita avaliar grande quantidade de amostras simultaneamente.

O preparo dos filter bags (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 filter bags em acetona por três a cinco minutos para remover um surfactante que inibe a digestão microbiana, secagem completamente dos filter bags; pesagem de cada filter bags e registro do peso; logo após a balança analítica foi zerada e foram pesados 0,5 g de amostra diretamente no filter bag; todos os filter bags 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 filter bag 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 inóculo/ 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 (KH_2PO_4 , anidro) (10,0 g/L), sulfato de magnésio ($\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (0,5 g/L), cloreto de sódio (NaCl) (0,5 g/L), cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (0,1 g/L), Uréia (0,5 g/L); Solução B – carbonato de sódio (Na_2CO_3) (15,0 g/100ml) e sulfeto de sódio ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) (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 CO_2 durante trinta segundos (não permitindo que o CO_2 forme bolhas no inóculo tamponado) e a tampa foi fechada. Este processo se repetiu para todos os jarros. Cada jarro continha todas as relações volumoso:concentrado em quatro repetições, dois saquinhos brancos e uma dose específica de quitosana.

A incubação consistiu em dois estágios sendo que o primeiro é descrito como fase fermentativa, o qual simula a digestão que ocorre no rúmen, com duração de 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, simulando 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 4 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 4 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:

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

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

Experimento 2

Foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4x5 considerando os quatro níveis de quitosana combinados nas relações volumoso:concentrado, em que os níveis de quitosana e as relações de volumoso concentrado foram os mesmos descritos no *Experimento 1*.

As incubações *in vitro* foram executadas isoladamente, em que cada jarro recebeu uma combinação (relação volumoso concentrado + nível de quitosana), para determinação dos parâmetros ruminais: pH, Nitrogênio amoniacal ruminal (NAR). Foram pesados 0,5g de cada relação volumoso:concentrado, em que cada jarro recebia uma relação e uma dose de quitosana. O total de solução utilizada na incubação foi calculado com base na quantidade total de amostras a ser coletadas ao longo do tempo.

Para obtenção das amostras, foi realizada uma adaptação nas tampas dos jarros (Anexo 1) com válvulas e um sistema de três vias para permitir a coleta do líquido ruminal tamponado, assim como uma válvula tipo Büssen que permitia a liberação dos gases produzidos durante a fermentação (DIAZ, 2013)

As coletas foram realizadas logo após a incubação (hora “0”), respeitando um intervalo de 2 horas entre as coletas, totalizando seis coletas (0, 2, 4, 6, 8 e 10 horas). As coletas foram em duplicata, em que cada alíquota continha 40 ml de solução oriunda dos jarros. Imediatamente após a coleta foram determinados os valores de pH utilizando potenciômetro pH em uma alíquota. Na segunda alíquota (40 ml) foi colocado 1 mL de ácido clorídrico (HCl) 1:1, interrompendo o processo fermentativo e reduzindo o pH, evitando assim a volatilização do NAR. A determinação dos teores de NAR foram realizadas sem digestão ácida e utilizando-se como base para destilação o hidróxido de potássio (2N), após centrifugação prévia da amostra a 1.000 x g, por 15 minutos (DETMANN et al., 2012)

Experimento 3

A partir dos resultados obtidos nos ensaios anteriores foi determinada a dose de 1600 mg/kg de MS como sendo o limite a ser utilizado. Com isso foi conduzido um experimento em um delineamento inteiramente ao acaso com arranjo fatorial 6x5, considerando 6 relações volumoso:concentrado (100:0, 80:20, 65:35, 50:50, 35:65, 20:80), 5 doses de quitosana (0, 400, 800, 1200, 1600 mg/kg de MS).

Para a determinação da produção total de gás e os parâmetros da cinética da fermentação ruminal, foi utilizada a técnica automática *in vitro*, utilizando-se frascos com capacidade de 250 mL, com adição de 1,0 grama de amostra das relações volumoso:concentrado em duplicata, 100 mL da solução tampão, 25 mL de inóculo ruminal e purgados com CO₂. Para cada incubação foram utilizados dois frascos como brancos, contendo apenas inóculo ruminal e solução tampão, com o objetivo de ajustar os valores de pressão.

O aumento da pressão produzido dentro dos frascos durante a incubação foi mensurado em libras por polegada quadrada (psi) utilizando sistema automático RF: Gás Production System® (ANKOM). A pressão de gás dentro dos frascos foi registrada por sensores de pressão localizados nas tampas dos frascos ou módulos, os quais transferiram as informações de cada frasco por meio de uma base coordenadora conectada a um computador, a intervalos de 5 minutos, totalizando 216 leituras durante 48 horas de incubação.

Os dados obtidos de produção de gás foram mensurados em psi e transformados para moles de gás por meio da equação do gás ideal:

$$n = \frac{VP}{RT}$$

Em que, n = quantidade de gás em moles; V = volume de gás ocupado em litros; P = pressão em pascal (KPa); T = temperatura em Kelvin (°K); R = constante dos gases (8.314472 kPa·L· K⁻¹ mol⁻¹).

Logo após, os moles foram convertido em mL de gás produzido em condições normais de temperatura e pressão (STP) utilizando a seguinte equação:

$$V = \frac{nRT}{P}$$

São utilizados os seguintes valores de referência das condições de STP: 273,15°K (0°C) e 101 325 Pa (1 atm = 760 mmHg).

Para calcular a produção de gás em mL foi utilizada a pressão corrigida dos frascos, a pressão atmosférica da região (96,538 kPa) e a pressão atmosférica em condições normais (101,325 kPa), sendo este o valor de P.

Na determinação da extensão e a taxa de produção de gás decorrente da degradação do alimento, utilizou um modelo logístico bicompartimental exponencial proposto por Pell & Schofield et al. (1994):

$$y = \left[\frac{A}{\{1 + \text{Exp}.[2+4*B*(C-T)]\}} + \frac{D}{\{1 + \text{Exp}.[2+4*E*(C-T)]\}} \right]$$

Sendo, y = Volume total de gás no tempo T (extensão da degradação); A e D = volume de gás (mL) das frações de degradação rápida (açúcares solúveis e amido) e lenta digestão (celulose, hemicelulose), respectivamente; B e E = taxas de degradações das frações de digestão rápida e lenta (/h), respectivamente; e C = tempo de colonização das bactérias.

Análises estatísticas

Os dados relacionados às variáveis de digestibilidade *in vitro* da MS, MO, FDN e PB obtidos após a realização do *Experimento 1* foram ajustados por meio de análise de covariância para o efeito de incubação. Após os ajustes os dados foram submetidos a análises exploratórias eliminares para verificação de presença de dados discrepantes (outliers) e a premissas bases de análise de variância (linearidade, homocedasticidade e normalidade dos erros).

Após as análises preliminares, foram realizadas as análises de variância seguindo o modelo estatístico:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ik} + \varepsilon_{ijk},$$

para $i = 1, \dots, a$; $j = 1, \dots, b$; $k = 1, \dots, r$, em que y_{ijk} = variáveis respostas estudadas (MS, MO, FDN e PB), μ = média geral da variável resposta, α_i = efeito do i -ésimo nível da quitosana, β_j = efeito do j -ésimo bloco (efeito da incubação), ε_{ij} = efeito do erro associado à parcela (ij), γ_k = efeito do k -ésima relação volumoso:concentrado, $(\alpha\beta)_{ik}$ = efeito da interação do i -ésimo nível de quitosana com a k -ésima relação volumoso:concentrado, ε_{ijk} = efeito do erro associado à sub-parcela (ijk). Para as análises de variância foi utilizado o procedimento `psub2.dbc` do pacote `ExpDes.pt` (Ferreira et al, 2013) no ambiente computacional R (R Core Team, 2014).

Os dados referentes aos parâmetros ruminiais (pH e Nitrogênio amoniacal ruminal) obtidos após a realização do *Experimento 2*, foram coletados para cada unidade experimental,

seguindo uma sequência de medidas ao longo do tempo. No caso deste estudo, verificou-se à pressuposição do uso da MANOVA por meio do teste de esfericidade de Mauchly, em que se a matriz de covariâncias atende à condição H-F (teste de esfericidade não-significativo), conclui-se que a matriz de covariâncias é do tipo esférica podendo-se o experimento ser analisado na forma de parcela subdividida; caso o teste resultar significativo, recomenda-se o uso da análise multivariada de perfis. Assim adotou-se o seguinte modelo estatístico:

$$y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \gamma_k + \omega_l + (\alpha\omega)_{il} + (\beta\omega)_{jl} + (\alpha\beta\omega)_{ijl} + \varepsilon_{ijkl},$$

para $i = 1, \dots, a$; $j = 1, \dots, b$; $k = 1, \dots, n_i$; $l = 1, \dots, t$, em que y_{ijkl} = variáveis respostas estudadas (pH e Nitrogênio amoniacal ruminal), μ = média geral da variável resposta, α_i = efeito do i -ésimo nível da quitosana, β_j = efeito do j -ésimo nível da relação volumoso:concentrado, $(\alpha\beta)_{ij}$ = efeito da interação do i -ésimo nível de quitosana com o j -ésimo nível de relação volumoso:concentrado, γ_k = efeito do erro associado às parcelas, ω_l = efeito do l -ésimo tempo, $(\alpha\omega)_{il}$ = efeito da interação do i -ésimo nível de quitosana com o l -ésimo tempo, $(\beta\omega)_{jl}$ = efeito da interação do j -ésimo nível da relação volumoso:concentrado com o l -ésimo tempo, $(\alpha\beta\omega)_{ijl}$ = efeito da interação tripla do i -ésimo nível de quitosana com o j -ésimo nível da relação volumoso:concentrado com o l -ésimo tempo, ε_{ijkl} = efeito do erro associado à observação.

A estatística utilizada para testar a esfericidade do modelo da matriz foi a do teste W de Mauchly (1940), bem como as correções do número de graus de liberdade, GG de Geisser e Greenhouse (1958) e HF Huynh e Feldt (1970). As estatísticas para testar a hipótese de ausência dos efeitos dos níveis de quitosana, níveis da relação volumoso:concentrado, tempo e suas interações, para o caso multivariado foram Lambda de Wilks, Traço de Pillai, Traço de Lawley-Hotelling e Maior Raiz característica de Roy. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do procedimento Anova do pacote computacional car (FOX and WEISBERG, 2011), no ambiente computacional R (R Core Team, 2014), em que os parâmetros `idata` e `idesign` foram utilizados para especificar o fator tempo no modelo.

Os dados obtidos do *Experimento 3*, referente aos parâmetros cinéticos da fermentação ruminal, foram submetidos a análises preliminares, seguido pela realização das análises de variância seguindo o modelo estatístico:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ij},$$

Em que: y_{ijk} = variáveis respostas estudadas (parâmetros cinéticos da fermentação ruminal), μ = média geral da variável resposta, α_i = efeito do i -ésimo nível da quitosana, β_j = efeito da j -ésima relação volumoso:concentrado, $(\alpha\beta)_{ij}$ = efeito da interação do i -ésimo nível de quitosana com a j -ésima relação volumoso:concentrado, ε_{ij} = efeito do erro associado à

sub-parcela (ij). Para as análises de variância foi utilizado o procedimento fat2.dic do pacote ExpDes.pt (Ferreira et al, 2013) no ambiente computacional R (R Core Team, 2014).

3 RESULTADOS

Após análise de variância foi verificado efeito significativo ($P < 0,001$) para níveis de quitosana ($P < 0,01$), volumoso:concentrado ($P < 0,001$) e interação (níveis de quitosana x relação volumoso:concentrado) sobre a DIVMS (Tabela 2 e Figura 2) e DIVPB (Tabela 3 e Figura 3). A partir desses resultados foi realizado o desdobramento da interação para o ajuste dos modelos polinomiais de regressão dos níveis de quitosana dentro de cada relação volumoso:concentrado.

Tabela 2: Médias (\pm EPM) dos coeficientes de digestibilidade da matéria seca (DIVMS) dentro de cada relação volumoso:concentrado (V:C).

Variável	V:C	Níveis de Quitosana mg/kg de MS				P-valor		
		0	1625	3500	7500	Quitosana	V:C	Interação
DIVMS	100:0 ¹	58,92 \pm 1,74	60,27 \pm 2,05	58,37 \pm 2,56	46,29 \pm 18,03	<0,01	<0,001	<0,001
	65:35 ²	72,15 \pm 1,86	73,20 \pm 1,21	72,33 \pm 3,76	64,17 \pm 6,17			
	50:50 ³	78,07 \pm 0,55	77,77 \pm 0,74	75,43 \pm 0,41	70,90 \pm 4,76			
	35:65 ⁴	83,06 \pm 0,49	82,74 \pm 0,47	79,05 \pm 7,8	76,80 \pm 4,03			
	20:80 ⁵	89,04 \pm 0,36	86,63 \pm 0,99	84,38 \pm 0,84	81,66 \pm 2,41			

$$^1\hat{y} = 58,71467637 + 0,00123149 * X - 0,00000039 * X^2; R^2 = 0,99$$

$$^2\hat{y} = 71,85748484 + 0,00104553 * X - 0,00000028 * X^2; R^2 = 0,99$$

$$^3\hat{y} = 78,40809850 - 0,00100893 * X; R^2 = 0,97$$

$$^4\hat{y} = 82,92309088 - 0,00089746 * X; R^2 = 0,92$$

$$^5\hat{y} = 88,12932974 - 0,00095805 * X; R^2 = 0,96$$

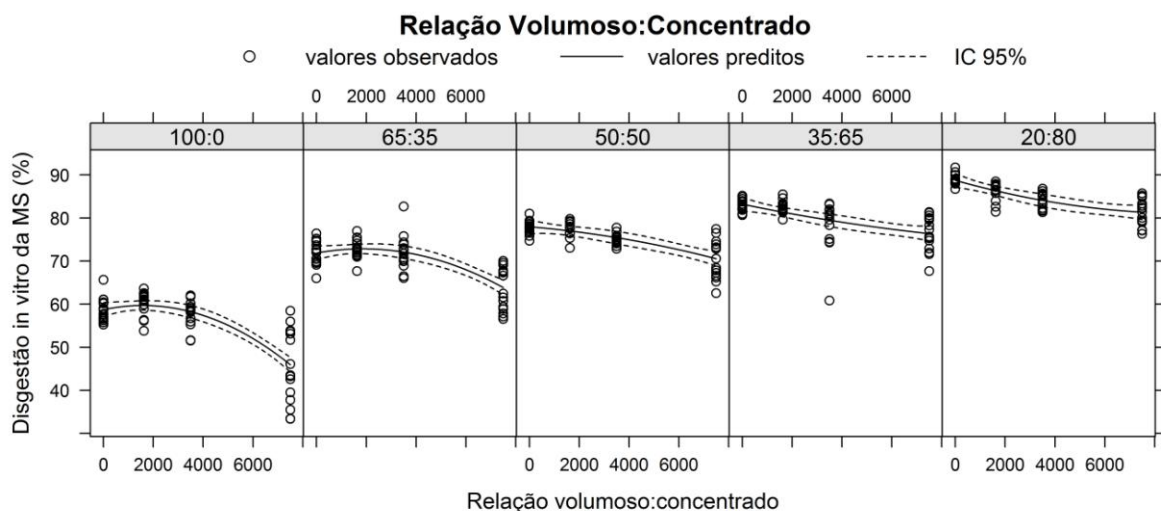


Figura 2. Efeito da quitosana na digestibilidade *in vitro* da matéria seca de cada relação volumoso:concentrado.

Foi verificado efeito quadrático da DIVMS nas relações volumoso:concentrado 100:0 e 65:35, com ponto máximo de digestibilidade de 59,69 e 72,83, nos níveis de 1578 e 1867 mg/kg de MS de quitosana, respectivamente. Nas relações 50:50, 35:65 e 20:80 foi verificado efeito linear decrescente na DIVMS.

Tabela 3: Médias (\pm EPM) dos coeficientes de digestibilidade da proteína (DIVPB).

Variável	V:C	Níveis de Quitosana mg/kg de MS				P-valores		
		0	1625	3500	7500	Quit.	V:C	Int.
DIVPB	100:0 ¹	47,44 \pm 18,39	41,1 \pm 29,28	41,56 \pm 2,56	37,41 \pm 16,91			
	65:35 ²	59,63 \pm 27,16	52,53 \pm 26,55	48,37 \pm 17,36	51,43 \pm 20,24			
	50:50 ³	53,93 \pm 18,64	42,21 \pm 2,72	35,21 \pm 6,93	50,53 \pm 11,04	<0,01	<0,001	<0,001
	35:65 ⁴	24,68 \pm 1,25	28,65 \pm 34,86	35,51 \pm 16,34	60,75 \pm 36,69			
	20:80 ⁵	48,93 \pm 13,61	30,57 \pm 10,07	27,98 \pm 8,07	35,61 \pm 31,12			

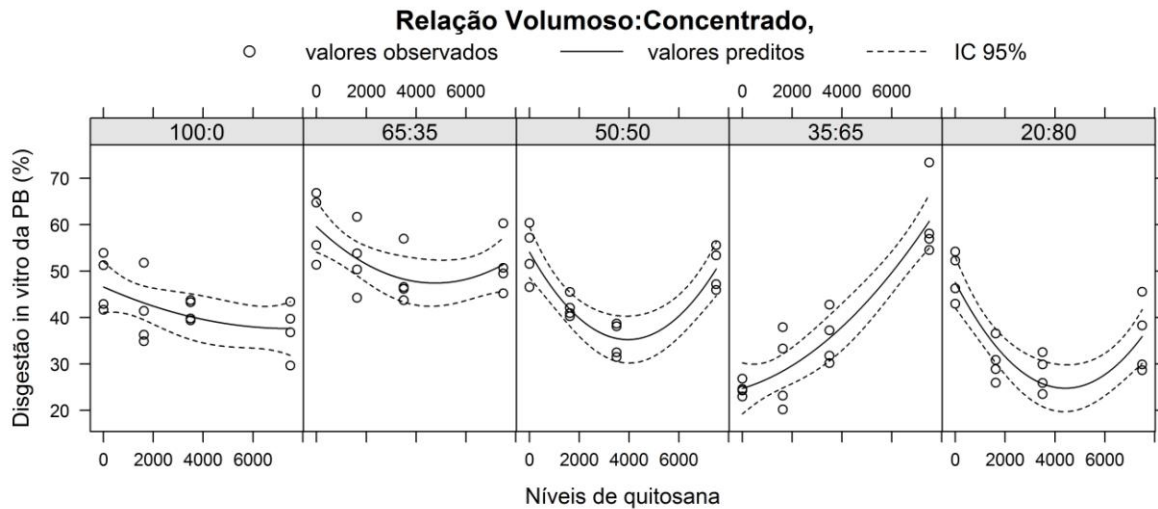
$$^1\hat{y} = 41,88;$$

$$^2\hat{y} = 52,99;$$

$$^3\hat{y} = 54,10937019 - 0,00954780*X + 0,00000121*X^2; R^2 = 0,99;$$

$$^4\hat{y} = 24,74430443 + 0,00162384*X + 0,00000042*X^2; R^2 = 0,99;$$

$$^5\hat{y} = 47,55678807 - 0,01033211*X + 0,00000117*X^2; R^2 = 0,93.$$

**Figura 3.** Efeito da quitosana na digestibilidade *in vitro* da proteína de cada relação volumoso:concentrado.

Foi verificado efeito quadrático da DIVPB nas relações volumoso:concentrado 50:50, 35:65 e 20:80, com ponto mínimo de digestibilidade de 35,27, 29,45, 24,75, nos níveis de 3945, 1933 e 4415 mg/kg de MS de quitosana, respectivamente. Nas relações 100:0 e 65:35 as médias de digestibilidade são estatisticamente iguais.

Não foi verificado efeito de interação, porém, foi observado efeito dos fatores principais nas DIVMO e DIVFDN, em que a relação volumoso:concentrado ($P < 0,001$) apresentou efeito linear crescente e efeito quadrático, respectivamente (Tabela 4 e Tabela 5); e os níveis de quitosana, na DIVMO ($P = 0,0473$) e DIVFDN ($P < 0,001$), apresentaram efeito quadrático.

Tabela 4: Médias (\pm EPM) dos coeficientes de digestibilidade da matéria orgânica (DIVMO) dentro de cada relação volumoso:concentrado (V:C).

Variável	V:C ²	Níveis de Quitosana mg/kg de MS ¹				P-valor		
		0	1625	3500	7500	Quitosana	V:C	Interação
DIVMO	100:0	54,31 \pm 3,24	55,07 \pm 1,59	59,01 \pm 6,65	52,53 \pm 11,26	0,0473	<0,001	0,3823
	65:35	70,97 \pm 13,21	73,19 \pm 2,77	74,99 \pm 2,58	70,28 \pm 4,08			
	50:50	78,83 \pm 6,78	78,29 \pm 5,24	76,98 \pm 2,81	75,6 \pm 1,91			
	35:65	83,94 \pm 6,95	85,02 \pm 0,46	84,13 \pm 1,56	82,27 \pm 0,41			
	20:80	90,47 \pm 1,06	89,23 \pm 2,73	88,33 \pm 2,71	87,64 \pm 1,57			

¹ $\hat{y} = 75,59817090 + 0,00071393 * X - 0,00000013 * X^2$; R² = 0,98
² $\hat{y} = 56,1622756 + 0,4216022 * X$; R² = 0,99

Tabela 5: Médias (\pm EPM) dos coeficientes de digestibilidade médios da fibra em detergente neutro (DIVFDN) dentro de cada relação volumoso:concentrado (V:C).

Variável	V:C ²	Níveis de Quitosana mg/kg de MS ¹				P-valor		
		0	1625	3500	7500	Quitosana	V:C	Interação
DIVFDN	100:0	62,23 \pm 1,91	63,3 \pm 3,32	64,56 \pm 4,25	55,54 \pm 8,22	<0,001	<0,001	0,1711
	65:35	60,45 \pm 7,14	64,18 \pm 12,14	62,43 \pm 3,22	49,52 \pm 6,01			
	50:50	59,81 \pm 10,64	56,92 \pm 3,26	58,53 \pm 0,29	44,34 \pm 16,99			
	35:65	58,85 \pm 2,26	63,79 \pm 7,66	57,04 \pm 3,08	48,6 \pm 7,95			
	20:80	64,65 \pm 19,93	61,13 \pm 0,32	59,64 \pm 8,89	47,1 \pm 8,53			

¹ $\hat{y} = 61,18368296 + 0,00100833 * X - 0,00000035 * X^2$; R² = 0,99
² $\hat{y} = 61,69264059 - 0,17956431 * X + 0,00163698 * X^2$; R² = 0,71

A partir da análise dos valores de pH ruminal e N-NH₃ obtidos do *Experimento 2*, obteve-se os resultados apresentados na Tabela 6, constatando que o teste de Mauchly rejeitou a hipótese de esferecidade, o que implica que a matriz de covariâncias do erro experimental não atende à condição proposta por Huynh-Feldt.

Tabela 6. Resultado do teste de esferecidade de Mauchly para os dados de pH e N-NH₃.

Parâmetros	Graus de liberdade <i>f</i>	Crítério de Mauchly (W)	Estatística de Qui-Quadrado χ^2	Valor - p
Ph	14	0.0009986	263.23987	<0,0001
N-NH ₃	14	0.1152419	82.323491	<0,0001

Pelos testes multivariados (Tabela 7), testou-se a hipótese nula de perfis horizontais, ou seja, que testa o efeito do fator tempo e interações (tempo x relação V:C, tempo x níveis de quitosana, tempo x relação V:C x níveis de quitosana). Para a fonte de variação que foi testada, foi obtida uma matriz *H* de somas de quadrado e produtos, além da matriz *E* de soma de quadrados e produtos referentes a erros do modelo. As estatísticas de teste foram obtidas a partir das raízes latentes da matriz HE^{-1} .

Tabela 7. Resultado da análise multivariada das variáveis pH e N-NH₃, considerando o delineamento inteiramente casualizado e testando os efeitos de tempo, relação volumoso:concentrado (V:C), níveis de quitosana (N.Q) e V.C x N.Q.

Estatística	Valores			
	pH	Tempo	Tempo*V:C	Tempo*N.Q
Lambda de Wilks	0.1128 ^{***}	0.2968 ^{***}	0.5772 ^{ns}	0.3466 ^{ns}
Traço de Pillai	0.8872 ^{***}	0.9881 ^{***}	0.4821 ^{ns}	0.9310 ^{ns}
Traço de Hotelling – Lawley	7.8624 ^{***}	1.5325 ^{**}	0.6310 ^{ns}	1.2159 ^{ns}
Raiz máxima de Roy	7.8624 ^{***}	0.7991 ^{***}	0.3752 [*]	0.4427 ^{ns}
N-NH₃				
Lambda de Wilks	0.0761 ^{***}	0.5382 ^{ns}	0.6592 ^{ns}	0.3249 ^{ns}
Traço de Pillai	0.9238 ^{***}	0.5337 ^{ns}	0.3798 ^{ns}	0.9410 ^{ns}
Traço de Hotelling – Lawley	12.1329 ^{***}	0.7288 ^{ns}	0.4588 ^{ns}	1.3722 ^{ns}
Raiz máxima de Roy	12.1329 ^{***}	0.4944 ^{**}	0.2386 ^{ns}	0.6983 [*]

ns: não significativo; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Foi observado na Tabela 7, para o parâmetro pH, que a hipótese que testa o efeito do tempo e tempo*V:C, foram ambas, rejeitadas por todos os testes, a 1% de probabilidade, e no tempo*N.Q somente foi rejeitado pelo teste de Raiz máxima de Roy; já para o parâmetro N-NH₃, somente a hipótese que testa o tempo foi rejeitada por todos os testes, sendo que o tempo*V:C e tempo*V:C*N.Q somente foram rejeitados pela Raiz máxima de Roy. Essa rejeição indica, pela hipótese de paralelismo, que pelo menos uma combinação de relação V:C e tempo interage de forma dependente para os parâmetros.

Foi verificado efeito significativo do tempo (P<0,001) e do fator principal relação V:C (P<0,01) para os dados de pH ruminal, com isso, procedeu-se a comparação das médias pelo teste de Tukey (5% probabilidade) das relações V:C dentro de cada tempo (Tabela 8).

Tabela 8. Médias do efeito da relação V:C nos valores de pH ruminal.

Relação V:C	Tempo (h)					
	0	2	4	6	8	10
100:0	6.525	6.602	6.602	6.667	6.715	6.749
65:35	6.813	6.820	6.820	6.892	6.925	6.960
50:50	6.690	6.751	6.751	6.810	6.835	6.966
35:65	6.713	6.729	6.729	6.794	6.880	6.926
20:80	6.715	6.757	6.757	6.803	6.831	6.859

Foi verificado efeito significativo para o tempo (P<0,001) e a interação do tempo*V:C (P<0,01) para os dados de N-NH₃. A partir desses resultados foi realizado o desdobramento da interação para o ajuste dos modelos polinomiais de regressão das relações V:C dentro de cada tempo. As curvas polinomiais ajustadas para cada relação V:C foram as seguintes:

$$(100:0) \hat{y} = 5,4957 + 3,3544*T - 0,2245*T^2; R^2 = 0,95;$$

$$(65:35) \hat{y} = 4,8816 + 3,1802*T - 0,2261*T^2; R^2 = 0,94;$$

$$(50:50) \hat{y} = 3,6658 + 1,5866*T - 0,0836*T^2; R^2 = 0,95;$$

$$(35:65) \hat{y} = 3,6672 + 2,5464*T - 0,1725*T^2; R^2 = 0,93;$$

$$(20:80) \hat{y} = 6,2453 + 3,7786*T - 0,2660*T^2; R^2 = 0,83.$$

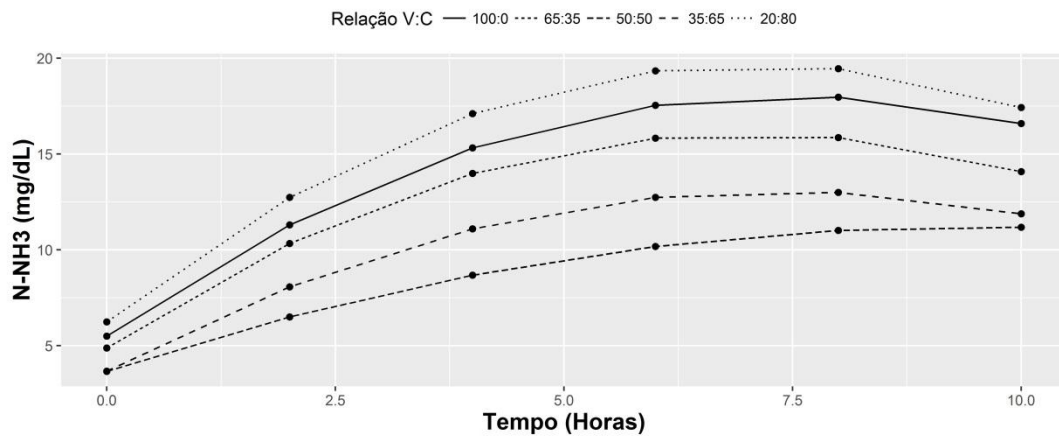


Figura 4. Valores médios de N-NH₃ (mg/dL) do líquido ruminal da digestibilidade de diferentes relações V:C no tempo.

As concentrações de amônia ruminal apresentaram efeito quadrático para todas as relações V:C, aumentado a partir de duas horas após a incubação.

Na Tabela 9 são apresentadas as médias dos parâmetros cinéticos da fermentação ruminal, obtidos a partir do *Experimento 3*, em que realizou-se a avaliação da produção de gás de dietas com diferentes relações V:C combinadas a níveis crescentes de quitosana.

Foi verificado efeito significativo dos níveis de quitosana ($P < 0,001$) para os parâmetros A, C, D e A+D; da relação V:C ($P < 0,001$) para os parâmetros A, C, D, E ($P < 0,05$) e A+D; e da interação dos fatores principais ($P < 0,001$) para os parâmetros A, C, D, E e A+D.

Tabela 9. Médias (\pm EPM) dos parâmetros cinéticos da fermentação ruminal de dietas com diferentes relações volumoso:concentrado (V:C) e níveis crescentes de quitosana.

Relação V:C	Níveis de quitosana mg/kg de MS					P-valores		
	0	400	800	1200	1600	Quitosana	V:C	Interação
Parâmetro A – Produção de gás fração da rápida (mL/100mg de MS)								
100:0	1,06 \pm 0,001	0,54 \pm 0,1	0,34 \pm 0,11	1,42 \pm 0,01	2,45 \pm 0,03			
80:20	0,78 \pm 0,06	0,61 \pm 0,05	0,33 \pm 0,11	2,17 \pm 0,32	0,65 \pm 0,04			
65:35 ¹	0,33 \pm 0,11	4,16 \pm 4,1	1,34 \pm 0,13	2,03 \pm 1,93	0,74 \pm 0,1	<0,001	<0,001	<0,001
50:50 ²	2,76 \pm 5,1	7,61 \pm 13,4	1,83 \pm 0,66	2,08 \pm 0,01	1,7 \pm 0,8			
35:65	2,64 \pm 2,35	1,97 \pm 1,6	1,53 \pm 0,1	1,6 \pm 1,9	1,97 \pm 0,003			
20:80 ³	4,33 \pm 4,5	5,1 \pm 2,43	0,64 \pm 0,12	2,78 \pm 3,32	5,84 \pm 15,01			
Parâmetro B – Taxa de produção da fração A (h⁻¹)								
100:0	0,71 \pm 0,02	0,66 \pm 0,09	0,63 \pm 0,08	0,66 \pm 0,03	0,39 \pm 0,04			
80:20	0,74 \pm 0,06	0,99 \pm 0	0,76 \pm 0,03	0,54 \pm 0,04	0,98 \pm 0			
65:35	0,65 \pm 0,09	0,57 \pm 0,8	0,87 \pm 0,01	0,5 \pm 0,07	0,67 \pm 0,09	0,1309	0,1973	0,7599
50:50	0,49 \pm 0,06	0,66 \pm 0,1	0,7 \pm 0,08	0,62 \pm 0,05	0,58 \pm 0,08			
35:65	0,7 \pm 0,06	0,72 \pm 0,06	0,82 \pm 0,02	0,53 \pm 0,06	0,87 \pm 0,003			
20:80	0,68 \pm 0,07	0,46 \pm 0,07	0,84 \pm 0,05	0,4 \pm 0,08	0,61 \pm 0,08			
Parâmetro C – Lag time (horas)								
100:0 ¹	5,04 \pm 0,003	4,25 \pm 12,03	9,66 \pm 3,36	4,82 \pm 0,01	5,8 \pm 0,05			
80:20 ²	4,5 \pm 1,5	7,44 \pm 0,11	11,66 \pm 0,11	6,53 \pm 0,06	7,34 \pm 0,09			
65:35 ³	8 \pm 6,36	0,86 \pm 0,02	6,44 \pm 3,65	4,08 \pm 0,025	2,14 \pm 0,11	<0,001	<0,001	<0,001
50:50 ⁴	10,66 \pm 0,76	0,75 \pm 0,02	0,63 \pm 0,034	4,11 \pm 1,68	9,66 \pm 3,38			
35:65 ⁵	3,5 \pm 0,29	3,61 \pm 5,23	6,02 \pm 0,19	6,19 \pm 6,91	0,57 \pm 0,05			
20:80 ⁶	5 \pm 2,79	0,34 \pm 0,1	9,65 \pm 3,36	4,59 \pm 0,13	2,63 \pm 2,4			
Parâmetro D – Produção de gás da fração lenta (mL/100mg de MS)								
100:0 ¹	5,5 \pm 0,001	3,76 \pm 0,81	4,08 \pm 1,19	7,52 \pm 0,01	7,37 \pm 0,02			
80:20	4,92 \pm 0,35	6,71 \pm 3,19	5,93 \pm 1,18	5,69 \pm 0,24	8,88 \pm 6,34			
65:35	4,04 \pm 0,2	4,6 \pm 0,39	2,53 \pm 0,79	3,84 \pm 2,01	5,74 \pm 0,06	<0,001	<0,001	<0,001
50:50	5,41 \pm 4,84	1,5 \pm 0,56	2 \pm 0,79	4,07 \pm 1,52	2,48 \pm 1,01			
35:65 ²	3,77 \pm 2,1	6,8 \pm 4,19	7,13 \pm 3,51	9,35 \pm 5,13	6,5 \pm 0,003			
20:80 ³	6,03 \pm 17,72	3,7 \pm 1,57	8,38 \pm 4,86	4,32 \pm 3	11,31 \pm 9,83			
Parâmetro E - Taxa de produção da fração D (h⁻¹)								
100:0	0,08 \pm 0	0,04 \pm 0	0,06 \pm 0	0,06 \pm 0	0,04 \pm 0			
80:20	0,05 \pm 0,002	0,02 \pm 0	0,02 \pm 0	0,05 \pm 0	0,02 \pm 0			
65:35	0,04 \pm 0	0,13 \pm 0	0,05 \pm 0,001	0,11 \pm 0	0,09 \pm 0	0,5469	0,0132	0,0019
50:50 ¹	0,03 \pm 0	0,06 \pm 0,002	0,18 \pm 0,04	0,04 \pm 0	0,02 \pm 0			
35:65	0,09 \pm 0,001	0,03 \pm 0	0,02 \pm 0	0,04 \pm 0	0,04 \pm 0			
20:80	0,02 \pm 0	0,05 \pm 0,001	0,02 \pm 0	0,07 \pm 0,001	0,02 \pm 0			
Produção cumulativa (A + D) de gases								
100:0 ¹	6,56 \pm 0	4,31 \pm 0,52	4,42 \pm 1,06	8,94 \pm 0	9,82 \pm 0,003			
80:20 ²	5,7 \pm 0,22	7,32 \pm 2,47	6,26 \pm 0,57	7,86 \pm 0,07	9,53 \pm 5,77			
65:35	4,38 \pm 0,06	8,76 \pm 5,57	3,88 \pm 1,36	5,87 \pm 0,001	6,48 \pm 0,001	<0,001	<0,001	<0,001
50:50 ³	8,17 \pm 0,022	9,10 \pm 17,29	3,83 \pm 0,66	6,15 \pm 1,37	4,17 \pm 0,02			
35:65 ⁴	6,4 \pm 0,02	8,77 \pm 5,03	8,66 \pm 3,7	10,95 \pm 5,97	8,47 \pm 0			
20:80 ⁵	10,36 \pm 5,1	8,8 \pm 0,64	9,02 \pm 3,57	7,1 \pm 0,01	17,16 \pm 0,55			
Equações de regressão:					Parâmetro D:			
Parâmetro A:					¹ \hat{y} = 4,14 + 1,87*X; R ² = 0,45;			
¹ \hat{y} = 1,02 + 4,48*X - 3,01*X ² ; R ² = 0,38;					² \hat{y} = 5,103 + 2,006*X; R ² = 0,41;			
² \hat{y} = 4,73 - 1,91*X; R ² = 0,23;					³ \hat{y} = 4,51 + 2,79*X; R ² = 0,32;			
³ \hat{y} = 5,19 - 7,8*X + 4,99*X ² ; R ² = 0,52;					Parâmetro E:			
Parâmetro C:					¹ \hat{y} = 0,0213 + 0,252*X - 0,164*X ² ; R ² = 0,54;			
¹ \hat{y} = 4,53 + 5,32*X - 2,99*X ² ; R ² = 0,19;					Produção cumulativa (A+D):			
² \hat{y} = 4,59 + 10,93*X - 6,08*X ² ; R ² = 0,57;					¹ \hat{y} = 6,10 - 4,83*X + 4,76*X ² ; R ² = 0,80;			
³ \hat{y} = 6,00 - 2,12*X; R ² = 0,21;					² \hat{y} = 5,69 + 2,05*X; R ² = 0,73;			
⁴ \hat{y} = 9,83 - 24,34*X + 15,42*X ² ; R ² = 0,93;					³ \hat{y} = 8,47 - 2,74*X; R ² = 0,55;			
⁵ \hat{y} = 2,67 + 8,97*X - 6,12*X ² ; R ² = 0,69;					⁴ \hat{y} = 6,35 + 6,78*X - 3,25*X ² ; R ² = 0,75;			
⁶ \hat{y} = 3,26 + 6,29*X - 4,01*X ² ; R ² = 0,12;					⁵ \hat{y} = 11,12 - 12,1*X + 9,42*X ² ; R ² = 0,75.			

4 DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que a quitosana afeta negativamente a digestibilidade da matéria seca das dietas à medida que aumentam as doses, independente da relação volumoso concentrado. Dietas compostas exclusivamente de volumoso tendem a ter uma menor digestibilidade da MS com o uso da quitosana, comparado as dietas com maior proporção de concentrado.

Assim, nossos estudos estão em concordância com os estudos conduzidos por Wencelová et al. (2014), que constataram que a quitosana tende a diminuir a digestibilidade da MS em dietas com alta forragem. Esse mesmo comportamento de redução também foi verificado em estudos anteriores conduzidos com níveis de quitosana (1625, 3500, 7500mg/kg de MS) e dietas com silagem de milho e dietas com diferentes relações volumoso:concentrado (GOIRI et al., 2009a; GOIRI et al., 2009b). Uma das explicações para que ocorra esse efeito pode ser devido a alterações na composição das dietas, principalmente em FDN e PB, pois a inclusão crescente de concentrado diminui a FDN e aumenta PB, melhorando a digestibilidade dos nutrientes.

A quitosana poderia ocasionar uma redução das bactérias fibrolíticas (predominante Gram-positiva) junto ao aumento das bactérias amilolíticas (predominante Gram-negativa) e da atividade amilolítica apoiando desta maneira a idéia de que o modo de ação da quitosana é baseado na interação eletrostática com a parede celular das bactérias (SUDARSHAN; HOOVER AND KNORR, 1992). Alternativamente, o potencial de hidrólise da quitosana por amilases (WU, 2011) também poderia favorecer a proliferação dessas bactérias capazes de usar a quitosana como fonte de energia (por exemplo, bactérias amilolíticas) conduzindo para mudanças na estrutura da comunidade bacteriana e nos produtos de fermentação.

Belanche et al., (2015) demonstraram efeitos da quitosana sobre bactérias celulolíticas como *Fibrobacter*; *Butyrivibrio* e *Ruminococcus* e bactérias Hemicelulolíticas (*Eubacterium*), estes efeitos estão correlacionados com o total de bactérias e podem ser compensadas pelas baixa abundância de bactérias celulolíticas. Assim, constatando uma ação mais evidente na DIVMS de dietas contendo maior proporção de concentrado, no que comparado a dietas contendo somente volumoso.

A inclusão da quitosana provoca redução na DIVPB independente do uso de concentrado, porém, com a dose máxima de 7500 mg/kg de MS de quitosana a DIVPB tende a aumentar. Segundo Schelling (1984), a redução na DIVPB pode ser indicativo de menor taxa de deaminação da proteína bruta da dieta pela microbiota ruminal, que conseqüentemente

ocasionaria maior fluxo de aminoácidos para o intestino delgado e melhor aproveitamento de nitrogênio pelos tecidos.

A diminuição da taxa de deaminação da proteína bruta da dieta afeta diretamente nos parâmetros da fermentação ruminal (pH e NAR), em que, conforme aumenta o tempo de incubação da dietas ocorre um aumento linear no pH ruminal e um efeito quadrático decrescente das concentrações de amônia ruminal.

A inclusão da quitosana não teve efeito sobre o NAR, porém, Belanche et al., (2016), destacaram que a quitosana aumenta a concentração de amônia duas (2) horas após a alimentação. A deaminação da quitosana é o passo inicial para a sua degradação, pelas bactérias ruminais (BEIER e BERTILSSON, 2013), no entanto a degradação do grupo amina ($R-NH_2$), em amônia (NH_3), pode explicar as maiores concentrações de amônia nas dietas com quitosana. Belanche et al., (2016), enfatizaram que o suprimento extra de N proporcionado pela deaminação da quitosana e a baixa retenção de amônia pelos microrganismos ruminais, levam a maiores picos de amônia ruminal, ao invés de aumentar a proteólise dos alimentos.

Segundo Kong et al. (2010), quando o pH é abaixo do pka da quitosana, a interação eletroestática entre a estrutura policatiônica e aniônica dos componentes de superfície dos microrganismos desempenham um papel importante na atividade antibacteriana. Isso porque as moléculas de quitosana tornam-se policatiônicas em um pH abaixo do pka das moléculas (6,3 – 6,5) (LIM & HUDSON, 2004). De outro modo, efeitos quelantes e hidrofóbicos são responsáveis pela atividade antibacteriana da quitosana quando o pH do ambiente é acima do pka das moléculas (KONG et al., 2010). 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). No presente estudo, observou-se que os valores de pH mantiveram-se elevados (em média de 6,7), valores estes superiores ao limite mínimo para de 6,2 proposto por Russell & Wilson (1996), para que ocorra a máxima atividade dos microrganismos, bem como crescimento microbiano, fermentação ruminal e degradação da FDN.

A estrutura da quitosana também sofre perdas de grupos nitrogênio (amida e amino), o que pode ser um indicativo de seu possível uso como nitrogênio não proteico para síntese proteica (FADEL EL SEED, et al., 2003). Ensaios *in vitro* demonstraram que a quitosana aumenta a eficiência do uso de energia, pois reduz a digestibilidade sem alterar a produção total de ácidos graxos (GOIRI et al., 2009b).

Goiri et al. (2010), também identificaram a redução nas concentrações de NAR pela inclusão da quitosana. O fato de ocorrer diminuição do NAR pode ser indicativo de menor taxa de deaminação da proteína bruta da dieta pela microbiota ruminal e conseqüentemente maior fluxo de aminoácidos para o intestino delgado e melhor aproveitamento de nitrogênio pelos tecidos (SCHELLING, 1984).

Há grande indicativo de que as concentrações de amônia possam estar relacionadas à degradação da proteína e a síntese de proteína microbiana (MAKKAR, et al., 1998), porém, Goiri et al., (2010) destacaram que esta redução na concentração de amônia ruminal é decorrente a redução na degradação dos aminoácidos, do que em função das propriedades microbianas associadas a quitosana, ou aumento da utilização para síntese de proteína microbiana.

A partir dos resultados observados, foi verificado que dietas que contém maior quantidade de volumoso apresentam uma maior produção de gás da fração lenta (parâmetro D), em um tempo (parâmetro C- lag time) maior de colonização e degradação pelos microrganismos, mostrando uma baixa taxa de produção de gás por hora, comportamento característico de alimentos mais fibrosos.

Nas dietas com maiores proporções de concentrado a digestibilidade dos nutrientes aumenta, elevando a produção de gás da fração rápida (parâmetro A), com o tempo de fermentação menor, característico de dietas mais solúveis. Com a adição crescente de quitosana, a produção de gás aumenta e o tempo de fermentação diminui, resultando numa maior eficiência da degradabilidade da dieta.

Na produção cumulativa (A+D) de gases, as dietas que continham maior quantidade de concentrado combinadas ao uso de quitosana apresentaram maiores produções que comparado com dietas com alto volumoso, confirmando a eficiência do uso na quitosana em dietas mais energéticas.

5 CONCLUSÃO

A quitosana altera os parâmetros avaliados mais eficientemente na dose mínima de 1722 mg/kg de MS para todas as dietas.

REFERÊNCIAS 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. acessado em: 21/01/2016.
- AOAC. 'Official methods of analysis.' 17th edn. **Association of Official Analytical Chemists**: Arlington, VA, 2000.
- ARAÚJO, A. P. C.; VENTURELLI, B. C.; SANTOS, M. C. B.; GARDINAL, R.; CONSOLO, N. R. B.; CALOMENI, G. D.; FREITAS, J. E.; BARLETTA, R. V.; GANDRA, J. R.; PAIVA, P. G.; et al. Chitosan affects total nutrient digestion and ruminal fermentation in Nellore steers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 206, p. 114-118, AUG 2015.
- BEIER, S, BERTILSSON, S. Bacterial chitin degradation-mechanisms and ecophysiological strategies. **Frontiers In Microbiology**, v.4 (article149), p.1–12, 2013.
- BELANCHE, A., MORALES, E.R., NEWBOLD, C. J., *In vitro* screening of natural feed additives from crustaceans, diatoms, seaweeds and plant extracts to manipulate rumen fermentation. **Journal of Science and Food Agriculture** . v.6 DOI 10.1002/jsfa.7481, 2015.
- BELANCHE, A.; PINLOCHE, E.; PRESKETT, D.; NEWBOLD, C.J. Effects and mode of action of chitosan and ivy fruit saponins on the microbiome, fermentation and methanogenesis in the rumen simulation technique. **FEMS Microbiology Ecology**, Vol. 92, No. 1, p. 1-14, 2016.
- 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.
- 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.
- 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: 161–163, 2003.
- FANG, S. W., C. F. Li and D. Y. C. Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat. **Journal Food Protection**, 57:136-140, Shih.1994.
- FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes.pt**: Experimental Designs Package (portuguese). R package version 1.1.2., 2013.
- FOX, J.; WEISBERG, S. **Na 'R' companion to applied regression**. Ed. 2, Thousand Oaks CA: Sage, 2011.

GEISSER, J.; GREENHOUSE, S. W. Na extension of Box's results on the use of the F-distribution in multivariate analysis. **Annals of Mathematical Statistics**, Ann Arbor, v. 29, p. 855-891, 1958.

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

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

GOIRI, I.; OREGUI, L. M.; GARCIA-RODRIGUEZ, A. 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.

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

HOLDEN, L.A. Comparison of methods of *in vitro* matter digestibility for ten feeds. **Journal Dairy Science**, 2(8):1791-1794, 1999.

HUYNH, H.; FELDT, L. S. Conditions under which mean square ratios in repeated measurements designs have exact F-distributions. **Journal of the American Statistical Associations**, Boston, v. 65, n. 332, p. 1582-1589, 1970.

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

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

KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**. 144, 51–63. doi:10.1016/j.ijfoodmicro. 2010.

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

MAKKAR, H. P. S.; SEM, S.; BLUMMEL, M.; BECKER, K. 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.

MAUCHLY, J. M. Significance test for sphericity of a normal n-variate distribution. **Annals of Mathematical Statistics**, Ann Arbor, v.11, p. 204-209, 1940.

PELL, A.N.; SCHOFIELD, P.; STONE, W.C. Rates of digestion of feeds measured *in vitro* with computers. **Proceedings of the Cornell Nutrition Conference**, v.13, p.74-81, 1994.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: **R Foundation for Statistical Computing**, 2011.

ROBERTS, G. A. F. Chitin chemistry. London: **Mc Millan Press**, p.350, 103,1992.

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.

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

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

SCHELLING, G. T. Monensin Mode of Action in the Rumen. **Journal of Animal Science**. 58: 1518–1527, 1984.

SUDARSHAN, N. R., HOOVER, D. G., KNORR, D. Antibacterial action of chitosan. **Food Biotechnol**. 6: 257–272, 1992.

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 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.

WENCELOVA M, VARADYOVA Z, MIHALIKOVA K; KIŠIDAYOVÁ, 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**, v.38, p. 26–33.2014.

WU S. Preparation of water soluble chitosan by hydrolysis with commercial alpha-amylase containing chitosanase activity. **Food Chemistry**, v.128, p. 769–72. 2011.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo constata que este produto tem um potencial de ação promissor como modulador da fermentação ruminal. Porém, seu mecanismo de ação enzimática, grupo de microrganismos que atua, dentre outros fatores como: categoria animal que responda mais eficiente ao uso, desempenho produtivo, doses de administração; são pontos que devem ser estudados mais intensivamente para maior esclarecimento do seu potencial.